



**HAL**  
open science

# Recherche de mutations ponctuelles de l'ADN mitochondrial dans l'os pour une détermination de l'âge

Catherine Thèves

► **To cite this version:**

Catherine Thèves. Recherche de mutations ponctuelles de l'ADN mitochondrial dans l'os pour une détermination de l'âge. Anthropologie biologique. Ecole des Hautes Etudes en Sciences Sociales (EHESS), 2006. Français. NNT: . tel-00308590

**HAL Id: tel-00308590**

**<https://theses.hal.science/tel-00308590>**

Submitted on 31 Jul 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





*À Giorgio,*

*À mes parents et grands-parents,  
à un bout de terre entre canal et Garonne...*

*« Je me souvenais qu'un jour, dans une plaisanterie sans gaieté, Charlotte m'avait dit qu'après tous ses voyages à travers l'immense Russie, venir à pied jusqu'en France n'aurait pour elle rien d'impossible (...). »*

*Andrei Makine, Le testament français.*

En premier lieu, je souhaiterais que chacun des membres de ce jury de thèse soit assuré de toute ma gratitude. C'est un grand honneur de soumettre mon travail à votre regard scientifique.

Tout d'abord, Monsieur le Professeur Georges Larrouy, je vous remercie de siéger à ce jury, vos connaissances et votre culture scientifique sont une source d'admiration pour moi.

Monsieur le Professeur Jean Guilaine, vous me faites l'honneur de participer à ce jury de thèse et de juger ce travail, permettez moi de vous témoigner ma vive reconnaissance et mon profond respect.

Merci au Professeur Georges Leonetti pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je souhaite que cette approche de travail puisse présenter un intérêt pour vous.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance au Professeur Bertrand Ludes. Merci d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, votre savoir et votre sens critique m'inspirent beaucoup de respect.

Je voudrais également remercier Mademoiselle Morgane Sibert, ta disponibilité et ton enthousiasme sont des stimulants, merci de m'accueillir en post-doc, je souhaite que notre travail commun puisse porter ses fruits.

Je tiens à remercier le Professeur Norbert Felmon, qui a co-dirigé ce travail, pour avoir soutenu ce sujet et œuvré pour qu'il se réalise. Merci de votre aide avisée et essentielle dans les moments cruciaux. Votre bonne humeur et votre qualité d'écoute durant ces années m'ont aidée à maintenir le cap.

Mes sincères remerciements au Professeur Jean Pierre Salles, co-directeur de ma thèse, sans qui ces travaux n'auraient pu avoir lieu. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et au sein de votre équipe dans un sujet de travail si différent. Je vous remercie encore de l'intérêt que vous avez porté à mes travaux, et pour tous les encouragements que vous m'avez témoigné tout au long de ces quatre années de recherche.

Que cette thèse « symbiotique » soit le témoignage de ma gratitude.

Je remercie très sincèrement l'équipe B du bâtiment C de m'avoir intégrée en son sein avec tant de sympathie et d'amitiés.

Merci à Clotilde pour sa présence, son attention et les services qu'elle n'a jamais hésité à me rendre, tu es un peu comme une nounou qui est toujours là dans les petits moments difficiles!

Merci aussi à Nicole de sa gentillesse, de son aide dans la mise au point de la PCR en Temps Réel et des discussions techniques de que nous avons pu avoir, rétablis toi bien avant de reprendre le chemin de Purpan !

Je tiens à remercier l'ensemble des chercheurs de cette équipe, Monique, Fabienne, Muriel, Françoise, Michel, Patrick et Safouane. J'ai apprécié votre dynamisme, votre sens critique durant les réunions scientifiques et l'intérêt que vous avez porté à mon travail!

Le premier étage serait vide sans le trio de choc des étudiants, je veux dire Stéphanie, Alexandra et Marie qui m'ont accompagnée durant ces quatre années et qui m'ont remonté le moral par leur bonne humeur, les discussions et les fous-rires inattendus mais toujours bienvenus, sans oublier bien sûr leurs compétences scientifiques qui s'ajoutent au plaisir de travailler avec elles! Vous allez bientôt me suivre dans cette folle histoire!

Je n'oublie pas les autres, les conversations multiples avec Arnaud, les discussions autour d'une centrifugeuse avec Caroline ou Carla, Philippe et Sara pour quelques besoins linguistiques. Au deuxième étage, Pierre, Camille et Florence pour les repas de Noël si joyeux et aussi ceux qui voquent déjà, Paul, Laurence, Karine, Laurent.

Les personnalités des autres équipes, Xavier, Ronald et François pour leurs remarques pertinentes sur mon travail lors des présentations en séminaires. Merci à Marie Claude, Justine et Michel d'avoir toujours un sourire quand nous sommes de passage dans leurs labos. Merci Marie France pour ton aide lors de la préparation de mes blots, et les rendez vous du vendredi après midi dans la chambre noire!

Merci à l'impétueuse Corinne pour tous ses conseils en biologie moléculaire et son entrain permanent et merci à Christine pour sa bonne humeur.

Au rez-de-chaussée, un salut aux occupants de la mythique table à café où tant d'histoires et de blagues se font et se défont au gré des humeurs



et des interlocuteurs ! Je remercie aussi Yvette pour être aussi sympathique même quand les papiers administratifs nous dépassent ! Et merci à tous ceux qui sont présents dans ce bâtiment et qui participent à cet échange scientifique si stimulant.

Je souhaiterais remercier l'équipe du Service de Médecine Légale de Ranqueil pour sa participation à ce travail, notamment le Docteur Bernard Martinez et le Professeur Daniel Rougé qui m'ont permis de réaliser ces études.

Un grand merci à l'équipe strasbourgeoise, de m'avoir accueillie pendant quelques jours au sein de leurs murs. Je te remercie Christine de l'intérêt que tu as toujours porté à mon travail, de ton aide pour la rédaction de l'article, et de tes avis pertinents. Merci à Sarah pour ton travail qui m'a permis d'intégrer de nouvelles données, bonne chance à toi. Merci à Sylvain pour ce bien précieux, la poudre d'os, bon courage pour la fin de ta thèse. Je remercie aussi Prisca et Elisabeth pour les échanges sympathiques que nous avons eus.

Je voudrais adresser mes remerciements à l'équipe d'Anthropologie de Toulouse pour les derniers mois que nous avons passé ensemble. Je voudrais exprimer ma gratitude envers le Professeur Eric Cribézy qui s'est toujours intéressé à mes travaux et dont l'aide m'a été précieuse pendant ces années. Je vous remercie de votre confiance et je souhaite que ma part dans le projet Sibérie vous apporte satisfaction.

Merci à Denise, Line et Nicole pour l'accueil que vous m'avez réservé et les repas si sympathiques du dernier étage. Je remercie Evelyne, Jean

Michel et André pour les discussions scientifiques si indispensables. Sans oublier mes coéquipiers de DEA embarqués avec moi dans le même bateau, Clotilde et Stéphane, courage plus que quelques coups de pagaies !

Merci enfin de m'accueillir en post-doc, je suis très heureuse d'intégrer votre équipe !

Je termine par des remerciements plus personnels pour ceux qui ont participé à quelques étapes de ma vie et qui m'ont donné envie de continuer sur cette voie.

Merci à Christina pour ta bonne humeur et ta simplicité, j'espère sincèrement venir un jour te rendre visite en Argentine.

Merci à Jacques Coularou, en souvenir des bons moments que j'ai pu vivre lors de fouilles si sympathiques et si constructives pour moi.

Merci à l'équipée de bons amis, Guilhem et Marion, Sylvain et Patricia, Franck et Anissa, Frédéric et Dorothee, Guillaume, sans qui la vie n'aurait pas le même goût !



# **RECHERCHE DE MUTATIONS PONCTUELLES DE L'ADN MITOCHONDRIAL DANS L'OS POUR UNE DETERMINATION DE L'AGE**

## **RESUME**

Ces dernières années, de nombreux travaux ont démontré la présence de mutations mitochondriales en relation avec l'âge dans divers types tissulaires. Le sujet de notre travail consiste à démontrer de manière fiable et spécifique la détection de telles mutations, d'établir leurs relations avec l'âge, et de déterminer si elles peuvent présenter un intérêt en Médecine Légale ou en Anthropologie afin d'augmenter les indices de détermination de l'âge.

Dans un premier temps, sur le tissu musculaire et les cellules buccales, nous avons mis au point une technique combinant la technologie PNA (Peptid Nucleic Acid) et la PCR en Temps Réel (qPCR), démontrant une détection sensible et une quantification des taux de mutation de l'hétéroplasmie A189G, et la relation avec l'âge dans le tissu musculaire. Ces résultats ont démontré la meilleure sensibilité de la technique PNA/qPCR par rapport à la technique de séquençage automatique pour la détection d'hétéroplasmie et ont pu être confirmés par la technique de Southern blot.

Dans un deuxième temps, nous avons travaillé à partir de tissu osseux provenant d'une part d'individus d'âge connu dans le cadre d'identification en Médecine Légale et d'autre part de squelettes de Sibérie Orientale identifiés par l'analyse de marqueurs ostéologiques du vieillissement. Nous avons démontré l'accumulation de l'hétéroplasmie A189G dans les individus âgés de plus de 70 ans pour ceux dont l'âge est connu, et dans les individus âgés identifiés comme tel par les indicateurs ostéologiques.

Le séquençage automatique nous a permis d'identifier deux autres hétéroplasmies (T72C et A73G) présentes dans des individus âgés de plus de 50 ans dans le tissu musculaire et osseux, hétéroplasmies déjà décrites dans la littérature.

L'ensemble de ces résultats peut présenter un intérêt dans la détection et l'interprétation de l'hétéroplasmie de l'ADN mitochondrial dans les études médico-légale et anthropologique.

**Mots clés :** ADN mitochondrial, Vieillesse, Détermination de l'âge, Os, Mutations ponctuelles, Médecine Légale, Anthropologie

---

# RESEARCH OF MITOCHONDRIAL DNA POINT MUTATIONS IN BONES FOR AGE DETERMINATION

## ABSTRACT

In recent years, numbers of reports have suggested that during individual natural aging, heteroplasmic point mutations accumulate in the control region of mitochondrial DNA (mtDNA) of some tissue types. In the present study, we searched to evaluate the most efficient method for detecting low levels of heteroplasmy, determine whether these mutations were really age-related and assess the possible implications of heteroplasmies in anthropological and forensic studies.

In first time, in two tissue types, muscle samples and buccal cells, we carried out the sensitive detection and quantification of point mutation A189G with peptid nucleic acid (PNA) and Real Time PCR (qPCR) together. Our results give additional information on the increase in mutation frequency with age in muscle tissue and revealed that the PNA/Real Time PCR is a largely more sensitive method than DNA sequencing for heteroplasmy detection, confirmed by Southern blot.

In second time, we worked on bone tissues, on the one hand, from individuals where age was known in forensic identification, on the other hand, from ancient skeletons of the Eastern Siberia, where age determination was done using bone indicators. We showed the A189G heteroplasmy accumulation on individuals of 70 years old or more, when age is known, and on identified old individuals by bone indicators.

The automatic sequencing revealed two other heteroplasmies (T72C and A73G) on individuals of 50 years old or more, in muscle and bone tissues, heteroplasmies already described in literature.

These investigations could be of interest in the detection and interpretation of mtDNA heteroplasmy in anthropological and forensic studies.

**Key words:** Mitochondrial DNA, Aging, Age Determination, Bones, Point Mutations, Forensic Sciences, Anthropology



## TABLE DES MATIERES

<b>Introduction générale</b>	1
<b>Première partie : Le vieillissement</b>	
<b>Introduction : Vers une théorie générale du vieillissement</b>	5
1. Définitions	6
<i>Figure 1 : Différents types théoriques de vieillissement.</i>	6
2. Les théories du vieillissement	10
2.1. Les théories physiologiques	10
2.2. Les théories évolutionnistes	14
<b>Chapitre 1 : La mitochondrie</b>	19
Introduction : La conversion de l'énergie	19
1. La mitochondrie	
1.1. Structure	20
<i>Figure 2 : Organisation générale d'une mitochondrie.</i>	20
<i>Figure 3 : Localisation des mitochondries à proximité des sites à forte consommation d'ATP.</i>	21
1.2. Production d'énergie	21
<i>Figure 4 : Schéma représentant les complexes constituant la chaîne respiratoire enchâssée dans la membrane interne.</i>	22
2. Le génome mitochondrial	
2.1. L'organisation du génome humain	23
<i>Figure 5 : Cartographie du génome mitochondrial humain.</i>	24
<i>Figure 6 : Région de contrôle de l'ADNmt humain.</i>	25
2.2. Les caractères spécifiques	26
<i>Figure 7 : Le développement embryonnaire, l'implantation et la formation de la lignée germinale femelle.</i>	27
3. L'hétéroplasmie de l'ADN mitochondrial	29
<i>Figure 8 : Exemple de ségrégation répllicative mitotique.</i>	30
<i>Figure 9 : La variation du niveau d'hétéroplasmie mitochondrial transmis.</i>	31
<b>Chapitre 2 : Le stress oxydatif</b>	
1. La théorie physiologique de Harman	35
2. Les ROS	
2.1. Formation et propriétés chimiques	37
2.2. Les origines biologiques	38
<i>Figure 10 : Schéma démontrant la relation entre la phosphorylation oxydative mitochondriale, la production d'ATP, la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'initiation de l'apoptose.</i>	40

2.3. Les dommages oxydants	42
2.3.1. Sur les protéines mitochondriales	43
2.3.2. Sur les lipides mitochondriaux	44
2.3.3. Sur l'ADN mitochondrial	45
<i>Figure 11 : Sites cibles de la dégradation de l'ADN.</i>	46
<i>Figure 12 : Molécules stables dérivées des pyrimidine et purine produites par l'attaque du radical hydroxyle (OH°) sur l'ADN.</i>	47
<i>Tableau 1 : Conséquences biochimiques et biologiques aux lésions induites par les radicaux libres.</i>	49
<i>Figure 13 : Conséquences des dommages ADN.</i>	50
3. Les mécanismes de réparation de l'ADN mitochondrial	51
<i>Figure 14 : Modèles de réparation de l'ADN dans le noyau et la mitochondrie des cellules de mammifères.</i>	51
<i>Figure 15 : Les sous-modèles de réparation et d'excision des bases</i>	53
<i>Figure 16 : Rôle de la mitochondrie dans le vieillissement humain et les maladies dégénératives de l'âge.</i>	57
<b>Chapitre 3 : les mutations ADNmt induites</b>	
Introduction	58
1. Les délétions mitochondriales	59
<i>Tableau 2 : Délétions dans la région codante mitochondriale associées à l'âge dans les tissus humains.</i>	60
2. Les mutations sur la région codante	62
<i>Figure 17 : Analyse quantitative des mutations ponctuelles A8344G (MERRF) et A3243G (MELAS) dans le muscle d'individus sains de différents âges.</i>	63
<i>Tableau 3 : Mutations ponctuelles dans la région codante ADNmt associées à l'âge dans les tissus humains.</i>	65
3. Les mutations sur la région D-LOOP	65
<i>Figure 18 : Nombre de bandes détectées dans les groupes de patients et de contrôles.</i>	66
<i>Tableau 4 : Mini-duplications de séquences dans la région D-Loop associées à l'âge dans les tissus humains.</i>	67
<i>Figure 19 : Distribution des hétéroplasmies et des polymorphismes dans la région D-Loop.</i>	68
<i>Figure 20 : La technique de séquençage démontre l'hétéroplasmie A189G.</i>	71
<i>Figure 21 : Graphes représentant la distribution par âge des mutations A189G (A) et T408A (B).</i>	73
<i>Figure 22 : A : Représentation des différents pourcentages d'hétéroplasmies des mutations dépendantes de l'âge.</i>	
: B : Pourcentage moyen d'hétéroplasmies pour chaque mutation dépendante de l'âge.	74
<i>Figure 23 : Effet de l'âge sur le nombre moyen de changements de base dans la région D-Loop sur les fibres musculaires.</i>	75
<i>Tableau 5 : Mutations ponctuelles de la région D-Loop associées à l'âge dans les tissus humains.</i>	77
<i>Figure 24 : Position des mutations somatiques tissu-spécifique identifiées dans la région de contrôle ADNmt humain.</i>	78
Conclusion sur les mutations de l'ADN mitochondrial	79



## Deuxième partie : Résultats expérimentaux et discussion

<b>Introduction</b> : Aux techniques et méthodes d'analyses expérimentées	80
1. Le séquençage automatique	80
<i>Figure 25</i> : Principe de la réaction de séquençage.	81
<i>Figure 26</i> : Exemple d'un électrophorégramme.	82
2. La technique PNA	82
<i>Figure 27</i> : Comparaison des structures d'un brin ADN et d'une sonde PNA.	83
<i>Figure 28</i> : Méthode de blocage dirigé de la PCR par la molécule PNA.	84
3. La PCR en Temps Réel	85
<i>Figure 29</i> : Principe de l'émission de fluorescence lors de la PCR en Temps Réel.	85
<i>Figure 30</i> : Lecture de l'émission de fluorescence émise en fin de chaque cycle d'élongation.	86
4. La méthode conjuguée PNA/qPCR	87
<i>Figure 31</i> : Principe de la méthode combinée PNA/qPCR.	87
5. Le Southern blot	88
<i>Figure 32</i> : Schéma représentant les différentes étapes de la technique de Southern blot.	89

## Chapitre 1 : Matériel et Méthodes

1. Matériel : les tissus analysés	90
1.1. Les cellules buccales	90
1.2. Le tissu musculaire	90
1.3. Le tissu osseux	90
2. Méthodes	
2.1. Extraction de l'ADN	91
2.2. Les précautions et les conditions d'analyses	93
2.3. Les digestions enzymatiques	94
<i>Tableau 6</i> : Liste des enzymes et des amorces utilisées pour les digestions enzymatiques sur les 3 positions.	95
2.4. Les clones M et WT	95
<i>Tableau 7</i> : Liste des amorces pour la construction de clones contrôles sur les positions 189, 408 et 414.	96
2.5. Le séquençage automatique	96
<i>Tableau 8</i> : Liste des amorces utilisées lors du séquençage automatique.	100
2.6. Les techniques conjuguées PNA et PCR en Temps Réel	101
<i>Tableau 9</i> : Liste des amorces et des sondes PNA utilisées pour la technique combinée PNA/qPCR.	103
2.7. La quantification relative	103
2.8. Le Southern blot	105
<i>Tableau 10</i> : Liste des amorces et des sondes marquées en 5' par une molécule de digoxigénine pour la technique de Southern blot sur la position 189 (région HVII).	106

2.9. L'analyse statistique	106
2.10. La méthode ostéologique	107

## Chapitre 2 : Résultats

1. Les digestions enzymatiques	108
<i>Figure 33: Digestion enzymatique par l'enzyme Cac8I.</i>	108
<i>Figure 34: Digestion enzymatique par l'enzyme DdeI.</i>	109
2. Le séquençage automatique	109
2.1. Les polymorphismes	109
<i>Tableau 11 : Caractérisation des polymorphismes dans la région d'hybridation des sondes PNA 189.</i>	111
2.2. La limite de détection	112
<i>Figure 35 : Electrophorégramme à la position 189 des deux brins Fet R pour le variant G à 10%.</i>	112
<i>Figure 36 : Electrophorégramme à la position 189 des deux brins Fet R pour le variant G à 20%.</i>	113
<i>Figure 37 : Electrophorégramme à la position 189 des deux brins Fet R pour le variant G à 30%.</i>	114
2.3. Les hétéroplasmies sur les positions 189, 408 et 414	115
<i>Figure 38 : hétéroplasmie A189G sur un prélèvement musculaire issu d'un homme âgé de 79 ans.</i>	115
2.4. Les hétéroplasmies sur d'autres positions	116
<i>Figure 39: Comparaison des deux profils de séquence sur la position 72 entre le muscle et les cellules buccales d'un individu de 63 ans.</i>	116
<i>Figure 40: Hétéroplasmie A73G identifiée sur un prélèvement osseux d'une femme âgée de 105 ans.</i>	117
<i>Tableau 12: Hétéroplasmies détectées par la méthode de séquençage automatique.</i>	117
3. La technique PNA	118
3.1. La mise au point sur les clones	118
<i>Figure 41: Evaluation du blocage de l'amplification PCR sur les clones WT et M de la position 189 par la sonde PNA 189A.</i>	118
<i>Figure 42: Evaluation du blocage de l'amplification PCR sur les clones WT et M de la position 414 par la sonde PNA 414T.</i>	118
3.2. La mise au point sur les contrôles	119
<i>Figure 43: Evaluation du blocage de l'amplification PCR sur les contrôles WT et M de la position 189 et sur un individu âgé de 79 ans par les sondes PNA 189A et 189G.</i>	119
4. La PCR en Temps Réel	120
4.1. La spécificité des amorces	120
4.2. L'efficacité des amorces	120
4.3. La linéarité de l'amplification	121
<i>Figure 44 : Linéarité de l'amplification en relation avec la concentration ADN à partir des contrôles WT et M pour la position 189.</i>	121
5. La méthode combinée PNA/qPCR	122
5.1. La linéarité du blocage par les sondes PNA	122
<i>Figure 45 : Linéarité de l'amplification sur les dilutions en série des matrices ADN du contrôle WT en position 189 sans et avec PNA.</i>	122
<i>Figure 46 : Linéarité de l'amplification sur les dilutions en série des matrices ADN du contrôle M en position 189 sans et avec PNA.</i>	123

5.2. L'efficacité du blocage par les sondes PNA	124
<i>Figure 47 : Amplification selon le pourcentage de mutants (variants 189G obtenus à partir des clones WT et M) avec la sonde PNA G.</i>	124
<i>Figure 48 : Amplification selon le pourcentage de mutants (variants 189G obtenus à partir des clones WT et M) avec la sonde PNA A.</i>	125
<i>Figure 49 : Amplification selon le pourcentage de mutants (variants 189G) avec la sonde PNA G.</i>	126
<i>Figure 50 : Amplification selon le pourcentage de mutants (variants 189G) avec la sonde PNA A.</i>	126
5.3. La courbe de référence	127
<i>Figure 51 : Rapport des valeurs de cycle seuil (Ct) des sondes PNA G sur PNA A mesurées (ratio Ct G/A) selon le pourcentage de mutants (variants 189G).</i>	128
<i>Figure 52 : Pourcentage de mutants 189G calculé à partir du rapport des valeurs de Ct G/A.</i>	128
5.4. La précision des tests	129
6. Les échantillons analysés par PNA/qPCR	129
6.1. La mutation A189G	130
<i>Figure 53 : Accumulation dans les cellules buccales de l'hétéroplasmie A189G par rapport à l'âge.</i>	130
<i>Figure 54 : Accumulation de l'hétéroplasmie A189G dans les cellules buccales d'individus appartenant à la même lignée maternelle dans trois familles différentes.</i>	131
<i>Figure 55 : Accumulation de l'hétéroplasmie A189G dans le tissu musculaire avec l'âge.</i>	131
6.2. Les mutations T408A et T414G	133
7. Le Southern blot	134
7.1. La limite de détection	134
<i>Figure 56a : Détection de la mutation 189G selon le pourcentage de variants G par la sonde digoxigénine M (189G) pour une quantité ADN initiale de 100 ng.</i>	135
<i>Figure 56b : Détection de la mutation 189G selon le pourcentage de variants G par la sonde digoxigénine M (189G) pour une quantité ADN initiale de 50 ng.</i>	135
7.2. La détection sur le tissu musculaire	136
<i>Figure 57 : Détection des deux formes A et G en position 189 sur des échantillons musculaires d'individus âgés de plus de 60 ans.</i>	136
<i>Figure 58 : Détection des deux formes A et G en position 189 sur des échantillons musculaires d'individus âgés de moins de 60 ans.</i>	137
<i>Figure 59 : Détection des deux formes A et G en position 189 sur des échantillons musculaires d'individus âgés de moins de 40 ans.</i>	137
<i>Figure 60 : Détection des deux formes A et G en position 189 sur des échantillons musculaires d'individus âgés de plus de 50 ans.</i>	138
7.3. La détection sur les cellules buccales	139
<i>Figure 61 : Détection des formes A et G en position 189 sur des échantillons buccaux d'individus appartenant à la même lignée maternelle dans trois familles différentes.</i>	139
7.4. La variabilité tissulaire	139
<i>Figure 62 : Détection des deux formes A et G sur la position 189 sur un double échantillonnage musculaire et buccal provenant de deux individus.</i>	140
7.5. La détection sur le tissu osseux	140
<i>Figure 63 : Détection des deux formes A et G en position 189 sur un échantillon osseux moderne d'un homme âgé de 71 ans.</i>	140
<i>Figure 64 : Détection des deux formes A et G en position 189 sur des échantillons osseux modernes d'individus âgés de plus de 70 ans.</i>	141
<i>Figure 65 : Détection de la forme G sur la position 189 dans un échantillon osseux ancien d'une femme âgée.</i>	142

<i>Figure 66: Détection des formes A et G sur la position 189 dans deux échantillons osseux anciens de deux femmes âgées.</i>	142
<i>Figure 66 bis: Détection de la forme A sur la position 189 dans les trois échantillons osseux anciens.</i>	143
8. L'analyse statistique	143
9. La comparaison des résultats obtenus par les trois techniques	144
<i>Tableau 13: Caractérisation de la position 189 entre les trois techniques sur tous les types tissulaires.</i>	144
<b>Chapitre 3 : Discussion</b>	<b>145</b>
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>169</b>
Bibliographie	172
Annexes	
1. Liste des prélèvements biologiques analysés	190
2. Protocole pour l'obtention des clones M et WT	193
3. Tableau des polymorphismes HVII et HVIII des échantillons	196
4. Les courbes de dissociations	206
5. L'efficacité des amorces	209
6. Article accepté dans <i>Journal of Forensic Sciences</i>	212

# INTRODUCTION GENERALE

## INTRODUCTION GENERALE

Notre projet de thèse s'est développé à partir de travaux réalisés par de nombreux auteurs qui démontreraient l'accumulation de mutations de l'ADN mitochondrial lors du vieillissement de l'individu, et ensuite par nos travaux de DEA sur l'identification de mutations sous forme d'hétéroplasmie dans les tissus musculaire et osseux. L'hypothèse proposée dans ce travail est la suivante : peut-on mettre en évidence par une analyse moléculaire, des mutations qui pourraient être corrélées à l'âge et qui présenteraient un intérêt en Médecine Légale ou en Anthropologie biologique ?

En effet, la détermination de l'âge au décès des individus matures (d'un âge supérieur à 30 ans) à partir des restes squelettiques est une problématique difficile à résoudre par les méthodes ostéologiques. Celle-ci reste pourtant indispensable aux médecins légistes lorsqu'ils doivent confirmer ou infirmer une identité face à des restes humains. En Anthropologie, l'étude et la comparaison des populations nécessitent la connaissance de l'âge des individus constituant les échantillons de référence.

La détermination de l'âge est relativement précise pour les individus immatures, les adolescents et les jeunes adultes en prenant en compte les différents stades des fusions épiphysaires des os longs ou les stades de calcification ou d'éruption dentaire. Les sujets dont l'âge est supérieur à 60 ans peuvent être reconnus avec une fiabilité < à 80% à partir des marqueurs ostéologiques de la 4<sup>e</sup> côte et de la symphyse pubienne. La détermination de l'âge est par contre très difficile entre 30 et 60 ans (Crubézy *et al.* 2002 pp 35-36)

L'axe de recherche du vieillissement cellulaire élargit le champ d'investigation. En effet de nombreuses études, développées dans la recherche médicale en premier lieu pour des maladies dégénératives, ont constaté l'accumulation de mutations de l'ADN mitochondrial en fonction de l'âge chez des individus ne présentant pas de pathologies. Les études actuelles sur le vieillissement de la fonction mitochondriale sont orientées dans des tissus tel que la peau, le muscle, le cerveau, le sang ou les organes mais très peu de travaux sont réalisés dans le tissu osseux.

Le postulat proposé est celui du "stress oxydatif" qui pourrait expliquer le vieillissement au niveau biochimique dans la cellule et plus précisément impliquerait les mitochondries (Harman 1972). Dans cette hypothèse, le vieillissement dépendrait pour une partie de l'accumulation d'altérations dans les fonctions de l'ADN mitochondrial (ADNmt), de la perte relative de fonctions physiologiques et de l'accumulation irréversible de dommages oxydants.

L'instabilité et la dégradation de l'ADN seraient provoquées par plusieurs facteurs biochimiques intrinsèques à la cellule, comme les phénomènes d'hydrolyse, d'oxydation et de méthylation non enzymatique (Lindahl 1993).

Linnane *et al.* (1989) ont démontré que l'accumulation de mutations dans l'ADNmt est un facteur important dans le processus de vieillissement. Cette observation est confirmée par la présence de dérivés nucléotidiques oxydés et alkylés, de délétions, d'insertions et des substitutions de bases dans l'ADNmt humain s'accumulant avec l'âge, sur des individus ne présentant pas de pathologies, dans une variété de tissus post-mitotiques.

Notre travail s'est donc basé initialement sur la découverte de mutations ponctuelles dépendantes de l'âge dans la région de contrôle de répllication de l'ADNmt de fibroblastes de peau (Michikawa *et al.* 1999) et de muscle (Murdock *et al.* 2000 ; Wang *et al.* 2001) sur l'Homme.

Il a été démontré qu'une proportion élevée de molécules présente une transversion de **T** à **G** sur la position **414** (Michikawa *et al.* 1999). Cette mutation était présente à plus de 50% des individus d'un âge supérieur à 65 ans, et absente dans les individus jeunes des fibroblastes de peau humain. Les travaux de Murdock *et al.* (2000) ont détecté la mutation 414 dans le muscle squelettique normal à partir d'individus âgés de 30 ans et plus. L'accumulation de deux mutations ponctuelles significatives, **A189G** et **T408A** est décrite dans l'ADNmt de tissu musculaire en fonction de l'âge (Wang *et al.* 2001).

Cependant, dans le vieillissement normal, la détection des mutations est compliquée par le fait que ces mutations sont rares et hétérogènes. En effet, chaque cellule contient 100 à 1000 molécules d'ADNmt et une cellule mutante contient une proportion de molécules mutantes et sauvages, cette condition dans la cellule est appelée hétéroplasmie. De plus, le ratio d'ADNmt mutant et sauvage est variable entre les tissus. Finalement, il est souvent difficile de détecter des proportions faibles d'ADNmt mutant, mais il a été possible de démontrer leurs présences en utilisant différentes approches techniques.

Le propos de notre travail est d'analyser l'événement de ces mutations dans des prélèvements tissulaires qui correspondent aux matériaux de travail en Médecine Légale ou en Anthropologie. Les cellules buccales sont souvent utilisées dans les analyses génétiques dans le cadre d'identification individuelle ou de recherche de filiation, les prélèvements effectués ont été fait sur des sujets vivants, certains choisis au sein d'une même lignée maternelle afin de tester le caractère somatique ou transmis des mutations. Le squelette osseux représente la base de travail de tout anthropologue dans l'étude des sites funéraires du passé, et peut être

quelquefois la seule partie du corps accessible pour les médecins légistes dans un cadre d'identification. Les tissus osseux analysés ont deux origines différentes. D'une part, un ensemble de prélèvements sont issus d'autopsies dans le cadre d'identification et où l'âge est ensuite reconnu secondairement. Ils subissent un traitement pour éliminer toute trace d'autres éléments organiques sur et à l'intérieur de l'os car il est nécessaire que les tissus mous environnants (enthèses, muscle, cellules sanguines, adipocytes) aient disparus pour spécifier que l'ADN étudié provient strictement de l'os. D'autre part, des prélèvements ont été réalisés sur des squelettes provenant de Sibérie Orientale, la Yakoutie, inhumés entre 50 et 150 cm il y a deux à trois siècles à la surface du permafrost. En effet les premiers travaux réalisés sur ces squelettes par l'équipe du laboratoire d'Anthropologie Moléculaire de Strasbourg démontrent que les éléments organiques (enthèses, muscle, cellules sanguines, etc..) ont disparus mais que l'ADN mitochondrial est bien conservé. Nous travaillerons aussi sur le tissu musculaire, prélevés au cours d'autopsies pour identification et où l'âge est ensuite reconnu secondairement, qui sera le tissu de référence dans la détermination de mutations déjà décrites dans celui-ci, dans la démonstration de leurs relations avec l'âge et dans les conditions de mises au point des techniques.

Lors de notre étude de DEA réalisée dans l'Unité INSERM 563 (sous la direction du Pr. Salles, Hôpital de Purpan) en collaboration avec le service de Médecine Légale (sous la direction du Pr. Telmon, Hôpital de Rangueil), nous avons appliqué la méthode d'ASO Hybridation pour identifier les trois mutations décrites précédemment dans le tissu musculaire et osseux à partir d'individus d'âge différents. Cette technique a révélé que les mutations ponctuelles A189G et T414G, en sont présentes dans l'os.

Notre premier objectif est l'identification, dans un échantillonnage d'individus d'âge connu, de ces trois mutations ponctuelles de l'ADNmt, **T414G**, **T408A** et **A189G**, dans les cellules buccales et le tissu musculaire dans un premier temps puis dans le tissu osseux, afin d'évaluer la détection de ces mutations et leur quantification en relation avec l'âge.

Il est donc nécessaire de choisir une méthode de détection plus discriminante que l'ASO Hybridation, dont la sensibilité puisse mettre en évidence des fréquences de molécules mutantes  $\leq$  à 1% en présence d'un vaste excès d'autres formes de molécules ADNmt. La technique des molécules PNAs (Peptid Nucleic Acid) est réalisée dans les travaux de Murdock *et al.* (2000). Cette méthode mise en place par Ørüm *et al.* (1993) est extrêmement spécifique, éliminant les faux positifs en l'absence de molécules mutantes, étant capable de détecter des mutations à un niveau de 0,1 % du total des molécules. Cette technique de discrimination de molécules sera combinée avec la technique de PCR en Temps Réel qui



permet une quantification reproductible, fiable et précise (Higuchi *et al.* 1993 ; Heid *et al.* 1996).

Dans ce travail, nous essaierons d'expliquer dans la première partie les origines des phénomènes biologiques oxydants, leurs effets sur l'environnement direct mitochondrial, leurs conséquences physiologiques au niveau cellulaire et les réponses possibles de la cellule, et finalement les mutations que nous pouvons observer sur l'ADNmt et ce qui nous mène au but de notre étude.

La deuxième partie relate tout le procédé technique et expérimental que nous avons suivi dans le but de répondre à notre question : Au sein d'une même population, ces mutations pourraient-elles servir aux médecins légistes et aux anthropobiologistes pour apprécier l'âge civil d'un sujet dont il ne reste que le squelette ?

Cette question pourrait en entraîner d'autres :

Quelles sont les modalités d'apparition dans le temps et au sein d'une même population de ces mutations ? Y-a-t'il des différences entre des populations urbaines, dans des populations de chasseurs-cueilleurs ou d'agriculteurs ? Ces mutations pourraient-elles expliquer certaines divergences parfois mises en évidence entre une mère et ses descendants lors de recherches de parenté basées sur l'ADN mitochondrial ? L'apparition de ces mutations serait-elle liée au développement clinique ou infra-clinique de maladies liées à l'âge ?

Une première partie de nos résultats, concernant la démonstration de la capacité de détection et de quantification de notre méthode combinant les sondes PNA et la PCR en Temps Réel appliquée sur le tissu musculaire et les cellules buccales a été soumis pour publication dans *Journal of Forensic Sciences*. Ce manuscrit a été accepté le 2 Janvier 2006, l'intégralité du texte et des figures se situe dans l'annexe 6.

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

## **PREMIERE PARTIE : LE VIEILLISSEMENT**

### **INTRODUCTION : VERS UNE THEORIE GENERALE DU VIEILLISSEMENT**

Dés l'Antiquité, l'homme a tenté d'élaborer des théories du vieillissement et d'expliquer le phénomène menant à la mort. Au XVIII<sup>ème</sup> siècle, les Naturalistes ont vu dans la mort une volonté divine permettant d'équilibrer les naissances et les disparitions. L'anatomiste Bichat utilise une formule reprise dans la plupart des dictionnaires : la vie est l'ensemble des fonctions qui résiste à la mort (1800). L'un des premiers à préciser les conditions expérimentales d'une approche du vieillissement est Metchnikoff qui crée en 1903 le terme de gérontologie. Mais, c'est bien l'œuvre de Weismann (1892), qui pose les questions essentielles du vieillissement et de la signification biologique de la mort, et s'inscrit dans le cadre de l'évolution des espèces proposé par Darwin (1859). Nous reparlerons plus loin de son travail dans cette introduction au vieillissement.

Actuellement, l'étude du vieillissement ou de la biologie de la sénescence se divise en deux axes de recherches qui regroupent deux types de théories. Le premier s'intéresse aux causes proximales du vieillissement, aux mécanismes physiologiques de la sénescence. En cela elles ne sont pas nécessairement contradictoires et peuvent décrire plusieurs mécanismes au niveau des organes de différentes espèces. Le gérontologue russe Medvedev (1990) en a dénombré plus de 300 qu'il a regroupé en sous-classes. Elles peuvent être descriptives, génétiques ou environnementales.

Le deuxième type de théorie tente de répondre, d'un point de vue global, au " pourquoi " du vieillissement et d'expliquer sa disparité parmi les espèces. Ces théories s'intéressent aux causes distales, à la finalité du vieillissement, et peuvent s'opposer. Cette opposition est présente entre les théories stochastiques et déterministes, et actuellement entre les théories physiologiques et évolutionnistes. C'est de cette opposition dont nous discuterons plus précisément dans cette première partie et comment notre travail peut s'insérer dans ce débat.

Le processus progressif du vieillissement est complexe et multi-factoriel et l'ensemble des observations acquises nécessiterait d'être transformé en un ensemble compréhensible de connaissances, qui tendrait vers une théorie générale du vieillissement des espèces et de la longévité (Gavrilov et Gavrilova 2002). Dans l'idée générale actuelle, de nombreux chercheurs estiment qu'une compréhension biologique globale pourrait être améliorée par les théories évolutionnistes du vieillissement basées sur la théorie darwinienne de l'évolution par la sélection naturelle.

## 1. Définitions

Le vieillissement biologique, que l'on appelle aussi la sénescence, peut être défini comme la somme des modifications anatomiques, physiologiques et histologiques, survenues au cours du temps, au sein des différents types cellulaires, dans les différents organes et systèmes. Le vieillissement est également caractérisé par une perte généralisée de la complexité dans les dynamiques qui régulent les fonctionnements des différents organes et tissus, une diminution progressive de l'entropie, une perte de la capacité d'adaptation au stress (Robert 1996 ; Marty 1996).

L'ensemble des effets de ces changements se traduit dans le taux de mortalité des adultes qui augmente avec l'âge, dans la population. La courbe de Gompertz (figure 1), proposée dès 1825 pour l'Homme, permet de décrire cette augmentation (Veron 2002).

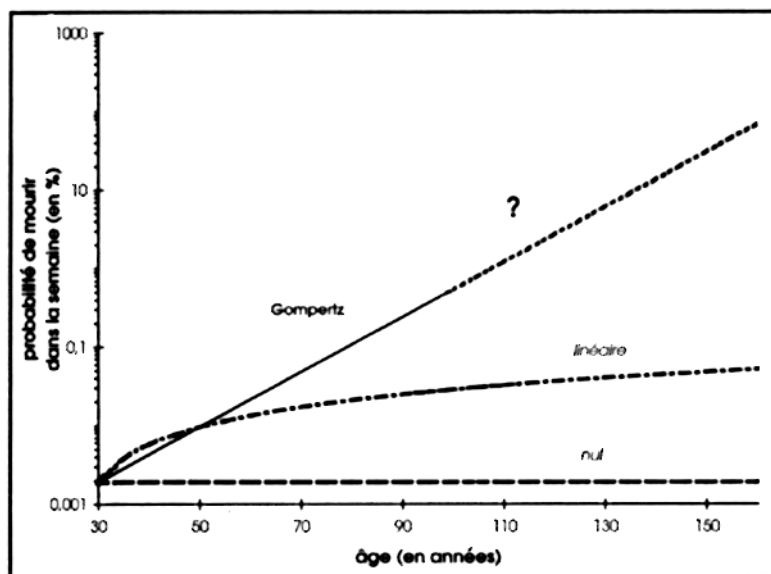


Figure 1 : Différents types théoriques de vieillissement.

*La définition la plus couramment admise du vieillissement est de nature statistique : c'est l'augmentation du taux de mortalité avec l'âge. La courbe la plus proche de la réalité humaine, a été mise en évidence par le britannique B. Gompertz. Sur cette échelle semi-logarithmique, elle se traduit par une droite, qui fait passer la probabilité de mourir à plus de 25% par an au-delà de 100 ans. Selon Klarsfeld et Revah 2000 Editions Odile Jacob p45.*

De plus, la mortalité de la plupart des espèces dont les statistiques sont accessibles, se conforme à une courbe de Gompertz, en général à partir de l'âge de la maturité sexuelle. Le vieillissement peut se définir alors comme l'ensemble des processus qui contribuent à l'augmentation du taux de mortalité avec l'âge, pour une espèce donnée. Cette définition du

vieillesse permet des comparaisons entre les espèces où les caractères détaillés du processus de vieillissement peuvent différer sensiblement.

Le vieillissement concerne trois processus du vivant, il comprend : la création d'un programme de vie lors de la fertilisation, qui est suivi tout le long du développement. La phase de maturité qui permet la reproduction de l'organisme et la phase de sénescence qui s'achève par la mort de l'organisme.

La sénescence survient donc au moment où la période de reproduction est terminée et quand les contraintes de la sélection naturelle s'amenuisent (Kirkwood 1997).

En termes phylogénétiques, le vieillissement est très répandu, mais n'est pas universel (Comfort 1979). En effet, on distingue trois types de sénescence dans les organismes supérieurs qui pourrait correspondre à des stratégies de survie spécifique des espèces.

Une sénescence rapide où la mort suit brutalement la reproduction : ces animaux sont caractérisés par une reproduction unique déclenchée par des facteurs exogènes. Elle présente souvent une aphagie et une involution rapide de certains organes au profit de la reproduction. L'exemple est le saumon du Pacifique, le mâle meurt juste après l'accouplement. La mort est précédée par un vieillissement accéléré induit par une décharge d'hormones glucocorticostéroïdes (Huey 1991). Cela touche aussi les insectes, les vers et les espèces végétales telle que le bambou du Japon (*Phyllostachys*). Dans ces cas, on observe un synchronisme au sein d'une population ou d'une espèce, incluant une déchéance brutale et quasi-synchrone de populations entières, avec des altérations massives et stéréotypées chez tous les individus concernés. Dans d'autres cas, comme le saumon ou la souris marsupiale, les espèces semblent avoir opté pour une stratégie reproductive qui les met à mort.

Une sénescence progressive où les survivants ne meurent pas tous des même causes. Ce type d'animaux est caractérisé par plusieurs phases de reproduction suivit d'un déclin graduel de la fertilité. Certains poissons, reptiles, serpents et amphibiens (Patnaïk et Mahapatro 1994 ; Patnaik 1994) dont la taille maximale est atteinte rapidement, vieillissent progressivement. Les mammifères et les aviaires rentrent aussi dans cette catégorie. On constate une absence de synchronicité qui persiste même au sein d'une lignée pure. Elle n'est donc pas le simple reflet de l'hétérogénéité des populations. Les poissons sont très affectés par la température ambiante. Plus elle est basse, dans les limites de la viabilité, plus l'organisme tourne au ralenti, moins il vieillit. Chez les mammifères, la restriction calorique permettrait d'obtenir un tel ralentissement. Cela introduit une notion importante : la plasticité de la longévité.

C'est sur le vieillissement et la longévité des mammifères que l'on trouve des évolutions étonnamment similaires, depuis les rongeurs jusqu'aux humains, bien qu'à des vitesses différentes. La loi de Gompertz y trouve son illustration la plus précise et la plus générale (Veron 2002). Des caractéristiques de vieillissement semblent similaires chez les mammifères : la perte progressive ou la dégénérescence des ovules. Des femelles ménopausées ont été observées dans la nature, chez des singes, des baleines, des éléphants et des opossums. La perte neuronale partielle dans certaines régions cérébrales, la baisse des réponses immunitaires, la presbytie et l'ostéoporose se manifestent presque systématiquement au cours du deuxième tiers de la vie, quelque soit la longévité de l'espèce de mammifère considérée. Ces similitudes soulignent l'intérêt des recherches menées sur le vieillissement des mammifères non humains.

Le troisième type de sénescence est le vieillissement négligeable : les esturgeons, les tortues marine et terrestre et les crocodiles vivent longtemps. La taille maximale est atteinte lors de la maturation sexuelle mais il existe encore une croissance lente et une capacité à la multiplication cellulaire. La sénescence n'est pas observée chez ces animaux, mais elle pourrait se dérouler de façon très lente (Patnaik 1994). Mais dans ces espèces, la probabilité de survie n'en diminue pas moins avec l'âge, du fait des accidents, des maladies, etc. La longévité maximale observée est donc aussi dépendante du taux de mortalité. S'il est très élevé dès la maturité sexuelle, l'augmentation de la mortalité avec l'âge peut s'en trouver masquée, faisant croire à l'absence de vieillissement.

Les rongeurs, surtout les rats et les souris, sont souvent les modèles expérimentaux pour étudier les problèmes du vieillissement, notamment les souris transgéniques exprimant des gènes particuliers (Vijg *et al.* 1997) ou des souris avec des caractères spécifiques du vieillissement précoce (Shoji *et al.* 1998). De plus des animaux moins complexes sont utilisés : des mutants du vers nématode *Caenorhabditis elegans*, des drosophiles mutantes ou transgéniques, certaines levures et les cultures cellulaires *in vitro*. Ces approches au niveau de l'animal ont permis une compréhension de certains phénomènes biologiques liés au vieillissement.

Ces études ne peuvent pas toujours être extrapolées à l'homme, mais elles permettent d'accéder aux mécanismes inducteurs et obtenir des indications des mécanismes généraux responsables de l'initiation du processus du vieillissement.

Si le vieillissement humain correspond en effet à un processus lent et progressif il doit être distingué des manifestations de maladies. Des auteurs tel que Medawar (1952), Comfort (1979) ou Strehler (1986) ont défini le vieillissement de l'individu comme une augmentation de sa vulnérabilité face aux agressions de toute sorte qui frappe au hasard. La distinction entre maladie et susceptibilité à la maladie est difficile mais essentielle car elle établit une hiérarchie des niveaux de causalité. Il ne s'agirait pas tant d'une cause directe de mortalité que de l'ensemble des processus qui augmentent la vulnérabilité de l'organisme aux causes directes telles que infection, tumeur, etc. Si on suppose que tous les individus d'une espèce donnée partagent certains mécanismes de base du vieillissement, ceux-ci accroissent la vulnérabilité et agiraient donc en amont de toute pathologie. Celle qui se manifestera effectivement sera fonction de la constitution et de l'environnement de chaque organisme particulier. Ces maladies sont souvent qualifiées "d'associées à l'âge". Et si la notion de vieillissement est souvent envisagée dans une dimension biologique, il faut garder en mémoire qu'au niveau humain, le vieillissement est un ensemble de processus, l'homme étant à la fois un être biologique, un être pourvu de raison, dans un contexte social.

Le vieillissement a, alors, un double sens : celui de la sénescence, qui est l'expression du déroulement du temps biologique, et celui d'avancée en âge, qui représente le déroulement du temps chronologique. Ainsi, il existe d'importantes différences morphologiques et fonctionnelles entre sujets de même âge car les paramètres homéostatiques ont une dispersion plus importante avec l'avancé en âge. L'âge biologique ou fonctionnel et l'âge chronologique ne correspondent pas toujours, ils peuvent s'écarter l'un de l'autre du fait des conditions d'existences différentes.

L'âge est une donnée biologique socialement manipulée, variable avec les époques et les sociétés. La vitesse de la sénescence est la résultante du patrimoine génétique et des traces du parcours de vie individuel et collectif. La génétique joue plus ou moins sur la susceptibilité aux maladies, les secondes sont liées, au niveau individuel, au hasard et aux déterminants sociaux (Robert 1996).

Nous constatons alors, que mesurer le vieillissement d'un individu ou d'une population, dans sa dimension biologique, pose de multiples problèmes. Pour l'instant, aucun modèle ou aucune théorie ne peut rendre compte de manière précise et satisfaisante du vieillissement biologique. Sa définition reste trop vague pour permettre la construction d'instruments de mesure de la sénescence. Pour quantifier le vieillissement d'un individu il faudrait disposer d'un marqueur biologique adéquat, d'un paramètre mesurable dont l'évolution mesurerait ainsi le vieillissement de l'individu en question. Pour distinguer ce paramètre physiologique on peut considérer la vulnérabilité due au vieillissement et les maladies qui sont les causes directes de mortalité, et opposer ainsi les processus intrinsèques à l'organisme, et les facteurs plus externes et aléatoires. B. Strehler (1962) en a tiré quatre critères pour reconnaître les changements d'un organisme avec l'âge, qui relèvent du vieillissement : universalité (au sein d'une espèce), caractère intrinsèque, progressivité et nocivité qui est substitué ces dernières années par une perte de la réponse adaptative au stress. Il faudrait donc définir des marqueurs du vieillissement comme des "constantes biologiques" qui évoluent avec l'âge chronologique et répondent aux quatre critères précédents.

## **2. Les théories du vieillissement**

### **2.1. Les théories physiologiques**

Ces théories tentent d'expliquer le vieillissement par des mécanismes biologiques : elles s'insèrent dans l'idée d'un processus physiologique inévitable, d'une usure inéluctable.

La théorie du Wear and Tear est de considérer la sénescence comme un processus d'usure inévitable (Weismann 1892 ; Pearl 1928 ; Comfort 1979). Les tissus et les organes des personnes âgées subissent une détérioration et l'ensemble de ces altérations s'accumuleraient suite à une "usure" (Wear and Tear) qui est la responsable "universelle" du vieillissement. Toutes les composantes cellulaires subissent les effets délétères de l'âge et leurs fonctions biologiques se détériorent.

Weismann (1892) est parti du constat que "les cellules qui forment la base vivante des tissus s'usent par suite de leur activité et de leur fonctionnement". Les cellules d'un tissu sont constamment renouvelées, mais les tissus finissent par s'user car "l'aptitude des cellules du corps à se multiplier par division cellulaire est non pas infinie mais limitée". L'hypothèse de



Weismann le conduit à voir « la mort normale de l'organisme [comme] la fin fixée d'avance, parce qu'elle est héréditaire, du processus de multiplication cellulaire qui a débuté par la segmentation » de l'œuf fécondé. La mort est donc l'étape finale du programme de vie, en cela Weismann introduit une notion importante de programmation de la mort réfutée plus tard par les partisans des théories évolutionnistes.

Les études des altérations du processus d'usure peuvent s'appliquer au niveau des systèmes : le système immunitaire pourrait jouer un rôle majeur dans le vieillissement, le déclin des défenses immunitaires chez les personnes âgées se manifeste par des altérations de la production des cytokines, de la résistance aux parasites et aux tumeurs et de l'induction de l'auto-immunité (Riancho *et al.* 1994 ; Thoman et Weigle 1989 ; Hartwig 1994).

Le vieillissement des tissus et des organes est également étudié comme l'atrophie musculaire, l'altération du parenchyme ou l'accumulation de lipofuscine, et entraîne une diminution des fonctions biologiques (Holliday 1995).

Le cerveau reste un élément d'étude important car il présente de nombreuses altérations lors du vieillissement. Les maladies dégénératives sont très souvent observées chez les personnes âgées, notamment la maladie d'Alzheimer dont l'incidence augmente avec l'âge (Berr 1997).

Au niveau cellulaire, les modifications protéiniques s'accumulent avec l'âge ("catastrophe theory" de Orgel 1963 ; Holliday 1995). L'accumulation de ces protéines modifiées et l'altération des mécanismes d'élimination de ces protéines aboutissent à une diminution progressive des fonctions des organes et mènent au vieillissement (Robert 1996).

Les lipides subissent aussi une oxydation, la peroxydation, en fonction de l'âge (Laganier et Yu 1993) et contribuent à l'apparition de pathologies telles que la rigidification des parois artérielles ou les altérations du système nerveux central.

L'ensemble de ces études semble soutenir cette théorie d'un vieillissement physiologique inévitable, et où tous les composants cellulaires subissent les effets délétères de l'âge.

Cette approche peut paraître réductionniste car elle s'intéresse aux effets d'un seul mécanisme, indépendamment du mode de reproduction. A l'échelle des espèces, la mortalité spécifique à l'âge peut ne pas augmenter pour certaines d'entre elles et indique que le vieillissement n'est pas une conséquence inévitable du Wear and Tear (Kirkwood 1985).

La théorie du Taux de Vie s'est construite à partir des travaux de Max Rubner en 1908 qui a découvert la relation entre le taux métabolique, la taille du corps et la longévité. Il a constaté, en étudiant cinq espèces de mammifères de tailles différentes, une consommation identique d'une quantité totale de calories par unité de poids, au cours de leurs vies, quelle que soit la

durée de vie maximale. La constante pour les mammifères est de 200 kcal / gramme de tissu (sauf pour l'homme : 800 kcal / g de tissu). Une autre observation présentant une relative constance, à travers les espèces de mammifères, est le nombre de battements de cœur au cours de la vie. Et l'on sait que la fréquence des battements cardiaques est liée à la consommation énergétique. Il y aurait donc un capital énergétique fixe et invariable chez les mammifères, et les organismes adultes consommeraient la même quantité d'énergie par unité de masse pendant leur durée de vie, appelé potentiel d'énergie vitale.

La vitesse du métabolisme de l'individu conditionnerait l'utilisation de ce capital métabolique et expliquerait la différence entre les espèces, vitesse appelée : taux métabolique spécifique.

On poserait l'équation :

$$\text{Taux métabolique spécifique} = \frac{\text{Potentiel d'énergie vitale}}{\text{Durée de vie maximale}}$$

Cette équation résume la théorie du Taux de Vie posée par Pearl (1928). Elle indique que la durée de vie maximale dans une espèce donnée est inversement proportionnelle au taux métabolique spécifique et elle prédit que la longévité de l'espèce considérée doit augmenter si le taux métabolique spécifique diminue.

Comment vérifier cette hypothèse ?

Soit en diminuant la température corporelle, car il existe une relation étroite entre température et longévité. En 1917, Loeb et Northrop ont placé des drosophiles dans un environnement froid, ils ont augmenté leur longévité de 2,5 fois. Ingle *et al.* (1937) ont montré que des puces aquatiques avaient des pulsations cardiaques ralenties à des températures froides et un allongement de la durée de vie. Pour des températures plus élevées, les pulsations cardiaques sont plus rapides et leurs vies s'accourcent.

Soit en diminuant l'apport calorique quotidien chez les homéothermes. Mac Cay *et al.* (1935) ont démontré que la restriction calorique chez des rats de laboratoires ralentit le métabolisme et accroît leur longévité d'un tiers. Ce vieillissement ralenti s'expliquerait par la diminution de combustibles nécessaires au métabolisme, et donc une dépense énergétique moindre.

Ces résultats sont proches de ceux de Rubner (1908) dans le sens où, si nous utilisons cette énergie de façon ralentie, le taux du vieillissement est bas. Par contre, si l'énergie est consommée rapidement, le vieillissement est accéléré.

Pearl (1928) a postulé que la dépense énergétique est la clef du vieillissement, suggérant que la durée de vie varie inversement au taux de vie. La vitesse du métabolisme d'un organisme,

son taux de vie, conditionnerait donc son vieillissement. Ainsi, chaque cellule, quelle que soit l'espèce, aurait un "capital métabolique" identique et le vieillissement surviendrait lors de la consommation de ce capital. De nombreuses constatations soutiennent cette théorie : les grands mammifères vivent plus longtemps et leur taux métabolique est plus lent que pour les petits mammifères. Au cours de l'hibernation, il est possible de maintenir les animaux à basse température et de rallonger leur durée de vie. Mais il existe des contre-exemples : les oiseaux ont un métabolisme basal plus intense, et consomment trois fois plus d'énergie au cours de leur vie que les mammifères. Les chauves souris tropicales, qui n'hibernent pas et semblent consommer annuellement dix fois plus d'énergie que leurs cousines des régions tempérées, vivent néanmoins aussi longtemps.

La théorie des Radicaux Libres (Harman 1972) est une explication mécanistique qui soutient cette idée de dépense énergétique. Elle permet de comprendre les mécanismes de métabolisation de l'énergie dans les cellules, au sein de la théorie du taux de vie fondée sur la corrélation inverse entre longévité et combustion tissulaire. Harman a constaté que 90 % de l'énergie consommée par les mammifères était produite dans les mitochondries. En 1972 il établit sa théorie sur le lien entre mitochondries et longévité : une horloge biologique ? à partir d'un développement de sa théorie basée sur les radicaux libres et la chimie des radiations (Harman 1956 ; 1972). Ces arguments sont toujours valides, la synthèse d'ATP au sein des mitochondries met en jeu des transferts d'électrons par le biais de la chaîne de phosphorylation oxydative. Au cours du transfert, une fuite d'électron peut avoir lieu créant de nouvelles espèces chimiques : les radicaux libres. Ces molécules sont très instables et réactives et réagissent avec leur environnement proche, initiant des lésions cellulaires (sur les membranes lipidiques, les protéines, l'ADN et les mitochondries) et enclenchant des processus du vieillissement. Lorsqu'ils sont produits en excès (production > élimination), les radicaux libres altèrent les cellules, les tissus et les organes. De plus, une perte progressive de moyen de défense contre les radicaux libres de l'oxygène est observée en fonction de l'âge. Les lésions radicalaires présentes chez les sujets âgés sont alors de plus en plus importantes. Elles mènent à la perte de la fonction des protéines, des lipides et contribuent à la diminution de la complexité cellulaire.

La théorie des radicaux libres, plus spécifiquement appliquée dans la mitochondrie, s'insère bien dans la théorie du taux de vie, incluant la restriction calorique, la diminution du taux métabolique et la relation inverse qui existe entre la longévité et le taux métabolique par unité de masse. (Sacher 1977; Masoro *et al.* 1982; Mac Carter et Mac Gee 1989; Mac Carter et Palmer 1992). La théorie du taux de vie met en jeu des mécanismes tels que la formation de sous-produits lors du métabolisme (notamment les radicaux libres), le taux métabolique (vitesse et température), la balance énergétique et la nutrition. De nombreuses recherches sont en cours pour démontrer sa validité. Des théories comme les radicaux libres et la glycation (Harman 1956, 1972; Cerami 1985) soutiennent cette réflexion ainsi que la notion de "combustibles" utilisés qui peuvent être impliqués dans le vieillissement (Masoro et Mac Carter 1991) mais cette réflexion est orientée différemment dans les théories évolutionnistes.

## **2.2. Les théories évolutionnistes**

A l'état sauvage, dans la plupart des espèces, un individu a très peu de chance de mourir sous l'effet du vieillissement, il mourra beaucoup plus souvent sous l'effet de la prédation. Le vieillissement, comme processus d'élimination des individus les plus âgés dans la population, semble paradoxal dans cette perspective. Le vieillissement apparaît le plus souvent dans les contextes de domestication ou de civilisation et a peu de chance de se rencontrer à l'état naturel.

Les études qui s'intéressent aux mécanismes de l'évolution des espèces résolvent des paradoxes, tel que la limitation de la longévité sans que mort et vieillissement représentent des adaptations avantageuses ni pour les individus, ni pour les espèces.

Revenons sur les travaux de Weismann (1892 ; Kirkwood et Cremer 1982) et leur cadre théorique : la théorie darwinienne de l'évolution des espèces. C'est dans ce cadre que Weismann veut expliquer les caractères héréditaires tel que la longévité ou le vieillissement dans leurs significations biologiques. La première voie explorée par celui-ci est celle de comprendre la mort naturelle comme un phénomène d'adaptation en terme utilitaire, la disparition des plus âgés étant utile au niveau de la population ou de l'espèce, si elle ne peut l'être au niveau de l'individu.

Cette adaptation, au niveau de l'individu, met en place une nécessité de reproduction et l'opportunité de la mort, "car les individus usés n'ont aucune valeur pour l'espèce, ils lui sont même nuisibles, en prenant la place de ceux qui sont sains".

Cette réflexion a été dénoncée par de nombreux auteurs pour sa circularité. En effet, comment expliquer un processus qui éliminerait les individus âgés ? Les "jeunes" sont de toute façon en meilleure condition et prendront la place des "âgés", qui sont désavantagés devant toute compétition ou adaptation de leurs congénères, sans la nécessité d'élaborer un mécanisme d'élimination. Dans ces travaux postérieurs, Weismann suivit de nouvelles orientations, mais sans renier ses idées initiales, ce qui a engendré de nombreuses confusions sur ses idées (Kirkwood et Cremer, 1982).

Il posa une distinction entre les cellules germinale et somatique. Pour assurer la succession des générations, il est nécessaire de maintenir "l'immortalité" des cellules reproductrices, ce qui implique une aptitude à la division cellulaire illimitée. Cette immortalité est potentielle, car aucun individu n'est assuré d'arriver à l'âge de reproduction, et partielle car il y a brassage de la lignée maternelle et paternelle, mais elle reste indispensable à la conservation de l'espèce et de la vie. Le reste du corps : le soma n'a pas besoin d'être éternel, il pourrait en principe disparaître dès qu'il a transmis ces cellules reproductrices pour produire au moins un descendant.

En 1891, Weismann développa, dans sa théorie de l'évolution régressive, un nouveau point de vue sur une élimination des vieux au profit de l'espèce. "Toute fonction et tout organe disparaissent dès qu'ils deviennent sans valeur pour la préservation de l'espèce" (c'est-à-dire sa valeur reproductive ; Kirkwood et Cremer, 1982).

Cette valeur est illustrée par exemple avec les animaux cavernicoles dont la vision est faible, et dont les organes de la vue ont régressé. La perte de fonction traduit en fait le relâchement de la sélection naturelle. La vision, ou l'immortalité des individus, devient inutile en tant que fonction, et la valeur sélective de cette fonction devient nulle. Ainsi, dans l'idée de Weismann, la perte de l'immortalité permettrait de libérer des ressources potentielles. Les cellules somatiques affranchies d'une contrainte de survie débuteraient de nouvelles perspectives, incluant l'apparition de la mort naturelle. La théorie de l'évolution pourrait expliquer la mort naturelle sans que celle-ci apporte un avantage direct.

Dans la lignée de ce raisonnement, mais en des termes de génétique moderne, les théories de Medawar (1952) et de Williams (1957) apporte une nouvelle notion de "valeur reproductive" au sein des espèces.

La sélection naturelle est très efficace lorsque l'organisme accède à la maturité car le potentiel reproductif d'un individu adulte est à préserver. L'efficacité de la sélection naturelle est moindre avant et après cet âge, ce qui expliquerait que le taux de mortalité diminue avec l'âge jusqu'à la maturité sexuelle, puis augmenterait ensuite. Le lien entre reproduction et vieillissement tiendrait au fait du relâchement de la sélection naturelle à la maturité reproductive. Le vieillissement ne serait pas programmé par l'évolution, mais plutôt une conséquence secondaire des processus évolutifs : c'est la théorie de l'accumulation des mutations délétères à des âges avancés de Medawar (1952).

Ces théories instaurent un lien entre croissance et longévité. Williams (1957) a constaté que la croissance indéfinie des adultes est liée à l'augmentation continue de leur fécondité, et augmente donc leur valeur reproductive avec l'âge. La sélection naturelle est toujours "active" : les processus de vieillissement n'apparaissent pas ou sont imperceptibles (sénescence négligeable). Mais le lien entre croissance et longévité ne serait qu'une relation d'opportunité. La limitation de la longévité, par le vieillissement, aurait pu apparaître au cours de l'évolution, dans les espèces à croissance limitée parce que leur fécondité n'augmente pas avec l'âge (sénescence progressive).

En ce qui concerne la sénescence rapide, comme par exemple les saumons, dont les individus achèvent leur développement par un cycle reproductif unique et meurent aussitôt, la théorie évolutionniste explique que la sélection naturelle a favorisé les individus les plus efficaces lors de leur première tentative, car les membres de ces espèces n'avaient qu'une très faible chance de se reproduire une seconde fois. Ce mode de reproduction serait un moyen d'optimiser le succès reproductif individuel.

Williams (1957) a avancé une hypothèse supplémentaire pour mieux rendre compte de l'inefficacité de la sélection naturelle envers les mutations qui ont un effet sur les individus âgés : la pléiotropie antagoniste. Certains gènes peuvent avoir un effet bénéfique sur un individu jeune et conférer un effet délétère ou défavorable sur l'individu âgé. L'exemple proposé par Williams à l'époque était celui d'un gène impliqué dans la fixation du calcium. Une mutation entraînant une fixation plus efficace serait favorable en période de croissance lors de la formation du squelette osseux, mais serait néfaste plus tardivement à l'organisme avec l'avancé en âge, en accélérant par exemple la calcification des tissus artériels.

Il existe une probabilité à ce que l'individu devienne âgé, mais la sélection naturelle pourra retenir ce gène favorable à l'individu jeune.

Kirkwood a développé et précisé ces idées dans une thématique "Weismannienne" de la théorie du soma jetable (Kirkwood 1977 ; Kirkwood et Holliday 1979). Il souligne que la

seule finalité biologique de l'organisme est d'assurer la continuité de la lignée germinale. L'efficacité du "succès reproductif" est le principal critère de la sélection naturelle. Il installe un arbitrage permanent dans l'organisme entre les exigences de la survie et celle de la reproduction.

L'organisme, tout le long de son cycle de vie, est sans cesse confronté à faire un choix : doit-il affecter ses ressources en énergie et en matières premières à sa propre survie ou bien à la survie de sa propre lignée germinale ? Ce choix est illustré par les expériences de restriction calorique : en diminuant l'apport calorique, les animaux sont moins fertiles voire stériles mais augmentent leur longévité. Dans certains cas, la diminution de la fertilité est compensée par des procréations jusqu'aux grands âges.

Les théories évolutionnistes estiment donc qu'il n'y a pas de programmation active et délibérée du vieillissement et de la mort naturelle des organismes pluricellulaires. Ces processus sont des effets secondaires inéluctables du mode d'action de la sélection naturelle. Elles fondent une alternative de type passif/actif.

La sélection naturelle serait seulement passive : c'est l'hypothèse du fardeau mutationnel. Elle s'avère impuissante face aux mutations délétères des individus âgés car leurs effets ont lieu en marge de la période "protégée" de celle-ci. Dans cette perspective, sénescence et mort sont des échecs inévitables de la sélection naturelle, d'autant plus que les effets sont tardifs (s'y intègre la théorie de Medawar 1952).

La sélection naturelle est active, mais de manière indirecte : c'est l'hypothèse de l'optimisation du cycle de vie (Williams 1957 ; Kirkwood 1977). Elle confère un avantage sélectif précoce même si c'est au détriment de la longévité : la longévité dépend en partie des gènes, et certaines combinaisons de gènes préexistants dans une population hétérogène confèrent une plus grande longévité. L'accroissement de la longévité semble se faire au dépend de la reproduction.

Les deux conceptions sont recevables et explicatives sans que l'on puisse trancher entre elles.

De nombreuses recherches sont élaborées à partir de ces théories pour mettre en évidence les mécanismes biologiques fondamentaux du vieillissement. Les approches expérimentales incluent les études de prolifération in vitro et de sénescence proliférative sur les cellules mitotiques pour établir des relations entre le vieillissement cellulaire et celui de l'organisme. L'étude des télomères a mis en évidence leurs rôles dans la sénescence cellulaire. Il a été démontré que des gènes (appelés anti-oncogènes) sont exprimés dans la sénescence cellulaire

et les cancers, ce qui impliquerait une symétrie des mécanismes. Les facteurs héréditaires de longévité chez l'homme sont examinés ainsi que l'apoptose (pour une revue globale des voies étudiées dans un axe évolutionniste voir Klarsfeld et Revah, 2000).

Le vieillissement et le métabolisme énergétique présentent des intérêts dans la perspective évolutionniste. Notamment la théorie des radicaux libres de Harman reliée aux mitochondries (1972). La diminution de la synthèse d'ATP dans les cellules post-mitotiques entraînent des effets beaucoup plus importants. Il y a une augmentation de la division des mitochondries pour compenser la perte d'énergie, mais ces divisions augmentent le nombre de mitochondries déficientes. Donc, dans les cellules post-mitotiques la sélection amplifie préférentiellement les génomes mitochondriaux porteurs de mutations délétères. L'oxygène, nécessaire à la vie, porte aussi le vieillissement au travers des produits de sa métabolisation. Il y a une augmentation des dommages avec l'âge dus aux radicaux libres, et l'augmentation des dommages est exponentielle comme le taux de mortalité. La théorie des radicaux libres liant la longévité offre une vision nouvelle par rapport à la théorie du taux de vie de Pearl : la consommation énergétique n'est pas le facteur déterminant de la longévité, ce sont les produits secondaires, les radicaux libres, qui l'endommagent. La longévité dépendrait du taux de production associé de radicaux libres, ou encore, de l'efficacité des systèmes d'élimination.



## **CHAPITRE 1 : LA MITOCHONDRIE**

### **Introduction : La conversion de l'énergie**

Les mitochondries sont des organites présents dans toutes les cellules eucaryotes et peuvent être représentées en plusieurs centaines dans une cellule humaine typique. Elles sont essentielles au fonctionnement cellulaire car elles effectuent la plupart des oxydations cellulaires et produisent des molécules d'ATP (Adénosine triphosphate) nécessaires au fonctionnement énergétique des cellules par l'intermédiaire de nombreuses enzymes de conversion et par la chaîne de phosphorylation oxydative.

Les mitochondries sont des organites indépendants mais sont sous un double contrôle génétique. La majorité des protéines mitochondriales sont codées depuis le génome nucléaire, l'autre partie par l'ADN mitochondrial. En effet, l'hypothèse généralement admise est que les organites qui convertissent l'énergie des cellules eucaryotes proviennent de procaryotes primitifs incorporés il y a environ 1,9 milliards d'années. Ceci expliquerait pourquoi les mitochondries (ainsi que les chloroplastes dans le règne végétal) possèdent leur propre ADN. Cependant la relation symbiotique développée entre les deux types cellulaires est devenue largement dépendante. Ainsi les mitochondries ont perdu une grande partie de leur génome et sont devenues dépendantes des protéines codées par les gènes nucléaires, synthétisées dans le cytosol et importées dans les organites. Les cellules hôtes sont-elles aussi devenues dépendantes des mitochondries en ce qui concerne la production d'ATP nécessaire aux biosynthèses cellulaires, aux pompes des ions et des solutés.

La molécule d'ADN mitochondrial (ADNmt) humaine est représentée par un double brin ADN circulaire de 16569 pb (paire de bases) qui code treize polypeptides de la chaîne de phosphorylation oxydative, deux ARN ribosomiques et vingt deux ARN de transfert. Le taux de mutation est plus élevé que celui des gènes nucléaires, mais la plupart des mutations ADNmt sont des polymorphismes neutres qui sont accumulés séquentiellement dans les lignées maternelles. Ces polymorphismes ont créé des groupes d'haplotypes ADNmt ou haplogroupes (voir Crubézy *et al.* 2002 p13). La variation de séquence ADNmt peut être utilisée dans les constructions phylogénétiques qui permettraient d'expliquer les relations d'évolution entre les séquences individuelles.

## 1. La mitochondrie

### 1.1. Structure

Une cellule humaine typique comporte plusieurs centaines de mitochondries (jusqu'à 2000 pour les cellules hépatiques) dont elles sont dépendantes pour leurs formations énergétiques aérobie. La mitochondrie est caractérisée par sa double membrane qui joue un rôle important dans la conversion de l'énergie. Chacune de ses membranes est spécialisée et définit deux compartiments séparés, l'espace matriciel et l'espace inter membranaire (figure 2).

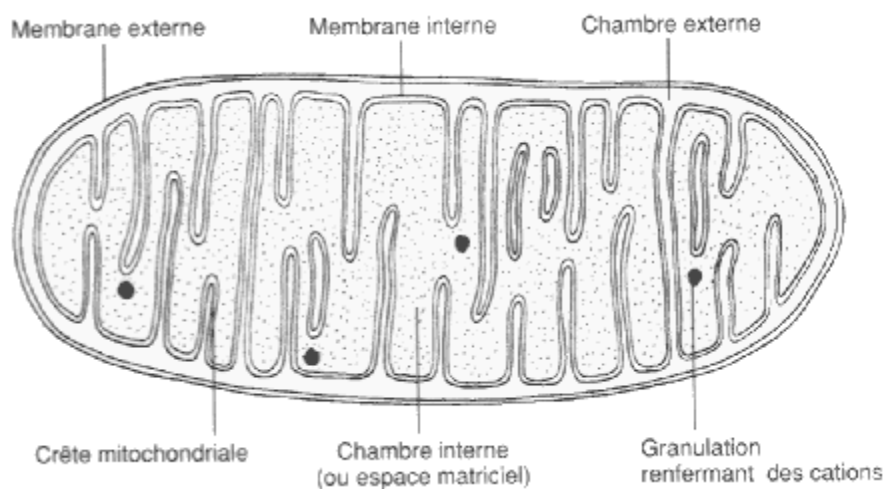


Figure 2 : Organisation générale d'une mitochondrie.

*Quatre régions peuvent être visualisées : les membranes externe et interne, la matrice (espace matriciel) et l'espace inter-membranaire.*

*(Sur <http://www.creaturesfrance.free.fr>)*

La membrane externe contient de nombreuses copies d'une protéine de transport appelée porine et est donc perméable aux molécules  $\leq$  à 10 000 daltons, tandis que la membrane interne est imperméable aux ions grâce à un phospholipide double appelé cardiolipine et est repliée en de nombreuses crêtes qui augmentent sa surface totale. Elle contient des protéines réparties en trois fonctions : les protéines réalisant les réactions d'oxydation dans la chaîne respiratoire, un complexe enzymatique, l'ATP synthétase, qui fabrique l'ATP dans la matrice et des protéines de transport spécifiques. C'est à partir de cette membrane imperméable aux ions que peut s'établir le gradient électrochimique nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthétase. L'espace inter membranaire contient plusieurs enzymes qui utilisent l'ATP pour phosphoryler d'autres nucléotides. La matrice est un mélange de nombreuses enzymes, incluant celles nécessaires à l'oxydation du pyruvate et des acides gras et au cycle de Krebs.

Elle contient également plusieurs copies de l'ADNmt, des ribosomes mitochondriaux particuliers, des ARN de transfert et des enzymes dédiées à l'expression des gènes mitochondriaux.

Les mitochondries sont des organites très mobiles et sont souvent associées aux microtubules lors de leurs déplacements dans le cytoplasme. Dans certains types cellulaires, elles restent immobilisées sur une position et fournissent directement de l'ATP à un site de consommation : par exemple, entre des myofibrilles adjacentes dans une cellule du muscle cardiaque, ou enroulées autour du flagelle du spermatozoïde (figure 3).

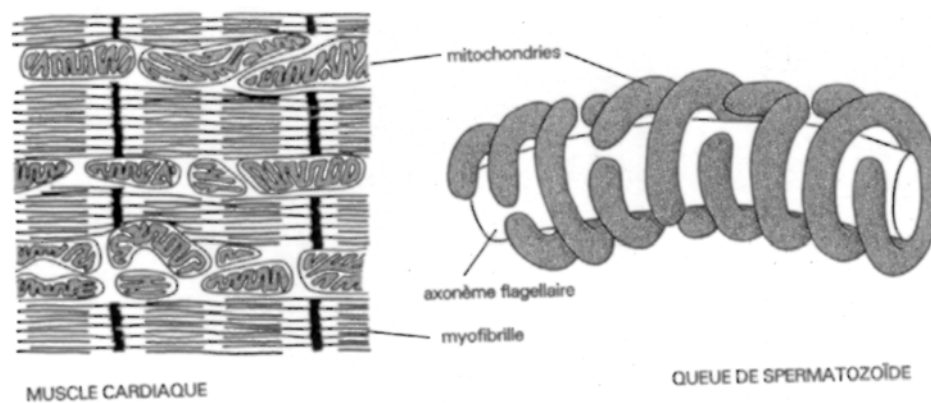


Figure 3 : Localisation des mitochondries à proximité des sites à forte consommation d'ATP.

*Ici dans le muscle cardiaque et dans une queue de spermatozoïde. Selon Alberts et al. 1994. 2<sup>e</sup> éd Médecine Flammarion.*

## **1.2. La production d'énergie**

Le métabolisme oxydatif des mitochondries est dépendant principalement des acides gras et du pyruvate produit dans le cytosol et qui sont sélectivement transportés dans la matrice mitochondriale. A partir de là ils seront scindés en Acetyl CoA, ces molécules seront incorporées dans le cycle de Krebs, permettant la production de NADH et  $FadH_2$ . Ces composants seront les donneurs d'électrons de la chaîne respiratoire enchâssée dans la membrane interne. La chaîne respiratoire crée un gradient électrochimique de protons transmembranaires qui permet la synthèse d'ATP via l'ATP synthétase. L'ensemble de ces réactions permet un échange ATP-ADP entre la mitochondrie et le cytosol et un maintien du pool d'ATP de la cellule à saturation.

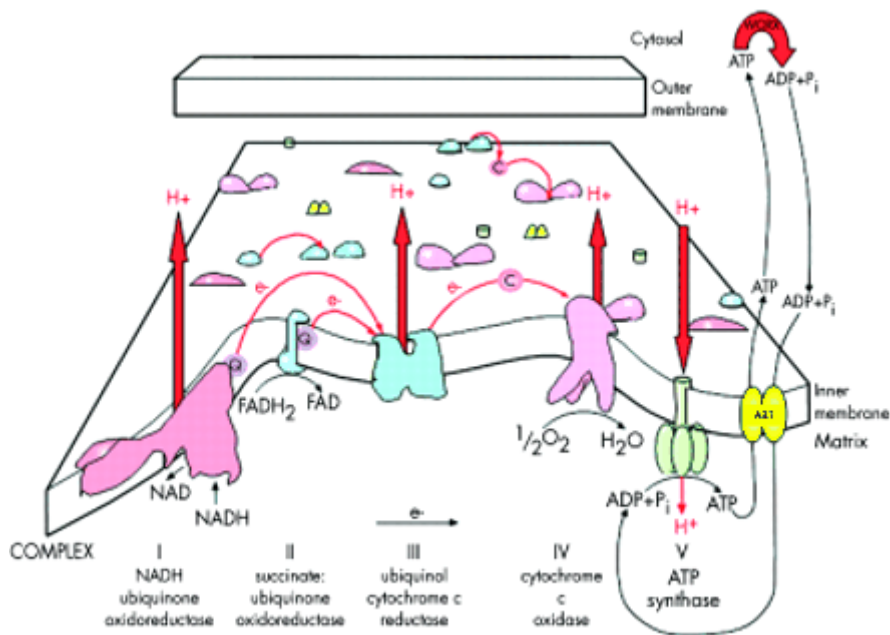


Figure 4 : Schéma représentant les complexes constituant la chaîne respiratoire enchâssée dans la membrane interne. Selon Chinnery et Schon 2003 *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74 : 1188-1199.

Le processus d'oxydation effectué par la chaîne respiratoire commence avec des cofacteurs réduits qui sont donneurs d'électrons (NADH et FADH<sub>2</sub>). Les ions hydrure de ces molécules sont convertis en un proton et deux électrons. Les transporteurs d'électrons sont constitués de nombreuses protéines regroupées en de grands complexes respiratoires (figure 4). Chaque complexe a une plus grande affinité pour les électrons que le précédent et les électrons passent en cascade d'un complexe à l'autre. Ainsi, les électrons issus de NADH sont transférés au complexe I (NADH deshydrogénase), et ceux du FADH<sub>2</sub> au complexe II. Les électrons sont transmis suivant le gradient électrochimique du coenzyme Q10 (CoQ) au complexe III incluant le cytochrome c et jusqu'au complexe IV (cytochrome c oxydase, COX) et sont finalement transférés à l'oxygène pour former de l'eau. Les protons H<sup>+</sup> sont relargués dans l'espace inter-membranaire. Ce gradient de protons crée un potentiel membranaire qui permet d'activer l'ATP synthétase pour synthétiser de l'ATP à partir de ADP (adénosine diphosphate) et un phosphate inorganique. Une protéine de transport membranaire (ANT) permettra l'échange entre l'ADP et l'ATP à travers la membrane mitochondriale.

## **2. Le génome mitochondrial**

Généralement, les mitochondries présentes dans les cellules se divisent pendant toute l'interphase, sans synchronisation avec le cycle cellulaire ou avec les autres organites. De même, la réplication de l'ADNmt n'est pas concomitante à la réplication de l'ADN nucléaire lors de la phase S, mais a lieu durant tout le cycle cellulaire. Néanmoins, dans des conditions stables, le nombre de molécules ADNmt double à chaque cycle cellulaire afin de conserver une quantité constante de molécules. Mais le nombre d'organites par cellule peut être régulé selon les besoins énergétiques du tissu : le nombre de mitochondries peut augmenter de cinq à dix fois si un muscle squelettique au repos est stimulé de façon répétitive pour se contracter sur une période prolongée.

### **2.1. L'organisation du génome**

Le génome mitochondrial humain est une molécule ADN double brin circulaire de 16569pb (Anderson *et al.* 1981) localisée dans la matrice cellulaire où elles pourraient être liées à la membrane interne, présentes en plusieurs copies dans une mitochondrie et par centaines de copies dans une cellule.

Le brin H est un brin « lourd » (H :Heavy à cause de sa densité en CsCl (Chlorure de Cesium)), riche en guanine et le brin L est un brin léger (L :Light) riche en cytosine.

La molécule d'ADN mitochondrial (ADNmt) humaine code treize polypeptides de la chaîne de phosphorylation oxydante, deux ARN ribosomiques et vingt-deux ARN de transfert (figure 5).

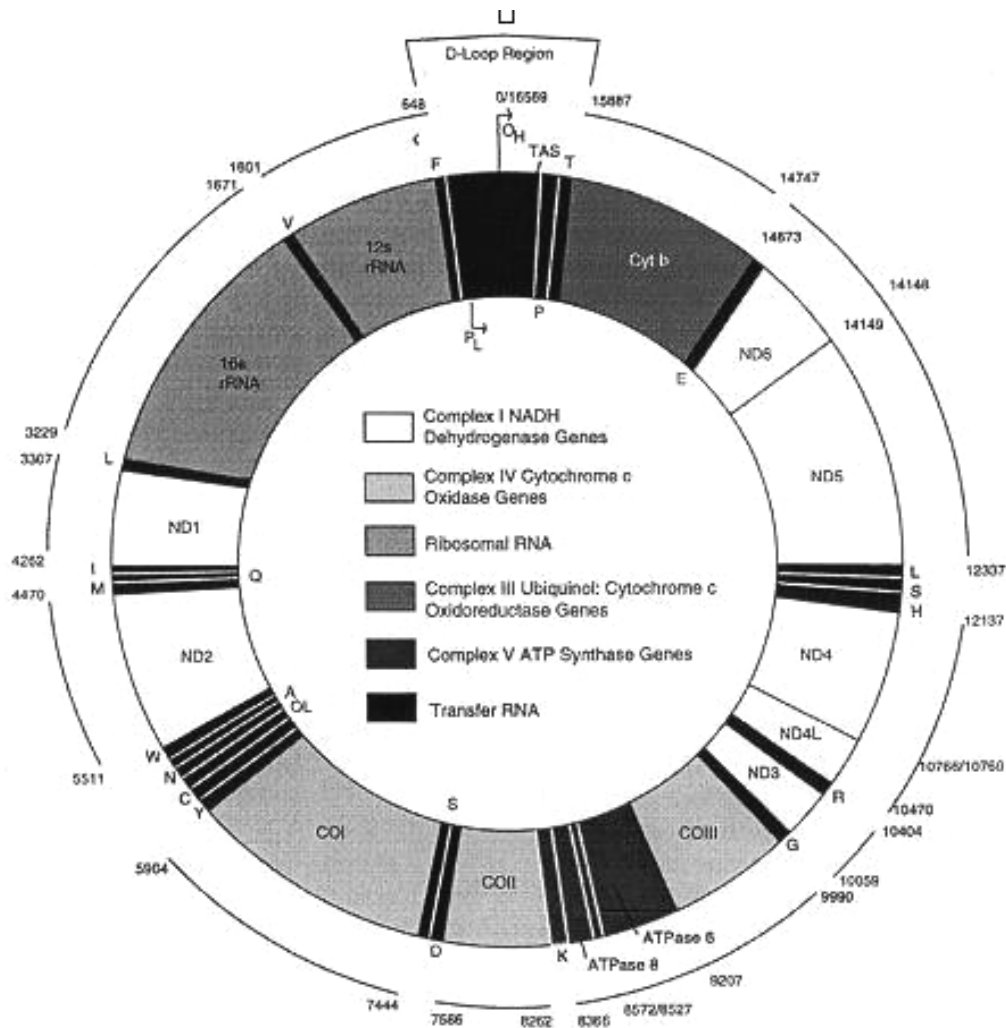


Figure 5 : Cartographie du génome mitochondrial humain. Selon Berdanier et Everts 2001 *Mut. Res.* 169-184.

Le transfert des séquences ADNmt au système génomique nucléaire semble être un processus continu (Wallace 1997), la présence d’une centaine de séquences ADNmt ou pseudogènes dans l’ADN nucléaire est assez bien documentée (Tsuzuki *et al.* 1983). De plus, le code génétique ADNmt humain est différent que celui utilisé dans le nucléaire, de sorte que 4 des 64 codons ont des “significations” différentes en séquences d’acides aminés. De ce fait, les pseudogènes ADNmt ne sont pas “lisibles” par le système nucléaire (Wallace 1982).

Une autre particularité est l’absence d’introns dans l’ADNmt humain, toutes les séquences codantes sont contiguës (Anderson *et al.* 1981 ; Wallace *et al.* 1992), il reste donc très peu de place pour les séquences ADN de régulation. Le seul segment non codant est la région de déplacement : D-Loop de 1121 pb contenant l’origine de réplication du brin H et les promoteurs de transcription des brins H et L.

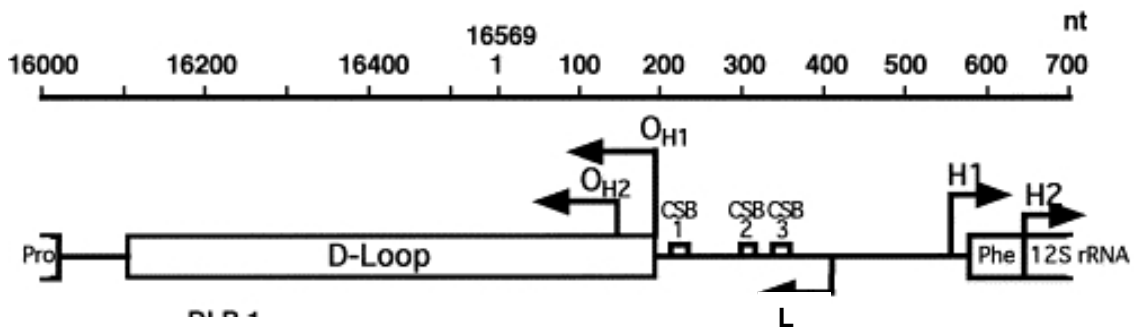


Figure 6 : Région de contrôle de l'ADNmt humain.

*OH1 et OH2 : origines primaire et secondaire de la synthèse du brin H. H1, H2 et L : promoteurs pour la transcription ARN de la totalité des brins H et L. CSB1, 2 et 3 : blocs de séquence conservés. Selon Michikawa et al. 1999 Science 286 : 774-779.*

L'ADNmt est répliqué à partir de deux origines (figure 6). La réplication ADN est initiée à l'origine H (OH) en utilisant une amorce ARN générée à partir d'un transcrite du brin L. La synthèse du brin H a lieu deux à trois fois autour de la molécule ADNmt, déplaçant le brin parental jusqu'à atteindre l'origine du brin L (OL), situé dans un groupe de cinq gènes d'ARN de transfert. Une fois présentée par le brin H, l'origine L forme une structure en boucle et la synthèse du brin L est initiée et continue le long du brin H matrice. Par conséquent, la réplication ADNmt est bidirectionnelle mais asynchrone (Clayton 1982).

La transcription est initiée à partir des deux promoteurs PL et PH dans la D-Loop. La transcription a lieu à partir des deux promoteurs correspondants, à la même vitesse et produit deux molécules géantes différentes (des ARN polycistroniques). La chaîne H est remaniée par coupure nucléasique et donne deux ARN ribosomiques, la majorité des ARN de transfert et environ 10 ARN contenant du poly A. Au contraire la chaîne L produit 8 ARN de transfert et un petit ARN contenant du poly A. Les 90% restants du transcrite sont dégradés, ils ne semblent pas contenir d'information utile. L'ARN poly A sont les ARN messagers mitochondriaux qui ne possèdent pas de chapeau sur leur extrémité 5' mais se terminent par une queue poly A en 3' ajoutée par une polymérase poly A mitochondriale (Attardi *et al.* 1982 ; Wallace 1993).

## 2.2. Les caractères spécifiques

La localisation cytoplasmique des mitochondries et le nombre de copies élevées de molécules ADNmt contribuent à des caractères uniques de la génétique mitochondriale.

Premièrement, l'ADNmt est transmis maternellement. Dans les ovocytes humains on trouve entre 50 000 et 100 000 molécules d'ADNmt. Après la fécondation, seules les mitochondries apportées par l'ovocyte sont conservées et serviront de « réserve » initiale pour le nouvel individu. Ces mitochondries d'origine maternelle, initialement dispersées dans le cytoplasme sont redistribuées dans le zygote, autour des deux pronucleis. Il ne semble pas avoir de réplication de l'ADNmt avant l'implantation de l'embryon (May-Panloup *et al.* 2004). La transmission uniparentale de l'ADNmt, classiquement admise, implique une destruction totale de l'ADNmt d'origine spermatique dans l'œuf fécondé. L'élimination spécifique des mitochondries paternelles dans l'ovocyte et l'absence de réplication de l'ADNmt au sein de l'ovocyte fécondé sont les mécanismes qui permettent d'expliquer l'absence de transmission d'ADNmt paternel. La reconnaissance et la destruction des mitochondries paternelles reposent sur le processus d'ubiquitinylation d'une protéine membranaire mitochondriale (la prohibitine), commencé au cours de la spermatogenèse. Lors de la décondensation du spermatozoïde dans le cytoplasme ovocytaire, les sites ubiquitinylés des membranes mitochondriales paternelles seraient alors démasqués et pris pour cibles par les enzymes protéolytiques du cytoplasme ovocytaire. Cette destruction se produirait au plus tard lors de la troisième division de segmentation de l'embryon (Manfredi *et al.* 1997).

Deuxièmement, les gènes mitochondriaux ont un taux de mutation plus élevé que les gènes nucléaires. Les mitochondries semblent avoir perdu un système de réparation ADN efficace. De plus les protéines de protection telles que les histones ont disparu et l'ADN mitochondrial est physiquement associé avec la membrane mitochondriale interne, où les radicaux oxygènes sont générés à partir des sous-produits de la chaîne de phosphorylation oxydative. De plus, le métabolisme mitochondrial anormal pourrait accélérer le taux de mutation ADNmt (Lightowlers *et al.* 1997). Ces caractères spécifiques sont probablement la cause de 10 à 17 fois plus d'accumulation de polymorphismes dans l'ADNmt par rapport à l'ADN nucléaire (Wallace *et al.* 1997). Les séquences variables dans la D-Loop évoluent beaucoup plus rapidement que dans les régions codantes (Howell *et al.* 1996).



Troisièmement, les mitochondries subissent la ségrégation répllicative lors des divisions cellulaires méiotique ou mitotique. Chaque cellule contient une centaine de mitochondries, chacune contenant 2 à 10 copies de molécules ADNmt. Normalement toutes ces molécules sont identiques : l'homoplasme. A chaque division cellulaire, les mitochondries et leurs génomes sont distribués de façon aléatoire aux cellules filles, un processus appelé la ségrégation répllicative. Quand une mutation apparaît dans l'ADNmt, elle crée un mélange intracellulaire de molécules mutantes et normales : l'hétéroplasme.

Au cours de l'ovogenèse, le cytoplasme de l'ovocyte subit une croissance phénoménale et son contingent de mitochondries évolue beaucoup : il subit d'abord une restriction puis une intense amplification (figure 7). Les ovogonies ne contiennent qu'une dizaine de copies ADNmt alors que les ovocytes mûrs en renferment jusqu'à plusieurs dizaines de milliers. Il se produit une expansion clonale à partir d'un très petit nombre d'ADNmt sélectionnés, ce qui permet à l'ovocyte de transmettre au nouvel individu une population homoplasmique d'ADNmt. Ceci est attribué à un goulot d'étranglement génétique (Poulton *et al.* 1998). Ce goulot génétique permet normalement d'éliminer les rares formes mutées, sauf dans le cas où la sélection inclurait un ADNmt muté. On observera alors, une accélération d'une éventuelle dérive génétique, avec fixation d'une mutation dans la descendance. Ainsi, en dépit d'un nombre de copies ADNmt élevé dans les ovocytes murs et le nombre relativement petit de divisions dans la lignée germinale femelle, les variants de séquence ADNmt peuvent se séparer rapidement entre les générations (Poulton *et al.* 1998 ; Marchington *et al.* 1997 ; 1998).

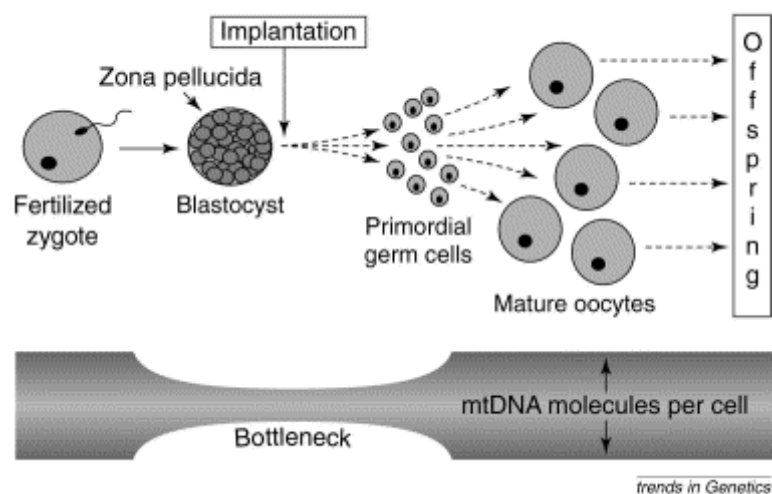


Figure 7 : Le développement embryonnaire, l'implantation et la formation de la lignée germinale femelle.

Le schéma montre la réduction du nombre de molécules ADNmt par cellules : le goulot d'étranglement génétique mitochondrial. Selon Chinnery *et al.* 2000 *Trends in Genetics* 16 (11) : 500-505.

Quatrièmement, beaucoup de mutations ADNmt pathogéniques sont sous forme d'hétéroplasmies. Le phénotype est normal jusqu'à une proportion critique de mutants ADNmt présent dans un tissu où le seuil pour une expression génotypique est dépassé (Wallace *et al.* 1997). Ce seuil varie selon les différentes mutations et est de l'ordre de 60% pour l'ADNmt délété (Hayashi *et al.* 1991). Pour la mutation ponctuelle 8344 A>G, laquelle cause un syndrome d'épilepsie et des fibres musculaires "effilochées" (ragged-red fibers), le niveau seuil est d'environ de 85% ADNmt muté (Chomyn 1998). Une fois ce seuil dépassé, divers changements dans le phénotype sont observés pour des augmentations mineures dans la proportion de mutants. Différents phénotypes associés avec le même génotype sont principalement déterminés par la concentration et la distribution de la mutation dans les tissus affectés. En effet, les tissus sont différemment dépendants de la phosphorylation oxydative. Les organes avec des besoins élevés en ATP et des capacités régénératrices faibles, tel que le cerveau, le cœur et le muscle squelettique, sont beaucoup plus sensibles aux effets pathogéniques des mutations mitochondriales (Wallace 1994b, 1995).

Cinquièmement, les mutations somatiques s'accumulent avec l'âge dans les tissus post-mitotiques, réduisant les capacités énergétiques. Ces mutations incluent les réarrangements, les délétions, les substitutions de base dans la région codante et les mutations dans la région de contrôle ADNmt. Les radicaux libres de l'oxygène causent ces modifications et il a été proposé que l'accumulation de ces mutations somatiques résultent d'un déclin en relation avec l'âge de la fonction mitochondriale menant aux maladies dégénératives et à la sénescence (Wallace *et al.* 1992 ; Wallace 1995 ; Wallace 2005).

### **3. L'hétéroplasmie de l'ADN mitochondrial**

Actuellement, la plupart des études sur la variation de séquence de l'ADNmt sont motivées par les questions sur la diversité des populations et leurs origines ou sur l'identification des mutations ADNmt dans les maladies mitochondriales ou le vieillissement.

Dans l'étude plus particulière du vieillissement (et nous devons inclure les maladies dégénératives de l'âge) et des mutations sous forme d'hétéroplasmie qui y sont souvent liées, nous devons poser les bases de leur accumulation dans un cadre "transmis" ou "somatique".

Comme discuté précédemment, il est considéré que l'ADNmt est, de façon prédominante, transmis à travers le cytoplasme de l'ovocyte, il est donc d'un héritage maternel. Ainsi, la seule possibilité pour que la séquence de l'ADNmt change est par une accumulation séquentielle de mutations parmi les lignées maternelles. Le taux d'évolution élevé de la séquence mitochondriale ( $E$ ) est le produit d'un taux de mutation ( $\mu$ ) et d'un taux de fixation ( $F$ ),  $E = \mu F$  (Wallace 1994). Le taux de mutation résulterait en partie de la perte de protection des histones, des systèmes de réparation inefficace, et une exposition continue aux radicaux libres générés par la chaîne d'électrons. Le taux de fixation des mutations serait dû à un tri cellulaire inefficace des molécules mutantes dans la lignée germinale femelle et une dérive génétique rapide des molécules ADNmt dans la population générale (Wallace 1992).

L'apparition de la mutation ADNmt parmi les molécules normales crée donc ce mélange intracellulaire nommé hétéroplasmie (figure 8). Par conséquent, les ADNmt mutant et normal sont distribués au hasard dans les cellules filles pendant la division mitotique ou méiotique, et le pourcentage des deux espèces de molécule dérivent dans chaque cellule pouvant mener à nouveau à une homoplasmie de molécules mutantes ou normales pures, processus correspondant à la ségrégation répllicative. La ségrégation répllicative mitotique nécessite de très nombreuses divisions cellulaires pour approcher l'homoplasmie, mais la ségrégation répllicative méiotique peut être rapide. Les proportions de mutants sont alors prédominants et deviennent essentiellement mutants en une ou deux générations.

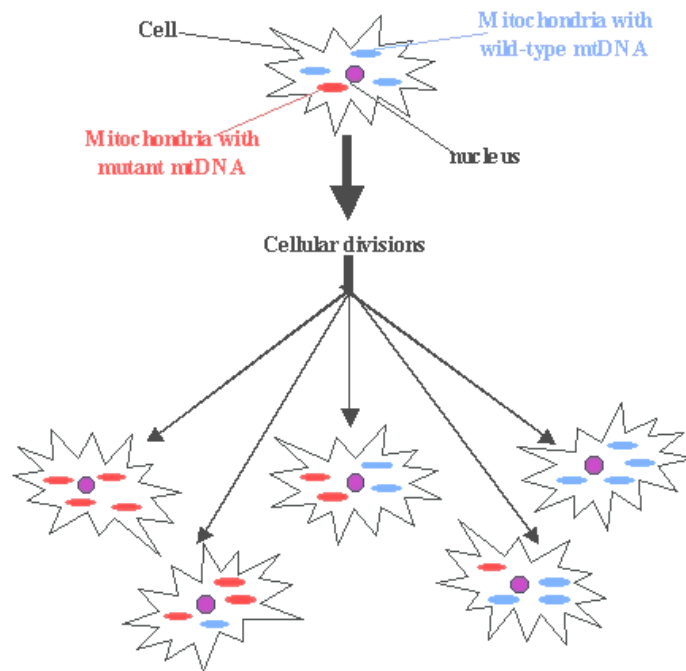


Figure 8 : Exemple de ségrégation répllicative mitotique.

*Lors des divisions cellulaires les mitochondries sont distribuées dans les cellules filles au hasard, indépendamment de toute sélection.*

*(Sur <http://www.members.aol.com>)*

Les patients avec des maladies mitochondriales présentent habituellement un mélange de molécules mutantes et normales, et les caractères cliniques des maladies diffèrent selon le pourcentage de mutants dans les tissus atteints. La transmission de l'hétéroplasmie ADNmt a pu être évaluée dans des familles où les individus portaient des différences majeures de mutation entre eux. Pour comprendre ce processus de transmission, Jenuth *et al.* (1996) ont généré des souris hétéroplasmiques par transfert cytoplasmique (à partir de souches de souris de laboratoire qui ont des génotypes mitochondriaux différents). Ainsi, ils ont pu développer des lignées de souris qui transmettaient des proportions variables de séquences ADNmt. Cette étude ainsi que d'autres (Meirelles et Smith 1997 ; Takeda *et al.* 2000) ont montré que la variation dans le taux de mutation entre les descendants d'une unique femelle avait lieu lors du développement embryonnaire précoce, avant la formation primaire de l'ovocyte. La restriction dans le nombre de copies ADNmt dans la cellule pendant le développement précoce de l'ovocyte, le goulot d'étranglement génétique mitochondrial, mène à une dérive génétique rapide et au hasard à travers une répartition inégale des génomes lors des divisions. Ce processus est responsable de la variation des niveaux d'hétéroplasmies transmis de la femelle à sa progéniture. Ces mêmes principes sont aussi appliqués à l'humain dans la transmission de mutations mitochondriales pathogéniques (Chinnery *et al.* 2000 ; Brown *et al.* 2000).

Mais, les différences cliniques dans une maladie ne peuvent pas être expliquées seulement par le taux de mutation hérité différent entre frères et sœurs, la distribution tissulaire et cellulaire a aussi son importance.

Il a été constaté assez rapidement que des organes tendaient à contenir des niveaux plus élevés de mutants ADNmt par rapport à d'autres. Dans le cadre d'une famille, la distribution de la mutation A3243G a été analysée dans cinq individus atteints de diabète et de surdité à transmission maternelle, sur différents tissus. Des niveaux élevés de mutants sont présents dans le tissu musculaire, suivis par les cheveux, ensuite le tissu buccal et avec des niveaux très faibles dans les leucocytes (Chinnery *et al.* 1999). Ces résultats semblent montrer un modèle de distribution tissulaire non aléatoire dans les cinq membres de cette famille. Il est intéressant de constater que cette hiérarchie correspond au taux de renouvellement cellulaire (turn-over) des tissus. Cette hiérarchie est aussi observée dans un individu sain de la famille dont le seuil d'hétéroplasmie est inférieur à des symptômes cliniques.

La ségrégation tissulaire des mutants ADNmt pourrait ne pas être aléatoire, comme montré dans la figure 9. Chinnery (2002) propose un modèle où, au stade précoce des divisions embryonnaires (F1), la sélection, en favorisant des génotypes spécifiques, peut être influencée par des facteurs de maintenance cellulaire : des différences dans la réplication, dans la dégradation ADNmt, ou des effets phénotypiques d'une mutation particulière. Les gènes nucléaires pourraient jouer un rôle important dans ce processus.

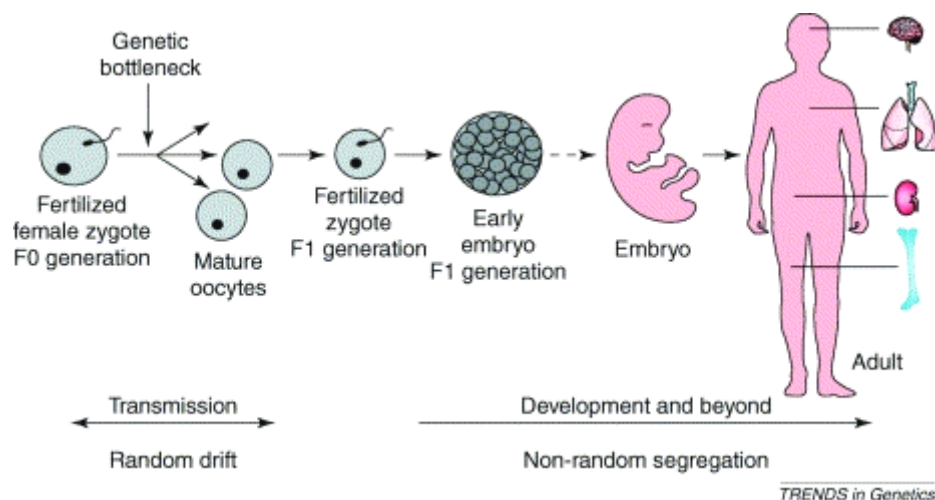


Figure 9 : La variation du niveau d'hétéroplasmie mitochondrial transmis.

*La variation de l'hétéroplasmie transmise, à partir de la mère (F0) à sa progéniture (F1,) a lieu précocement lors de l'ovogenèse et est gouvernée par un goulot d'étranglement génétique. Après la fécondation (F1), l'hétéroplasmie peut varier dans les différents tissus de l'embryon pendant son développement à travers une ségrégation tissulaire dirigée des génotypes mitochondriaux. Selon Chinnery 2002*

*Trends in Genetics 18 : 173-176*

Très tôt, des études sur des maladies mitochondriales humaines transmises ont rapporté certains cas d'accumulations faibles, en relation avec l'âge, de mutation mitochondriale somatique. Ces mutations somatiques pourraient être suffisantes pour permettre au génotype de dépasser le niveau seuil d'expression phénotypique, permettant l'apparition de symptômes cliniques (Shoffner *et al.* 1990 ; Wallace *et al.* 1994). L'accumulation de ces mutations somatiques au cours de la vie de l'individu porteur de mutations héritées pourrait expliquer la variabilité des phénotypes cliniques et le temps plus ou moins long de la déclaration de la maladie. Pour les individus nés avec un génotype mitochondrial normal ou moyennement délétère, des années de dommages pourraient être nécessaire avant que la fonction de l'organe diminue. Par contre, pour les individus ayant hérité de mutations modérément délétères, les dommages ADNmt moins importants pourraient mener à l'apparition de symptômes cliniques. Il y aurait donc un effet additif des mutations transmises et somatiques où les mutations somatiques pourraient déterminer le temps et la progression de la maladie et où les mutations transmises définiraient la nature et la sévérité des manifestations cliniques (Wallace 1992 ; 1994a).

Les premières investigations sur des mutations sous forme d'hétéroplasmie de l'ADNmt ont été réalisées principalement sur des patients âgés et atteints de maladies mitochondriales (Holt *et al.* 1988 ; Cortopassi *et al.* 1990). La mise en évidence de formes d'hétéroplasmies de l'ADNmt dans les sujets sains et âgés a été plus tardive car les niveaux d'accumulations sont beaucoup plus faibles et nécessitent des techniques sensibles de détection (Jazin *et al.* 1996 ; Michikawa *et al.* 1999). Ces accumulations mitochondriales dans les individus âgés ne présentant pas de pathologies précises sont aussi tissu-spécifique, et le sujet sera abordé dans le chapitre 3.

La plupart des mutations neutres apparaissant dans une population générale sont perdues et seulement quelques unes subissent une dérive génétique pouvant mener à une augmentation des fréquences de polymorphismes. Les mutations de polymorphismes qui existent dans la population générale aujourd'hui se sont présentées il y a très longtemps et ont depuis subi la ségrégation vers l'homoplasmie. Au contraire, les mutations fortement délétères sont rapidement éliminées par la sélection sous la forme de maladies génétiques. Par conséquent, les mutations ADNmt qui causent des maladies sévères sont généralement des nouvelles mutations sous forme d'hétéroplasmies. Entre les deux extrêmes, les mutations moyennement délétères ne diminuent pas significativement la capacité reproductive des individus. Ces

mutations peuvent donc s'établir dans une population par dérive, seul les individus portant ces mutations ont une capacité énergétique réduite les rendant prédisposées aux maladies dégénératives. Une analyse phylogénétique récente de la séquence totale de 1125 ADN mitochondriaux humains couvrant les zones géographiques de l'Afrique, l'Europe et le nord-est de la Sibérie pourrait montrer une conservation élevée de substitutions acides aminés dans les multiples lignées ADNmt des hautes latitudes (Ruiz-Pesini *et al.* 2004). L'hypothèse étant que les variants ADNmt anciens aurait permis aux Hommes de s'adapter aux climats froids, et il en aurait résulté un enrichissement régional des lignages ADNmt (haplogroupes). Actuellement, ces mêmes variants occasionneraient des différences dans le métabolisme énergétique et dans le dommage oxydant mitochondrial, affectant donc la santé et la longévité. Ainsi, des mutations ADNmt spécifiques auraient permis à nos ancêtres de s'adapter à des climats plus froids, et ces mêmes variants influenceraient nos prédispositions aux maladies modernes (Ruiz-Pesini *et al.* 2004).

Dans le cas d'influence de l'environnement physique sur l'homme, il a été observé des mutations de l'ADN mitochondrial au cours de la vie, qui pourraient atteindre les cellules sexuelles et être transmises à la descendance. Les mécanismes d'oxydation à partir des espèces réactives de l'oxygène (ROS :  $\text{OH}^\circ$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^\circ$ ) sont induits par des agents chimiques, le métabolisme oxydant, les UV et les radiations. Les radiations ionisantes sont connues pour leurs effets mutagènes, notamment sur l'ADN, menant à plusieurs modifications incluant l'oxydation des bases (Cadet *et al.* 1999). Leurs études ont abouti à l'identification de nombreuses mutations de l'ADN par effet direct ou indirect. L'effet indirect des radiations ionisantes est représenté par la radiolyse de l'eau qui forment des radicaux libres et représentent les 2/3 des dommages cellulaires induits sur l'ADN (Ward 1988). Les ROS produits dans ce cas sont identiques à ceux produits lors du métabolisme oxydant de la mitochondrie et les dommages ADN sont identiques bien que les rendements relatifs produits semblent différents (Dizdaroglu 1992 ; Wagner *et al.* 1992 ; Ames *et al.* 1993).

Une étude récente a étudié les effets de la radioactivité naturelle présente dans la région du Kerala (Inde) sur le génotype ADNmt, notamment dans la région de contrôle (Forster *et al.* 2002). Il faut noter que à des doses faibles, les effets des radiations sont peu connus et il n'a pas été détecté des effets nuisibles ou des malformations congénitales dans les populations exposées à une irradiation chronique (Jaikrishan *et al.* 1999 ; Berrington *et al.* 2001 ; Maconochie *et al.* 2001). Les auteurs ont analysé la séquence mitochondriale de 255 familles

vivant dans les zones de hautes ou de basses radiations du Kerala à partir de prélèvements de cellules buccales et par la technique de séquençage automatique. Ils constatent des cas de transmission d'hétéroplasmie, pour les familles vivant dans les zones de haute radiation, sur des positions de la région de contrôle ADNmt. Ces positions sont des positions identiques aux anciennes mutations mitochondriales eurasiennes (Macaulay *et al.* 1999).

Ainsi, ces mutations ponctuelles reconnues sous forme d'hétéroplasmie et associées aux radiations sont aussi des points chauds (hot-spots) de mutations au cours de l'évolution (Stoneking 2000). Les auteurs ont proposé, à partir de leurs résultats, que la radioactivité pourrait augmenter indirectement les mécanismes évolutifs de mutation dans les cellules normales (Forster *et al.* 2002).

La génétique mitochondriale influence notre organisme de part ces caractères spécifiques et peut avoir des conséquences sur le court terme : le vieillissement et les maladies, le moyen terme : la transmission de mutations à la descendance, et le long terme : la conservation des mutations par la sélection.

L'accumulation de mutations peut avoir lieu dans un "cadre transmis" avec des mécanismes sous-jacents différents pouvant inclure l'environnement physique : la radioactivité naturelle, la latitude, le climat ; l'environnement biologique cellulaire : l'ovogenèse et les maladies ; et peut avoir lieu dans un "cadre somatique" incluant l'environnement utérin : la ségrégation tissulaire lors de l'embryogenèse, et l'environnement cellulaire direct : le métabolisme oxydatif.

L'ensemble de ces influences devrait inclure, dans l'environnement humain, le milieu culturel et social mais celui-ci reste difficile voire impossible à appréhender au niveau biologique ou génétique.



## **CHAPITRE 2 : LE STRESS OXYDATIF**

### **1. La théorie physiologique de Harman**

Les cellules sont largement dépendantes de la production d'ATP pour leur croissance, leur différenciation et leur réponse aux stimuli physiologique et environnemental. Il a été établi que les mitochondries sont la principale ressource de formation d'ATP grâce au couplage de la chaîne de phosphorylation oxydative et de l'ATP synthétase (chapitre 1, paragraphe 1). D'un autre côté, les mitochondries sont la source majeure des espèces d'oxygène réactives (ROS : reactive oxygen species) et des radicaux libres générés par la fuite d'électrons lors du fonctionnement de la chaîne de phosphorylation oxydative. Le stress oxydatif représenterait le déséquilibre entre la production de ROS et les systèmes de protection anti-oxydants.

En 1956, Harman a proposé que les radicaux libres sont le facteur majeur impliqué dans le processus de vieillissement. La principale idée étant que le vieillissement est causé par l'accumulation de dommages oxydants sur diverses molécules biologiques dans la cellule à partir des radicaux libres. Plus tard, Harman (1972) a redéfini l'hypothèse et a suggéré que les mitochondries sont les cibles majeures de l'attaque des radicaux libres qui mène au vieillissement humain. Il a souligné la relation entre la consommation d'oxygène et la durée de vie, car les espèces animales qui ont un taux métabolique basal élevé ont une durée de vie plus courte. Ceci avait été démontré par ajout d'inhibiteurs des réactions de radicaux libres dans le régime alimentaire de souris permettant une augmentation de leurs longévités (Harman 1971). Ainsi il a proposé que la durée de vie maximum d'une espèce de mammifères donnée est une expression du contrôle génétique sur le taux d'utilisation de l'oxygène (O<sub>2</sub>). Cette utilisation détermine le taux d'accumulation des dommages produit par les réactions radicalaires dans la mitochondrie, ce taux augmentant avec la consommation en oxygène. Ainsi, la théorie des radicaux libres propose qu'il y a une seule cause de vieillissement, modifiée par les facteurs génétiques et environnementaux et postule que les réactions des radicaux libres sont impliquées dans le vieillissement et les maladies liées à l'âge (Harman 1981).

Plus précisément, Linnane *et al.* (1989) proposent que l'accumulation des mutations de l'ADNmt durant la vie est une cause majeure du vieillissement humain et des maladies dégénératives, de part le taux élevé de mutations de l'ADNmt, la petite taille du génome mitochondrial, la perte des mécanismes de réparation pour l'ADNmt, les caractères de

ségrégation somatique des génomes mitochondriaux pendant la division cellulaire eucaryote et les lésions génétiques sous-jacentes trouvées dans des maladies mitochondriales humaines. Le point central de leur hypothèse est une perte graduelle de l'efficacité du métabolisme oxydatif mitochondrial menant à des conséquences pathologiques selon un cercle vicieux incluant les étapes suivantes : (i) avec le vieillissement, les mutations somatiques de l'ADNmt s'accumulent (ii) l'effet cumulatif de ces modifications diminue la phosphorylation oxydative (iii) la déstabilisation de la phosphorylation oxydative accélère la production de ROS dans la mitochondrie (iv) les ROS induisent d'autres délétions et peut être des réductions de l'ADNmt.

En fait la théorie des radicaux libres est compatible avec la théorie stochastique d'Orgel (1963) sur les erreurs aléatoires et la théorie déterministe d'Hayflick (1965) sur la programmation du vieillissement, l'ensemble de ces hypothèses s'insérant dans un contexte physiologique.

Actuellement, dans l'approche évolutionniste du vieillissement, les recherches sont axées sur la démonstration d'un lien entre les dommages oxydants et le vieillissement via les gènes de protection anti-oxydants ou de longévité sur des modèles animaux à durée de vie courte ou longue.

## 2. Les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène

### 2.1. Formation et propriétés chimiques

Un radical libre est une molécule ou un atome qui possède, sur sa couche externe, un électron célibataire.



$\quad \longrightarrow \quad \mathbf{A^\circ + B^\circ}$  Formation de 2 radicaux libres par coupure homolytique.

Les radicaux libres possèdent une grande réactivité et une demi-vie courte car ils ont tendance :

- soit à capter un autre électron ; c'est alors un radical oxydant
- soit à le céder ; c'est alors un radical réducteur

En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par un gain d'électron à partir de l'O<sub>2</sub>.

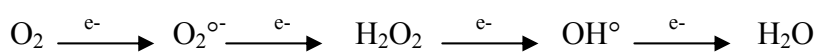
Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène :

Anion superoxyde	O <sub>2</sub> <sup>°-</sup>
Radical hydroxyle	OH <sup>°</sup>
Radical alkoxyde	RO <sup>°</sup>
Peroxyde d'hydrogène	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Radical hydroperoxyde	HOO <sup>°</sup>
Radical peroxyde	ROO <sup>°</sup>
Radical oxyde nitrique	NO <sup>°</sup>

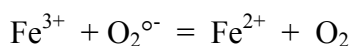
La molécule ayant le pouvoir oxydant le plus élevé est le radical hydroxyle OH<sup>°</sup>.

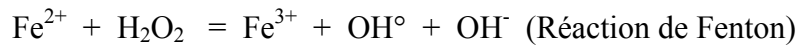
Dans les ROS peuvent être inclus d'autres composés non radicalaires très réactifs : les hydroxyperoxydes ROOH et le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Au cours du fonctionnement de la chaîne respiratoire les réactions de réduction font intervenir les ROS :



Des traces de métaux de transition favorisent la formation des ROS:





Au total



## **2.2. Les origines biologiques**

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont formées continuellement pendant le métabolisme cellulaire normal. Les événements qui produisent les ROS incluent le métabolisme peroxysomal, la synthèse enzymatique de l'oxyde nitrique, les macrophages, la lumière ultraviolet (UV), les médicaments, les radiations ionisantes et les composants des cycles rédox (Halliwell et Aruoma 1991).

Le cytochrome P-450, présent dans les microsomes, produit des radicaux libres en agissant sur des substrats endogènes comme par exemple les stéroïdes ou sur des substrats exogènes lors de la détoxification de molécules étrangères.

La myéloperoxydase permet l'oxydation des chlorures ( $\text{Cl}^-$ ) en hypochlorites ( $\text{ClO}^-$ ) en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Les hypochlorites formés réagissent avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  pour former de l'oxygène et avec  $\text{O}_2^-$  pour former  $\text{OH}^\circ$ .

La NADPH oxydase initie la réaction :  $2\text{O}_2 + \text{NADPH} = 2\text{O}_2^{\circ-} + \text{NADP} + \text{H}^+$ .

La NO synthase, et plus particulièrement dans le macrophage, transforme l'arginine en citrulline +  $\text{NO}^\circ$ . Puis  $\text{NO}^\circ + \text{O}_2^{\circ-} = \text{ONOO}^-$  (anion peroxynitrite) qui se décompose facilement en  $\text{OH}^\circ$  et  $\text{NO}_2^\circ$ .

La xanthine oxydase produit à partir de la xanthine +  $\text{H}_2\text{O} + 2\text{O}_2 = \text{acide urique} + 2\text{O}_2^{\circ-} + 2\text{H}^+$ .

Ainsi que d'autres molécules telles que la peroxydase, l'acide aminé oxydase, l'Acyl CoA oxydase qui dégrade les acides gras dans les peroxysomes ( $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{ROOH}$ ).

La monoamine oxydase qui effectue la désamination de la dopamine avec une production de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Les cyclooxygénases et lipoxygénases impliquées dans la synthèse des prostaglandines et qui forment des molécules  $\text{ROOH}$ .

Dans les conditions physiologiques, les mitochondries constituent la principale source de production des ROS. Bien que de nombreuses enzymes dans le cytosol, telles que les oxygénases, les peroxydases et les oxydases, génèrent une petite quantité de ROS, il est estimé que 95% de l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ) est produit par la chaîne de transport d'électrons de la membrane mitochondriale pendant le métabolisme normal (Boveris et Chance 1973).

Cette production de radicaux libres lors de la respiration cellulaire correspond à environ 5% de l'O<sub>2</sub> rentrant dans la chaîne respiratoire (Chance *et al.* 1979). Il est généralement posé que les ROS sont produits à un taux proportionnel au métabolisme cellulaire. L'exception du foie démontre que l'activité du tissu hépatique implique une production importante de ROS mais n'est pas principale dans les mitochondries (15%) mais dans les autres organites tels que les microsomes (45%), les peroxyosomes (35%) et de seulement 5% dans le cytosol.

Normalement, il existe un équilibre entre la production de ROS et la capacité oxydante des cellules. Si l'équilibre est rompu cela crée le stress oxydant. Ainsi, les mitochondries sont une des principales cibles cellulaires des ROS, et en fait des niveaux relativement élevés de protéines, de lipides et d'acides nucléiques oxydés sont détectés dans les mitochondries de mammifères sous des conditions métaboliques normales (Raha et Robinson 2000).

Voyons cela plus en détail :

Les dysfonctionnements de la phosphorylation oxydative mitochondriale ont été très étudiés dans les pathologies mitochondriales humaines et dans les modèles de souris (Wallace 1999).

Les variétés de maladies génétiques mitochondriales s'expliquent par les fonctions cellulaires multiples de la mitochondrie. Trois des aspects les plus importants dans la phosphorylation oxydative sont : (i) la production d'énergie, (ii) la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), (iii) la régulation de la mort cellulaire programmée, c'est-à-dire l'apoptose.

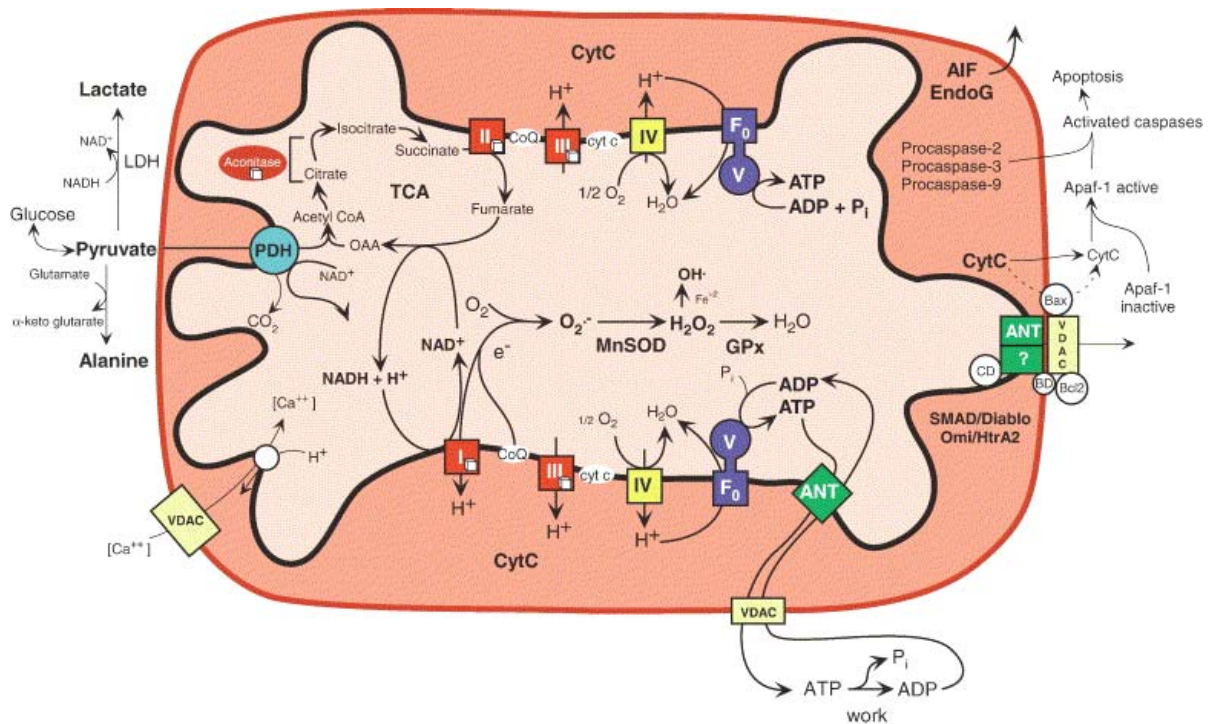


Figure 10 : Schéma démontrant la relation entre la phosphorylation oxydative mitochondriale, la production d'ATP, la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'initiation de l'apoptose.

*Selon Wallace 1999 Science 283 : 1482-1488.*

Comme vu dans la figure 10 et dans le chapitre 1, les protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative sont localisées dans la membrane interne mitochondriale et incluent les composants de la chaîne de transport d'électrons, l'ATP synthétase, et le transporteur du nucléotide adénine (ANT). La chaîne respiratoire oxyde quatre hydrogènes  $H^+$  provenant de l'oxydation des acides organiques tel que le pyruvate et les acides gras avec de l'oxygène  $O_2$  pour générer deux molécules  $H_2O$ .

Les électrons, provenant de  $NAD^+$  (nicotinamide adénine nucléotide) sont transférés au complexe I (NADH déshydrogénase) et ensuite au coenzyme  $Q_{10}$  (CoQ). Les électrons provenant du succinate sont transférés au complexe II (succinate déshydrogénase, SDH) et au CoQ. À partir du CoQ les électrons passent dans le complexe III, puis au cytochrome C (cyt c), ensuite au complexe IV (cytochrome c oxydase, COX) et finalement à un  $\frac{1}{2} O_2$  pour former  $H_2O$ .

L'énergie relâchée est utilisée pour la pompe à protons ( $H^+$ ) dans l'espace inter membranaire afin de créer un gradient électrochimique qui est positif et acide dans l'espace inter membranaire et négatif et basique dans la matrice mitochondriale. Cela crée un « condensateur » qui peut être dépolarisé par le transport de protons dans la matrice à travers

le canal à protons  $F_0$  de l'ATP synthétase. Le flux de protons conduit à la formation d'ATP à partir de l'ADP (adenosine diphosphate) et un  $P_i$  (phosphate inorganique). L'ATP est exportée au cytosol par échange avec l'ADP via l'ANT.

Dans ce processus, la consommation d'oxygène par la chaîne de transport d'électrons est couplée à la phosphorylation de ADP par l'ATP synthétase à travers un gradient électrochimique (Wallace 1999).

Dans les différents tissus (à l'exception du foie comme vu précédemment), la phosphorylation oxydative est la source majeure de la production de ROS, notamment l'anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^\circ$ ) qui sont des intermédiaires dans les réactions de réduction lors du transport d'électrons. Ces ROS proviennent du complexe I, du CoQ et du complexe III. Le complexe IV nécessite pour son activité la présence de cardiolipine qui est un lipide susceptible de subir une peroxydation. Il n'y a pas de production de ROS au niveau du complexe II (figure 10).

Ceci a lieu quand la chaîne de transport d'électrons est inhibée, les électrons s'accumulent dans les stades précoces de la chaîne, précisément dans le complexe I et le CoQ. Il peut avoir alors une fuite d'électrons qui sont donnés à la molécule d'oxygène  $O_2$  pour former l'anion superoxyde  $O_2^{\circ-}$ . Cet anion superoxyde est dismutée par une enzyme, la superoxyde dismutase Mn (manganèse) mitochondriale (MnSOD) pour donner le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . Cette molécule est convertie en  $H_2O$  par la glutathione peroxydase (GPx). Mais,  $H_2O_2$ , en présence de métaux de transitions réduits ( $Fe^{+2}$ ) peut aussi être converti en radical hydroxyle ( $OH^\circ$ ) qui est hautement réactif à une réaction de fenton (chapitre 2.2.1).

L'exposition chronique au ROS peut être le résultat de dommages oxydants sur les protéines, les lipides et les acides nucléiques mitochondriaux et cellulaires (voir paragraphe suivant 2.3). Une exposition importante aux ROS peut inactiver les centres fer et sulfure (Fe-S) des complexes I, II et III, résultant dans une chute ou un arrêt de la production énergétique mitochondriale.

La mitochondrie peut aussi induire un changement majeur dans l'initiation de l'apoptose. Ce changement pourrait être impliqué par l'ouverture de canaux non spécifiques de la membrane mitochondriale interne, le pore de perméabilité de transition mitochondrial (mtPTP). La matrice mitochondriale contient de nombreux facteurs de promotion à l'apoptose notamment une protéase nommée caspase. L'ouverture des mtPTP provoque une chute du gradient électrochimique, le gonflement de la membrane interne et le relargage des facteurs

d'apoptose. Ceci entraîne un ensemble de réactions complexes menant à la destruction du cytoplasme. Le facteur induisant l'apoptose (AIF) est transloqué au noyau, induisant la destruction de la chromatine (figure 10).

L'ouverture des pores mtPTP et la mort cellulaire peuvent être initiée par un niveau de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) excessif dans la mitochondrie, par l'augmentation de l'exposition au ROS, ou au déclin de la capacité énergétique (Green et Reed 1998 ; Susin *et al.* 1999).

Ainsi, une réduction marquée dans la production énergétique et l'augmentation du stress oxydatif peut théoriquement activer l'ouverture des pores mtPTP et initier l'apoptose. L'interaction de ces trois processus de phosphorylation oxydative peut expliquer la plupart des caractéristiques pathophysiologiques des maladies mitochondriales. Ces cas sont souvent retrouvés dans des maladies dues à des mutations hétéroplasmiques mitochondriales dans la région codante, par exemple dans le syndrome de Leigh où le pourcentage d'hétéroplasmie peut être inférieur à 75% (Holt *et al.* 1990).

Dans les cas non pathologiques, lors d'un vieillissement physiologique normal, il est jusqu'à maintenant estimé que la production physiologique de ROS est trop faible dans les conditions normales. La deuxième hypothèse étant qu'il existe une baisse des défenses anti-oxydantes au cours du vieillissement. Ainsi il apparaîtrait un déséquilibre entre l'augmentation du niveau de ROS et une diminution des systèmes de protection antioxydants (Sies 1997).

### **2.3. Les dommages oxydants sur les molécules mitochondriales**

La génération des ROS dans les différents compartiments cellulaires peut créer un déséquilibre dans la cellule puis dans le tissu touché pouvant mener au vieillissement et aux maladies dégénératives. Le principal générateur de ROS dans les tissus post-mitotiques sains est considéré comme la mitochondrie (Boveris et Chance 1973). Le niveau général de stress oxydant dans la cellule dépendra de la balance entre la génération de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et son élimination par les anti-oxydants cellulaires.

Cependant, l'élimination des ROS par les anti-oxydants peut ne pas être efficace à 100%, menant à la présence de dommages oxydants plus ou moins étendue sur les macromolécules cellulaires des animaux sains, incluant les lipides (Girotti 1998), les protéines (Berlett et Stadtman 1997) et l'ADN (Beckman et Ames 1997). De plus, des travaux ont démontré que



les niveaux des marqueurs des dommages oxydants de ces macromolécules augmentent avec l'âge, bien que des controverses existent.

### **2.3.1. Le dommage oxydant sur les protéines mitochondriales**

A priori, il semblerait raisonnable de penser que les protéines endommagées ne s'accumulent pas car les protéines cellulaires sont en constant turn-over et les protéines endommagées ou formées anormalement ont un turn-over plus rapide que les protéines normales.

Cependant, dans des conditions de stress oxydatif ou en l'absence d'un accepteur d'électron approprié, l'oxydation des protéines se traduit par une fragmentation des molécules et la formation de liaisons croisées et donne naissance à des composés carbonylés (R-CHO, R-CO-R, R-CO-CO-R). L'oxydation des acides aminés peut aussi avoir lieu. Les sites préférentiels sont les noyaux indole (tryptophane) et phényle (phénylalanine et tyrosine), et la chaîne latérale comme le groupement sulfhydrique (SH) de la cystéine et de la méthionine. L'oxydation des enzymes peut mener à des perturbations du métabolisme et l'oxydation des protéases peut mener à une déficience dans l'élimination des protéines oxydées. L'oxydation des constituants de la matrice extracellulaire crée des atteintes tissulaires.

De nombreuses recherches ont montré que le dommage oxydant sur les protéines mesuré par les protéines carbonylées augmente avec l'âge (Sohal et Dubey 1994 ; Stadtman 1992; Merker *et al.* 2001). Ces protéines carbonylées sont présentes dans des cellules fibroblastiques humaines (Oliver *et al.* 1987) dans le cerveau humain (Smith *et al.* 1991) dans les hépatocytes de rat (Starke-Reed et Oliver 1989) et dans le muscle squelettique humain (Mecocci *et al.* 1999). L'ensemble des accumulations de protéines dysfonctionnelles soit dans les enzymes nécessaires aux réactions métaboliques, soit dans les protéases permettant l'élimination des molécules oxydées provoque une perte de la fonction biochimique et physiologique de la mitochondrie. Cette accumulation de protéines oxydées liée à l'âge peut être expliquée par une augmentation dépendante de l'âge dans le taux d'oxydation des protéines ou la diminution dans la capacité à dégrader les protéines oxydées (Stadtman 1992).

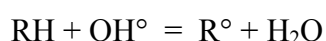
Ainsi, l'accumulation en relation avec des produits de protéines oxydées dans la mitochondrie pourrait mener à la perte de production d'énergie et à l'augmentation de la production de radicaux libres.

### 2.3.2. Le dommage oxydant sur les lipides mitochondriaux

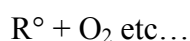
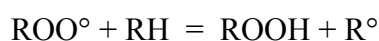
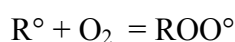
L'oxydation des lipides se nomme la peroxydation. L'ensemble des membranes (plasmiques ou intracellulaires) et les lipoprotéines contiennent des phospholipides riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) susceptibles de subir une peroxydation.

La peroxydation se décompose en 3 phases :

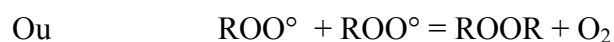
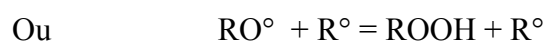
Une phase d'initiation : un radical libre ( $\text{OH}^\circ$ ,  $\text{HO}_2^\circ$  par exemple) va s'attaquer à un premier AGPI (RH).



Une phase de propagation:



Une phase de terminaison : avec la rencontre de 2 espèces radicalaires



Au cours de la peroxydation lipidique, il y a formation de nombreux dérivés : des diènes conjugués, des hydro et endoperoxydes, des aldéhydes. Les aldéhydes sont toxiques et peuvent condenser avec les groupements aminés des protéines ce qui provoque des réticulations et des agrégations.

Il a été constaté que la fluidité des membranes cellulaires diminuent avec l'âge (Huber *et al.* 1991), un changement qui pourrait être attribué en partie à l'oxydation du plasma et aux composants lipidiques de la membrane mitochondriale. En effet, dans les fractions de membranes mitochondriales isolées à partir de foie de rongeurs, il a été démontré une diminution progressive de quantité d'acide linoléique, en parallèle une augmentation d'acides gras insaturés à longue chaîne et une sous classe de lipides exhibant un degré élevé d'insaturation et plus sensible aux réactions d'oxydations (Laganière et Yu 1993). La plupart de ces changements sont présents dans les acides gras de la cardiolipine qui joue un rôle clé dans l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire.

L'accumulation âge-dépendante de ces lipides plus enclins à la peroxydation peut être suivie de l'augmentation de la rigidité de membranes. La mitochondrie expliquerait pour l'essentiel la perte d'eau qui se rencontre avec l'âge dans certains tissus tels que le foie ou le cœur (von Zglinicki *et al.* 1991) et qui est cohérent avec l'augmentation de la rigidité de ces membranes dans cet organite. Les études incluant la technique de HPLC (high performance liquid chromatography) ont démontré que les hydroperoxydes de la phosphatidylcholine et de la phosphatidylethanolamine augmentent avec l'âge dans les cellules sanguines et le plasma de sujets humains sains (Miyazawa *et al.* 1996 ; Kinoshita *et al.* 2000).

Ces changements pourraient expliquer l'augmentation de la sensibilité au dommage oxydant et pourrait être délétère à la fonction mitochondriale normale de part la diminution de la perméabilité membranaire et la perte de contrôle sur la chaîne respiratoire.

### **2.3.3. Le dommage oxydant sur l'ADN mitochondrial**

Parmi les ROS produits par le métabolisme aérobie, il semblerait que le radical superoxyde  $O_2^{\circ}$  et le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , sous conditions physiologiques, ne peuvent causer des dommages sur l'ADN (Aruoma *et al.* 1989). La toxicité de ces espèces a été attribuée au radical hydroxyde  $OH^{\circ}$  très réactif et qui peut être formé par des réactions de Fenton de  $O_2^{\circ}$  et de  $H_2O_2$  catalysées par des ions métaux (Halliwell et Aruoma 1991).

Le radical hydroxyle produit de nombreuses lésions sur l'ADN (figure 11) et les nucléoprotéines comme des lésions sur les bases et les sucres, des cassures simple brin et double brin, des sites abasiques et des liaisons croisées entre protéines et ADN (Steenken 1989 ; Dizdaroglu 1992 ; Cadet *et al.* 1999 ; Chatgililoglu et O'Neill 2001).

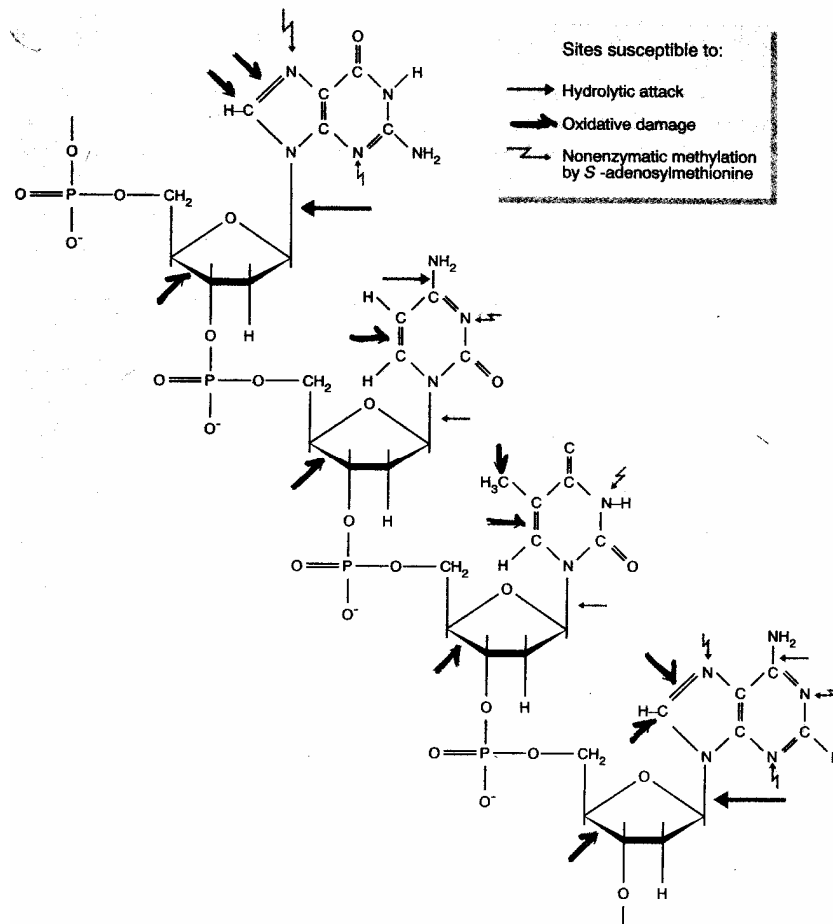


Figure 11 : Sites cibles de la dégradation de l'ADN.

Les sites pouvant subir des dommages oxydants sont indiqués en traits plus épais. Selon Lindahl 1993 Nature 362 : 709-715.

L'étude des transformations des produits oxydés de la guanine et de la thymine est principalement étudiée pour leurs effets mutagènes sur l'ADN (figure 12). En effet, les lésions 8-oxoguanine (8-oxoG ou 8-oxo-2'-déoxyguanosine (oxo8dG) une molécule proche analysée dans les publications) et thymine glycol (TG) augmentent dans les cellules traitées par des UV, des radiations ionisantes ou des mutagènes chimiques qui génèrent des ROS (Dizdaroglu 1992 ; Cadet *et al.* 1999). Des niveaux élevés de ces bases modifiées ont été détectés dans les cellules humaines sous des conditions normales (Ames 1989). La molécule de 8-oxodG se lie préférentiellement à l'adénine plutôt qu'à la cytosine en adoptant une conformation *syn* et génère des mutations de transversion (G : C → A : T) après réplication (Shibutani *et al.* 1991; Grollman et Moriya 1993) et qui pourrait jouer un rôle dans le développement de cancer et du vieillissement (Ames 1989 ; Lindahl 1993). Au contraire, la paire de bases TG bloque fortement la réplication (Clark et Beardsley 1987) et la transcription (Hatahet *et al.* 1994) et doit être efficacement éliminée et réparée pour maintenir la stabilité génétique (tableau 1).

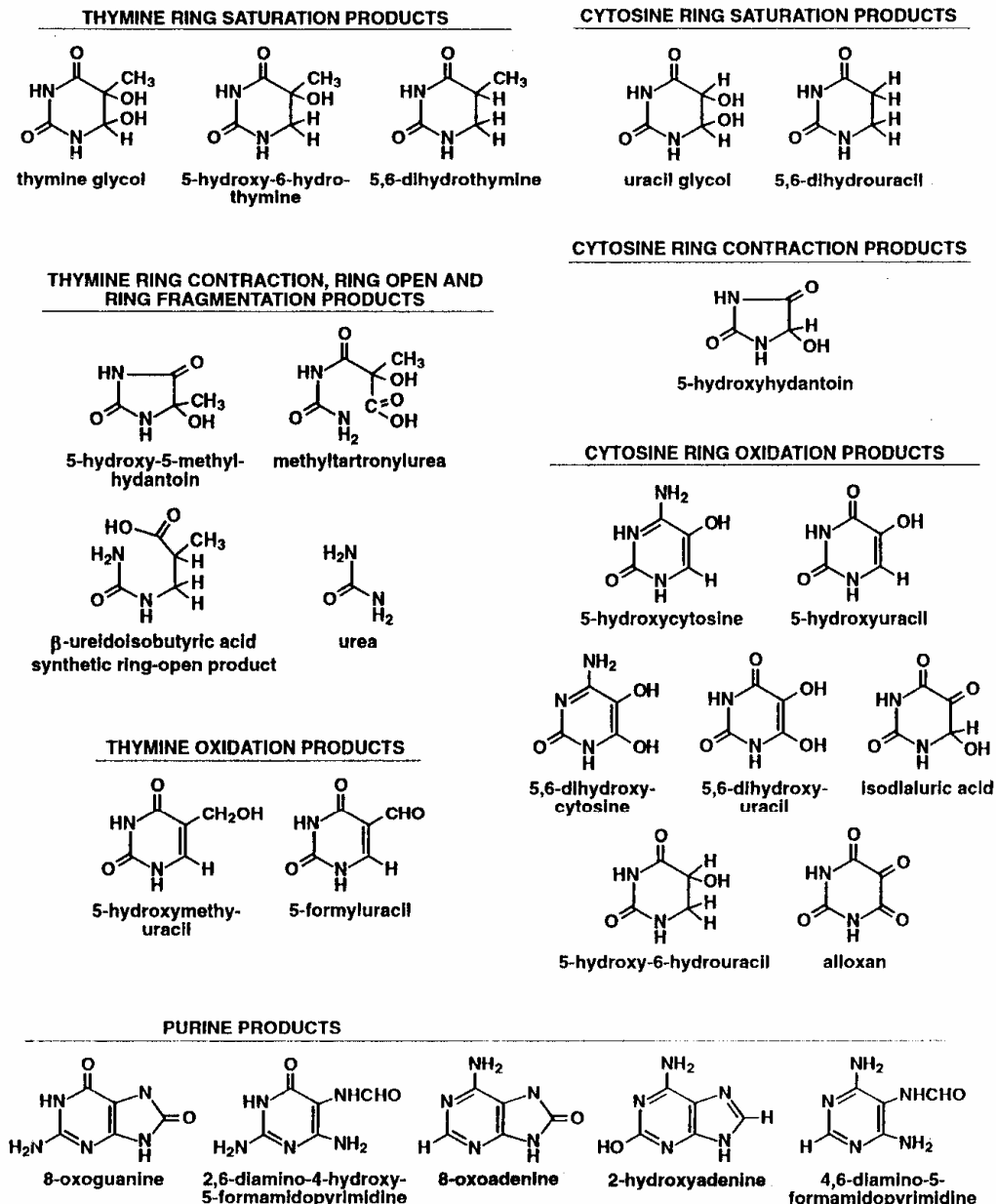


Figure 12 : Molécules stables dérivées des pyrimidine et purine produites par l'attaque du radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ) sur l'ADN. Selon Wallace 1998 *Radiation Research* S150 : S60-S79.

Il y a une sensibilité particulière de l'ADN mitochondrial à un stress oxydatif car, pour rappel, la molécule ADNmt est accolée à la membrane interne et donc proche de la chaîne respiratoire, elle n'est pas protégée par un manteau d'histones et les capacités de réparation sont moindres comparées à l'ADN nucléaire. En effet les dimères de pyrimidine et l'alkylation sont difficilement réparables et l'ADN polymérase mitochondriale ne possède pas d'activité exonucléasique. Par conséquent les niveaux de bases oxydées dans l'ADNmt sont 2 à 3 fois plus élevés par rapport à l'ADN nucléaire, et cela a pu être constaté sur plusieurs

régions du cerveau humain (Richter *et al.* 1988 ; Hudson *et al.* 1998) mais aussi dans certaines espèces de mammifères et d'oiseaux (Hudson *et al.* 1998 ; Herrero et Barja 1999 ; Barja et Herrero 2000).

Cette augmentation est cohérente avec un taux de mutation évolutif 17 fois plus élevé dans l'ADNmt comparé à l'ADN nucléaire (Wallace *et al.* 1987). La formation des dommages oxydants et notamment l'accumulation de la molécule 8-oxodG augmente avec l'âge dans différents tissus de rats et de souris (Hudson *et al.* 1998 ; Hamilton *et al.* 2001a et b) et dans les muscles du diaphragme humain (Hayakawa *et al.* 1991). L'étude d'une restriction calorique à long terme sur des rats montre que la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminue significativement sur les tissus hépatiques et réduit significativement les dommages oxydants (par mesure du niveau de 8-oxodG) sur l'ADNmt sans aucun changement sur l'ADN nucléaire (Lopez-Torres *et al.* 2002). La quantité de 8-oxodG augmenterait de 25 fois entre un individu de 85 ans et des individus jeunes dans le muscle cardiaque et ceci est aussi observé dans diverses régions du cerveau humain (Meccoci *et al.* 1993 ; Hayakawa *et al.* 1993).

Cette accumulation de dommages oxydants de l'ADNmt est corrélée avec le niveau de délétions ADNmt dans des tissus post-mitotiques (Hayakawa *et al.* 1991). Différents laboratoires ont démontré que les mutations ADNmt telles que les délétions, les mutations ponctuelles, les réarrangements ADN, augmentent avec l'âge dans les mammifères, et spécialement dans les tissus post-mitotiques avec une demande énergétique élevée (Melov *et al.* 1997 ; Brierley *et al.* 1998 ; Pesce *et al.* 2001) et affectent les fibroblastes et le tissu musculaire humain (Michikawa *et al.* 1999 ; Wang *et al.* 2001). L'accumulation de mutations ADNmt avec l'âge ont été décrites aussi dans le cerveau, le cœur et le muscle squelettique de trois espèces de mammifères ayant un potentiel de durée de vie maximum très différent : les souris (3,5 ans), les chimpanzés (59 ans) et les humains (122 ans) (Melov *et al.* 1999). Ceci indique que le taux de d'accumulation des mutations ADNmt est plus rapide dans les animaux à durée de vie courte par rapport aux animaux à durée de vie longue. Ceci est aussi en accord avec la description d'un taux élevé d'accumulation de mutations ponctuelles dans l'ADNmt de souris quand il est comparé à l'humain (Wang *et al.* 1997).

Tableau 1 : Conséquences biochimiques et biologiques aux lésions induites par les radicaux libres.

*Ces lésions ont été mises en évidence sur E. Coli. Selon Wallace 1998. Radiation Research S150 : S60-S79.*

lésions	Blocage de l'ADN polymérase	léta	Base insérée à l'opposée in vitro	mutagène
Abasic sites	Oui	Oui	A>G>T	Oui
Thymine glycol	Oui	Oui	A>>>G	Pauvre
Dihydrothymine	Non	Non	A	Non
5-hydroxymethyluracil	Non	Non déterminé	A	Non déterminé
5-formyluracil	Non	Non déterminé	A>C	Non déterminé
uréa	Oui	Oui	A>G	Oui
β-ureidoisobutyric acid	Oui	Oui	A>G>T	Oui
5-hydroxycytosine	Non	Non	G>A	Oui
5-hydroxyuracil	Non	Non déterminé	A	Non déterminé
uracil glycol	Non	Non déterminé	A	Non déterminé
dihydrouracil	Non	Non déterminé	A	Non déterminé
formamidopyrimidine	Oui	Oui	Non déterminé	Non déterminé
8-oxoadenine	Non	Non	T>>G	Pauvre
2-oxoadenine	Non	Non	T>A	Oui
8-oxoguanine	Non	Non	C>A	Oui
α-adenine	Oui	Oui	Deletion	Oui

Ainsi, les ROS produits par les mitochondries provoquent des mutations ponctuelles et de nombreuses délétions dans l'ADNmt ce qui apportent des perturbations dans le fonctionnement mitochondrial que ce soit pour la réplication de la molécule ADN, pour la transcription d'ARN messager menant à des protéines anormales et peut mener à la mort cellulaire.

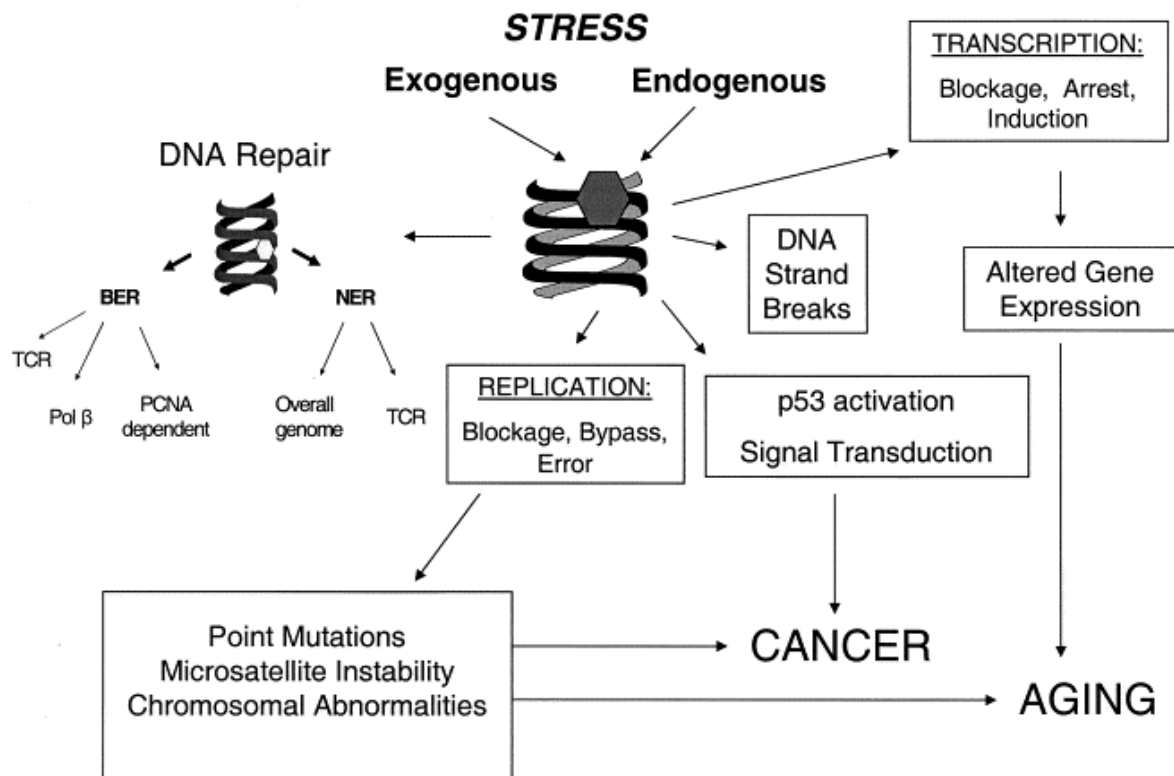


Figure 13 : Conséquences des dommages ADN.

*Selon Bohr 2002 Free Radical Biology & Medicine 32 (9) : 804-812.*

En résumé, si les lésions sur l'ADN persistent, elles peuvent causer de nombreux problèmes cellulaires. Les dommages ADN peuvent causer l'arrêt ou l'induction de la transcription, l'induction de signaux de traduction, des erreurs de réplication, et des instabilités du génome. Le résultat final est une accumulation irréversible sur le long terme de dommages sur l'ADNmt qui peut être la principale cause de changements nuisibles observés dans les organismes lors du vieillissement. Alternativement, le dommage ADN peut être réparé, et pour les lésions des bases ADN oxydées, la réparation passe par les modèles BER et NER (base excision repair et nucleotide excision repair).



### 3. Les mécanismes de réparation de l'ADN mitochondrial

Nous sommes, en tant qu'individu, constamment exposés dans notre environnement à une multitude de causes qui peuvent induire des dommages cellulaires. La cellule qui subit un stress réagit par l'expression de très nombreux gènes : des enzymes anti-oxydantes, des enzymes de réparation de l'ADN, des protéines de choc thermique, des protéines liées au transport du glucose, des facteurs de transcription, des messagers secondaires, etc. Si le stress n'est pas trop important, l'ensemble cellulaire est rééquilibré, sinon il mène au vieillissement et à la mort cellulaire. Mais, la réponse cellulaire à un stress nécessite de l'énergie et la quantité d'énergie produite diminue avec l'âge. De plus, les cellules différenciées et post-mitotiques sont plus sensibles au stress oxydatif (cellules nerveuses et musculaires).

Les modèles de réparation de l'ADN nucléaire sont beaucoup mieux compris que dans la mitochondrie. De nombreux gènes humains ont été identifiés et des tests *in vitro* ont été réalisés pour caractériser les modèles biochimiques et les interactions de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN nucléaire.

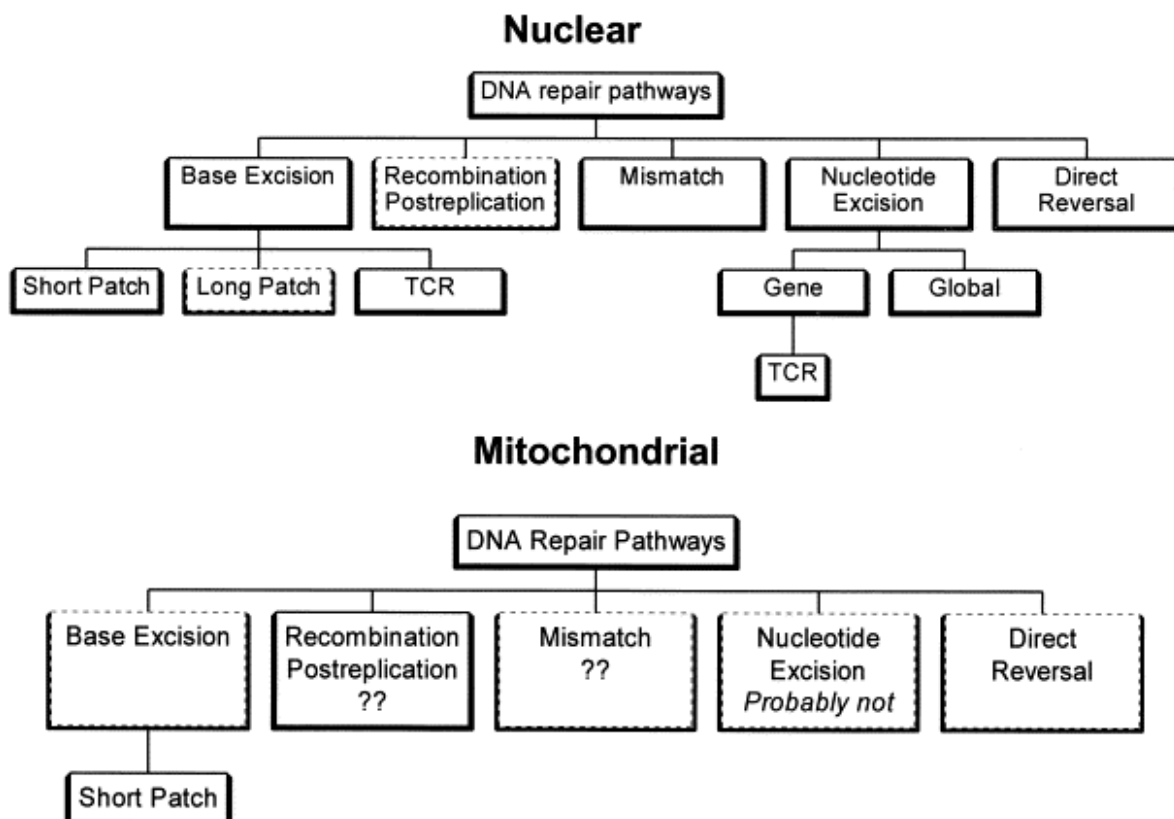


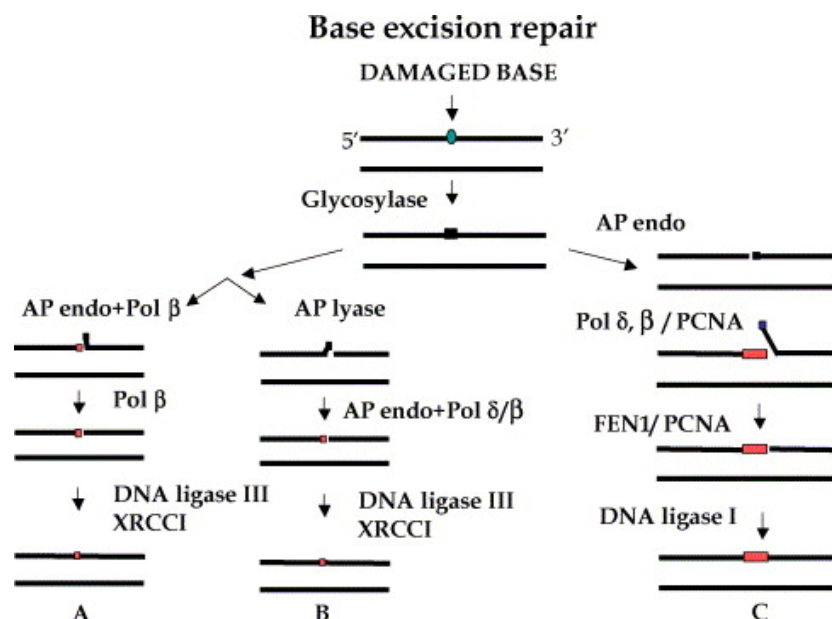
Figure 14 : Modèles de réparation de l'ADN dans le noyau et la mitochondrie des cellules de mammifères.

*Selon Bohr et al. 2002. Gene 286 : 127-134.*

La réparation de l'ADN dans le noyau prend place suivant plusieurs modèles (figure 14 ; Lindahl et Wood 1999 ; Larsen *et al.* 2005). Le mode NER (nucleotide excision repair) élimine les lésions induites par les UV, les grandes lésions ADN formées par beaucoup de produits chimiques. C'est le modèle le mieux caractérisé actuellement, plusieurs protéines participent directement à ce processus. Un autre système de réparation très important est le modèle BER (base excision repair) (Wilson et Kunkel 2000). Ce système élimine la plupart des lésions oxydantes.

Dans la mitochondrie, des systèmes de réparation existent mais pourraient différer sur certains points des systèmes nucléaires (figure 14). Le système de réparation directe (DR : direct repair ou direct reversal) serait effectif à partir d'un variant mitochondrial de la protéine nucléaire. Le système NER si important dans le noyau ne serait probablement pas présent dans la mitochondrie après de nombreuses études. La réparation des mésappariements (MMR : Mismatch repair) serait active dans la mitochondrie mais il n'est pas très clair pour l'instant que le système soit similaire au nucléaire. Les cassures double brin de l'ADN sont restaurées par une réparation recombinante (RER : recombinational repair) par des protéines adressées à la mitochondrie (pour une revue complète des systèmes de réparation voir Larsen *et al.* 2005).

Le système BER est assez bien décrit dans la mitochondrie, de plus c'est un système important dans les dommages oxydants induits par les ROS sur l'ADN (figure 15). De nombreuses études ont été réalisées sur ce modèle et nous allons parler plus précisément de la lésion 8-oxoG et de son mode d'excision réparation par la protéine OGG1 (Oxoguanine DNA Glycosylase 1) qui joue un rôle majeur dans la protection du génome mitochondrial lors de stress oxydant, de mutation et de vieillissement.



A et B représentent des nucléotides uniques (ou short patch) ou A est initié par clivage de AP-endonucléase et B est initié par clivage de la glycosylase associée à AP-lyase. C représente une réparation sur une partie plus longue. Selon Hashigushi et al. 2004. *Mitochondrion* 4 : 215-222.

Le système BER est initié par une enzyme DNA glycosylase qui reconnaît la base modifiée et l'élimine (figure 15). Dans les cellules eucaryotes, la réparation de 8-oxoG est initiée par l'enzyme Oxoguanine DNA Glycosylase 1 (OGG1). Par la suite, des enzymes endonucléases (AP-endonucléase ou AP-lyase ; AP : sites apuriniques ou apyrimidiques) coupent le site sans base résultant de l'action de la glycosylase, générant une cassure simple brin. Le processus de réparation a lieu à travers deux sous-modèles, le remplacement d'un seul nucléotide (ou short-patch : A et B) et une réparation d'une plus longue partie d'ADN (long-patch : C) dépendant de la nature finale du brin lors de la coupure. Dans le noyau, la polymérase  $\beta$  est la polymérase majeure de ce système BER et le emplacement d'un seul nucléotide semble être le modèle prédominant dans la réparation des bases oxydées 8-oxoG et TG (Dianov *et al.* 2003).

Les dernières indications pour un mécanisme BER dans la mitochondrie viennent de l'isolement d'une endonucléase mitochondriale de mammifère qui reconnaît spécifiquement les sites AP et coupe le brin ADN (Tomkinson *et al.* 1988). Pinz et Bogenhagen (1998) ont purifié une ligase mitochondriale qui paraît proche de la ligase III nucléaire. Ces localisations mitochondriales d'enzymes impliquées dans le système BER ont fourni des preuves pour un modèle BER efficace dans les mitochondries de mammifères. Une endonucléase spécifique aux dommages oxydants (mtODE, mitochondrial oxidative damage

endonuclease) a été purifiée à partir de mitochondries de foie de rats (Croteau *et al.* 1997). Cette enzyme introduit une cassure simple brin sur les sites 8-oxoG et serait une AP-lyase/glycosylase putative. La mtODE est en fait l'isoforme mitochondriale de la glycosylase OGG1 présente dans le noyau nucléaire (Souza-Pinto *et al.* 2001a). La protéine OGG1 est une glycosylase ADN majeure pour la réparation des lésions 8-oxoG dans l'ADN. C'est une glycosylase bifonctionnelle, avec une activité AP-lyase, coupant l'ADN sur les sites abasiques par un mécanisme de  $\beta$ -élimination (Radicella *et al.* 1997). L'existence de deux séquences cibles mitochondriale et nucléaire ont suggéré que ce gène pourrait coder deux isoformes nucléaires et mitochondriales. Les études avec des constructions de protéines fluorescentes transfectées sur des cellules de mammifères ont confirmé la localisation de OGG1 dans les deux compartiments (Seeberg *et al.* 2000). Il apparaît qu'il y est un dernier exon alternatif sur le gène *ogg1* et que l'adressage différentiel dirige la protéine OGG1 vers le noyau (exon 7) ou vers la mitochondrie (exon 8) (Seeberg *et al.* 2000).

Bohr *et al.* (2002) ont montré que l'enzyme OGG1 est plus importante dans la réparation mitochondriale que nucléaire en travaillant avec des souris sauvages et délétées du gène *ogg1*. Une perte complète de l'activité glycosylase sur le 8-oxoG dans les souris délétées du gène a été démontré alors que les activités d'excision sur d'autres bases oxydées par d'autres glycosylases sont fonctionnelles. La protéine OGG1 exerce donc un rôle important dans la réparation du 8-oxoG dans la mitochondrie (Souza-Pinto *et al.* 2001a). De plus, ces auteurs ont enregistré une augmentation l'activité de l'enzyme mtOGG1 avec l'âge dans le foie et le cœur de souris (Souza-Pinto *et al.* 2001b). Des résultats similaires sont obtenus dans les rats et les souris suggérant une réponse commune associée à l'âge dans les mammifères (Souza-Pinto *et al.* 1999; 2001b). Cette augmentation spécifique de l'activité d'excision suggère que la réparation des dommages oxydants sur l'ADN pourrait être induite dans la mitochondrie. Donc, ces résultats montrent que la réparation de la 8-oxoG dans l'ADNmt ne décline pas avec l'âge, mais au contraire augmente. Ces résultats ne sont pas contradictoires avec les rapports d'accumulation de 8-oxoG avec l'âge. Un stade d'accumulation de dommages peut être causé par une augmentation du taux de formation ou par une diminution du taux d'élimination. Il est possible que le taux de formation de dommages dépasse la capacité de réparation de l'ADNmt menant à une accumulation ultime de dommages (Bohr 2002).

D'autres endonucléases sur les modèles animaux ont été découvertes. Une endonucléase nommée mtTGenDo associant une activité glycosylase, qui reconnaît spécifiquement la base TG dans la mitochondrie, a été caractérisée (Stierum *et al.* 1999).

Des protéines pro-oxydantes ont été identifiées. Une enzyme glycosylase qui élimine les bases adénines appariées avec la base 8-oxoG, et donc qui contribue à la prévention de la mutation (Takao *et al.* 1999). Une 8-oxo-dGTPase humaine, qui empêche l'incorporation du 8-oxoG dans l'ADN a été localisée dans des mitochondries de mammifère (Kang *et al.* 1995).

Les recherches sur les fonctions de réparation dans la mitochondrie commencent à peine à être comprises, mais elles démontrent que la mitochondrie n'est pas aussi déficiente en système de réparation comme il a été longtemps pensé. L'accumulation de dommages ADN sur la mitochondrie pourrait être régulée ou réparée par des enzymes anti-oxydantes jusqu'à un certain équilibre. L'activité de réparation semble augmenter dans la mitochondrie avec l'âge alors qu'elle décline dans le noyau. Mais malgré cette augmentation de réparation, il y a encore une augmentation enregistrée des lésions oxydantes sur l'ADNmt avec l'âge. Cela suggère qu'il y aurait une augmentation importante de formation des lésions ADN et que les enzymes de réparation essayent de les contrebalancer mais avec des effets limités.

Le rôle de la mitochondrie dans le vieillissement implique de nombreux facteurs entraînant de des réactions en cascade (figure 16).

La chaîne de transport d'électrons est activement impliquée dans la synthèse de l'ATP couplée à la respiration qui consomme l'oxygène. Une fraction de cet oxygène est incomplètement réduite, menant à la fuite d'électrons qui génèrent des ROS et des radicaux libres organiques. Ces molécules peuvent être éliminées par des enzymes anti-oxydantes mais certaines échappent à cette dégradation et peuvent causer des dommages et des mutations aux molécules ADNmt situées près de la membrane interne. Les molécules ADNmt sont transcrites et traduites pour produire des sous-unités déficientes qui sont assemblées en complexes et forment une chaîne de transport d'électrons défectueuse. Cette chaîne défectueuse est moins efficace à la synthèse d'ATP mais produit aussi plus de ROS, qui à leur tour produiront plus de dommages oxydants aux molécules mitochondriales. Ce « cercle vicieux » se propage d'une manière « âge dépendante », et il en résulte une accumulation en relation avec l'âge de dommages oxydants et de mutations ADNmt, ce qui mène ultimement à un déclin progressif de la fonction énergétique du tissu dans un processus de vieillissement.

D'un autre côté, les enzymes d'élimination des radicaux libres et les systèmes de réparation de l'ADN deviennent moins efficaces durant le processus de vieillissement. De plus, un niveau élevé de ROS peut induire directement apoptose par une cascade de changements sur les molécules mitochondriales.

Par conséquent, l'accumulation de dommages oxydants, de molécules ADNmt mutées et de mitochondries défectueuses peuvent agir synergiquement pour causer un déclin général des fonctions physiologiques et biochimiques d'un tissu et mener au vieillissement et aux maladies dégénératives associées.

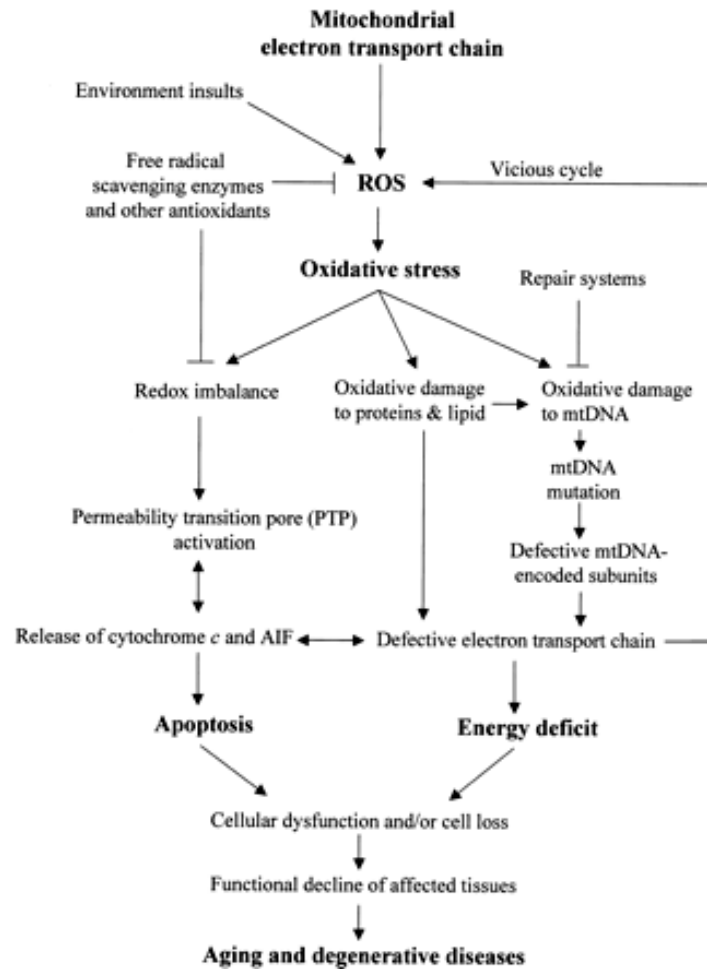


Figure 16 : Rôle de la mitochondrie dans le vieillissement humain et les maladies dégénératives de l'âge.

*Selon Wei et Lee 2002 Exp Biol Med 227 : 671-682.*

## **CHAPITRE 3 : LES MUTATIONS INDUITES DE L'ADN MITOCHONDRIAL**

### **Introduction**

De nombreuses recherches ont démontré le déclin de la capacité mitochondriale dans la phosphorylation oxydative lors du vieillissement sur des tissus tel que le muscle, le cœur, le cerveau, le foie et d'autres organes. Cependant la signification de ce déclin dépendant de l'âge dans le processus du vieillissement, c'est-à-dire : si il a un rôle causal ou plutôt si il est une des manifestations de ces processus, n'est pas clairement établi. La grande variabilité individuelle dans le taux de vieillissement, les différences importantes parmi les tissus et les types cellulaires de la détérioration de la phosphorylation oxydative, la variation en mosaïque forte des cellules intra-tissulaires dans le dysfonctionnement mitochondrial, et l'absence de connaissances concernant la génétique et les seuils de dysfonctionnements contribuent à de nombreuses controverses sur le rôle de la mitochondrie dans le vieillissement.

Une autre aire de discussion concerne l'importance des mutations ADNmt dans le déclin de l'activité de la phosphorylation oxydative dépendante de l'âge. Depuis environ vingt cinq ans (Piko *et al.* 1988 ; Holt *et al.* 1988 ; Cortopassi et Arnheim 1990), l'évaluation de nombreuses délétions de taille plus ou moins grande dans l'ADNmt ou de duplications en tandem (CA)<sub>n</sub> a été réalisée sur de nombreux tissus et dans des niveaux relativement bas sur des individus âgés. Les pertinences fonctionnelles possibles des ces mutations dans le processus du vieillissement sont largement discutées. Par contre, jusqu'à très récemment, des preuves souvent discordantes et non conclusives étaient disponibles sur l'accumulation de mutations ponctuelles ADNmt dans les individus âgés (Pallotti *et al.* 1996 ; Jazin *et al.* 1996). Depuis quelques années, cependant, l'accumulation de mutations ponctuelles ADNmt dépendantes de l'âge a été démontrée dans la majorité d'individus d'un certain âge (Michikawa *et al.* 1999 ; Calloway *et al.* 2000 ; Wang *et al.* 2001).

Ces mutations se rencontrent principalement dans la région de contrôle ADNmt, aux sites critiques pour la réplication. Certains auteurs estiment que la spécificité tissulaire et la sélectivité des nucléotides de ces mutations soutiendraient l'idée de leur pertinence fonctionnelle (Chomyn et Attardi 2003).



## **1. Les délétions mitochondriales**

Les premières reconnaissances de dommages lors du vieillissement dans l'ADNmt sont apparues avec les découvertes de nombreuses délétions à partir de divers tissus provenant d'adultes humains ou de rats et de leur augmentation progressive avec le vieillissement (Holt *et al.* 1988 ; Piko *et al.* 1988). Ainsi, par analyse PCR, la délétion commune de 4977 pb (paire de bases) caractéristique dans les myopathies mitochondriales ou dans le syndrome de Kearns-Sayre (chronic progressive externe ophthalmoplegia : CPEO) a été détectée dans le muscle squelettique, dans le cœur et dans le cerveau d'individus âgés humains (Holt *et al.* 1988 ; Zeviani *et al.* 1989 ; Cortopassi et Arnheim 1990 ; Corral-Debrinsky *et al.* 1991 ; 1992 ; Cortopassi *et al.* 1992 ; Soong *et al.* 1992). Une forte variation parmi les différentes régions du cerveau de la quantité de molécules délétées a été observée, avec des niveaux supérieurs à 12% dans la substance grise, le noyau caudal et le putamen et à des niveaux plus bas dans le cerebellum (Corral-Debrinsky *et al.* 1992 ; Soong *et al.* 1992). Cette délétion a été détectée dans le tissu osseux de patients présentant des cas d'ostéoporose alors qu'elle était absente dans le tissu sanguin de ces mêmes patients âgés de plus de 60 ans (Pahipa *et al.* 1998).

Une autre délétion importante de 7436 pb a été détectée dans le tissu cardiaque dans le cortex du cerveau et le putamen (Hayakawa *et al.* 1993 ; Soong *et al.* 1992) d'individus âgés ne présentant pas de pathologies et a montré une augmentation du taux de délétion avec l'âge. De manière similaire, une augmentation avec l'âge dans le taux d'une délétion de 6063 pb a été révélée dans l'ADNmt de foie humain (Yen *et al.* 1992) et des multiples délétions de tailles variables dans différents tissus humains comme le cœur et le tissu musculaire (tableau 2 ; Khrapko *et al.* 1999 ; Langping *et al.* 2002).

Tableau 2 : Délétions dans la région codante mitochondriale associées à l'âge dans les tissus humains.

Délétions	Position des nucléotides	Tissus présentant les délétions	références
4977 pb	De 8483 à 13459	Foie, muscle, cerveau, cœur, poumons, rate, rein, peau, sang,	Piko <i>et al.</i> 1988 Zeviani <i>et al.</i> 1989 Cortopassi et Arnheim 1990 Corral-Debrinski <i>et al.</i> 1991 ;1992 Cortopassi <i>et al.</i> 1992 Soong <i>et al.</i> 1992 Meissner <i>et al.</i> 1997; 1999 ;2000 von Wurmb <i>et al.</i> 1998 ; 2002 Pahipa <i>et al.</i> 1998
7436 pb	De 8649 à 16084	Cœur, muscle, foie, peau, cerveau	Corral-Debrinski <i>et al.</i> 1991 Hayakawa <i>et al.</i> 1993 Soong <i>et al.</i> 1992
6063 pb	De 7842 à 13904	Muscle, foie	Yen <i>et al.</i> 1992
5827 pb	De 7993 à 13786	Muscle	Zhang <i>et al.</i> 1992
6335 pb	De 8477 à 14811	Muscle	Zhang <i>et al.</i> 1992
7635 pb	De 8440 à 16074	Muscle	Zhang <i>et al.</i> 1992
8041 pb	De 8035 à 16075	Cerveau	Zhang <i>et al.</i> 1992

L'hypothèse principale dans l'accumulation de mutations ADNmt serait due principalement à la formation de 8-oxodG et d'autres produits du dommage oxydant et pourrait être impliquée dans la génération de longues délétions. En effet, une corrélation claire entre l'accumulation de grandes délétions et l'augmentation âge-dépendante de 8-oxodG a été démontrée dans l'ADNmt du cœur et du muscle du diaphragme (Hayakawa *et al.* 1991 ; 1993).

La délétion de 4977 pb est la mutation sans doute la plus étudiée et dont les techniques d'analyse ont été améliorées pour définir une meilleure détection et quantification. Les premières études ont utilisé des techniques de digestion enzymatique permettant de générer des fragments de taille différente selon la présence ou non de la délétion (Holt *et al.* 1998). Puis des stratégies de PCR avec différentes amorces permettent d'encadrer la délétion et de déterminer le taux de molécules mutées (Cortopassi et Arnheim 1990).

Dans le cadre d'une approche en Médecine Légale, afin de déterminer la présence de ces délétions dans les individus âgés, des analyses de PCR discriminant les molécules mutées et normales ont été effectuées sur le muscle squelettique et sur le sang (Meissner *et al.* 1997 ;

1999 ; von Wurmb *et al.* 1998). Ensuite, ces auteurs utilisent la technique de Real-Time PCR pour améliorer la sensibilité de la détection toujours sur le tissu musculaire et le sang (Meissner *et al.* 2000 ; von Wurmb-Schwark *et al.* 2002). Les niveaux de délétions obtenus sur le tissu musculaire reste très bas (<1%) dans les individus sains comparés aux niveaux enregistrés chez les patients atteints de maladies transmises (Cortopassi *et al.* 1992 ; Corral-Debrinski *et al.* 1992). Dans le cadre de la Médecine Légale, Meissner *et al.* (1999) ont proposé que leur méthode puisse aider, dans une estimation de l'âge au décès, pour la discrimination des individus jeunes et âgés dans le cadre d'une identification de restes humains mais seulement à partir du tissu musculaire.

Avec le développement de la technique de Real Time PCR, la détection des molécules mutées est beaucoup plus sensible et permet une quantification relative (Langping *et al.* 2002). La recherche de délétions avec cette technique sur des patients avec des maladies mitochondriales a révélé différents modèles d'anormalités entre patients. Des niveaux de délétions élevés, de l'ordre de 60%, ont été quantifiés dans les fibres musculaires déficientes par rapport aux fibres musculaires normales d'un même sujet. Une autre approche possible a été réalisée par Khrapko *et al.* (1999). Ils ont isolé des cellules de muscle cardiaque de différents individus après des prélèvements lors d'autopsies. Ils ont effectué de longues PCR englobant la totalité du génome mitochondrial et détecté les délétions dans une proportion de 2 à 15% des cellules des 4 donneurs centenaires, ce qui représente une proportion de variants ADNmt compris entre 11% et 64%, et constaté leurs absences dans les 3 sujets de 31 à 72 ans.

Il faut noter qu'une étude récente sur la délétion 4977pb (Thayer *et al.* 2003) a évalué la possibilité d'une transmission maternelle des délétions dans des leucocytes humains. Cette étude a recherché la présence de la « délétion commune » de 4977 pb dans des lignées maternelles humaines, représentées par 21 familles incluant 4 générations. En utilisant une PCR multiplex (plusieurs amorces sont incluses dans la même réaction permettant l'amplification de plusieurs régions de l'ADNmt), les auteurs ont identifié la présence de la délétion 4977 pb dans les leucocytes de 71 individus d'un âge compris entre 8 mois et 99 ans. Ces résultats positifs incluent tous les enfants (n=15) et ceux-ci ne présentaient pas de maladies mitochondriales connues. Ces résultats nous questionnent sur la signification de cette délétion de 4977 pb comme marqueur universel du vieillissement et démontre la possibilité d'une transmission maternelle des délétions en dehors des maladies.

## **2. Les mutations ponctuelles sur la région codante**

De nombreuses mutations ponctuelles dans la région codante de l'ADNmt ont été associées avec des pathologies (Servidei 2002). Cependant, les recherches de mutations ponctuelles dépendantes de l'âge dans l'ADNmt, dans les régions codante et de contrôle ont souvent donné des résultats discordants. Ceci pourrait être le reflet du choix des méthodes utilisées et de leur sensibilité de détection des mutations sous forme d'hétéroplasmie.

En fait, les premières recherches de mutations ponctuelles en relation avec le vieillissement se sont exclusivement limitées à la mise en évidence de mutations pathogéniques dans des individus normaux et âgés. Ainsi, la transition A→G de la position 8344 située sur le gène mitochondrial codant l'ARN de transfert de la lysine (tRNALys) est associée avec une encephalomyopathie appelée MERRF (myoclonic epilepsy and ragged red fibers). Une accumulation dépendante de l'âge dans le tissu musculaire d'individus sains âgés a été démontrée (Münscher *et al.* 1993 ; Kadenbach *et al.* 1995), le taux de mutation étant supérieur à 2% de la totalité de l'ADNmt (figure 17). Les techniques employées dans ces deux études est une analyse PCR avec des amorces différentes puis une digestion et une migration des fragments présentant des polymorphismes de longueur (RFLP).

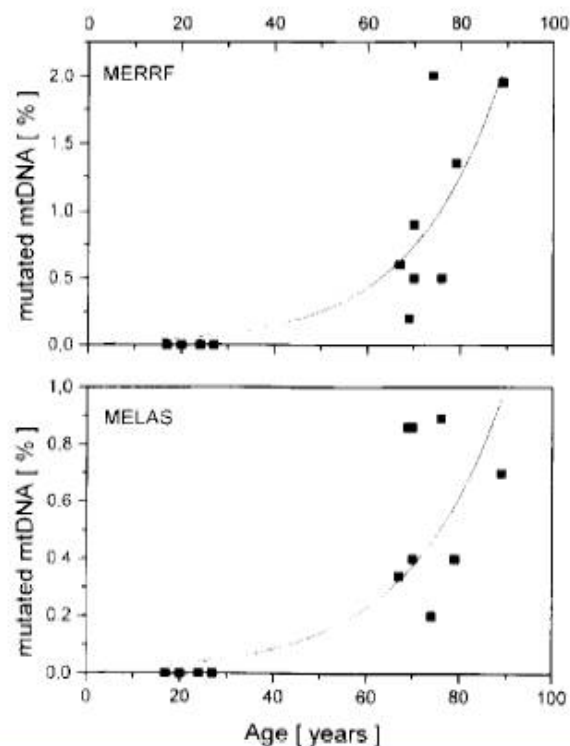


Figure 17 : Analyse quantitative des mutations ponctuelles A8344G (MERRF) et A3243G (MELAS) dans le muscle d'individus sains de différents âges. Selon Kadenbach *et al.* 1995 *Mutation Research* 338 : 161-172.

Une autre mutation ponctuelle de la région codante, la transition A→G à la position 3243 est associée à un ensemble de syndromes (MELAS : mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes) et se situe sur le gène mitochondrial codant l'ARN de transfert de la leucine (tRNA<sup>Leu</sup>). Cette mutation s'accumule aussi dans les tissus d'individus sains âgés d'un ordre supérieur à 1% dans le tissu musculaire, le cœur, le rein (figure 17 ; Zhang *et al.* 1993 ; Kadenbach *et al.* 1995). Mais la reconnaissance d'une accumulation avec l'âge de la mutation A3243G ainsi que la mutation T8993G reste controversé par l'étude de Pallotti *et al.* (1996) sur le tissu musculaire. En effet par une méthode de PCR semi-quantitative suivit d'une digestion enzymatique, ils démontrent que l'accumulation des deux mutations sous forme d'hétéroplasmie ne montrent pas une corrélation avec l'âge en étudiant 13 individus (de 1 à 70 ans) alors que la délétion 4977pb est présente dans les individus âgés dans un ordre de 0,05%. Les études qui suivirent, reprenant les mêmes types tissulaires ainsi que le sang (Liu *et al.* 1997 ; 1998 ; Nomiya *et al.* 2002) mais utilisant des techniques de détection beaucoup plus sensible démontrèrent l'accumulation avec l'âge de la mutation A3243G (tableau 3). Le principe de la technique AS-PCR (Allele-specific PCR) est basée sur l'exploitation d'une grande différence dans l'efficacité de l'extension à partir de la fin 3' de l'amorce. Dans les complexes matrice-amorce l'efficacité d'extension variera selon un

appariement parfait ou imparfait à l'extrémité 3' de l'amorce. Dans le cas particulier de la position 3243 A→G, l'amorce oligonucléotidique présentera à la position 3' la mutation particulière recherchée (G : amorce mutante). Cette amorce amplifiera sélectivement les molécules mutantes à une température critique d'hybridation lors de la PCR permettant la discrimination des deux types de molécules. On peut ainsi obtenir une discrimination d'un niveau très bas de molécules mutantes (Liu *et al.* 1997 ; 1998). Une autre technique très sensible a permis de mettre en évidence la mutation A3243G, c'est la technique de Real Time PCR associant une sonde TaqMan (Nomiyama *et al.* 2002). Cette étude a été réalisée sur des cellules sanguines d'individus sains et diabétiques et a démontré une accumulation de cette mutation dans les individus âgés. L'amélioration dans la sensibilité des techniques de détection a permis de confirmer l'accumulation avec l'âge de la mutation A3243G dans des individus sains.

Cette mutation a été aussi étudiée dans le cas de transmission maternelle sur plusieurs tissus d'individus atteints du syndrome MELAS (voir chapitre 1.3) et a montré aussi une accumulation tissu-spécifique qui pourrait être liée au renouvellement cellulaire propre à chaque tissu (Chinnery *et al.* 1999).

Plus récemment, une accumulation convergente des mutations A8344G et A3243G et de deux autres mutations sur des gènes tRNA (G4421A et T4460C) incluant aussi une délétion ont été mis en évidence dans des fibres musculaires isolées d'individus âgés (Fayet *et al.* 2002). Les points de mutation sur la région codante sont recherchés par la technique DGGE (Denaturant Gel Gradient Electrophoresis), une technique très sensible qui permet de mettre en évidence des mutations ponctuelles au niveau d'un gène. Le principe est que des produits de PCR particuliers sont formés si des mutations sont présentes sur l'ADN initial. Nous serons donc en présence de différents produits de PCR lors d'une amplification. La température de fusion ( $T_m$  : melting temperature) d'un produit PCR (qui est un ADN double brin) est fonction de sa séquence. Donc une mutation ponctuelle entraîne un changement de séquence qui entraîne une modification du  $T_m$ . Cette modification est mise en évidence par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en présence d'un gradient d'agent dénaturant. On peut ainsi détecter des "hétéroduplex" sur un gel dans des conditions de discrimination proche de 2 à 4% de mutations (Michikawa *et al.* 1997).

Tableau 3 : Mutations ponctuelles dans la région codante ADNmt associées à l'âge dans les tissus humains.

Mutations ponctuelles	Position des nucléotides	Tissus présentant les mutations	références
A3243G	3243	Muscle, cœur, rein, sang	Zhang <i>et al.</i> 1993 Kadenbach <i>et al.</i> 1995 Liu <i>et al.</i> 1997 ; 1998 Nomiya <i>et al.</i> 2002 Fayet <i>et al.</i> 2002
A8344G	8344	Muscle	Münscher <i>et al.</i> 1993 Kadenbach <i>et al.</i> 1995 Fayet <i>et al.</i> 2002
G4421A	4421	Muscle	Fayet <i>et al.</i> 2002
T4460C	4460	Muscle	Fayet <i>et al.</i> 2002

Comme nous pouvons le constater, les taux de ces délétions sous forme d'hétéroplasmie restent très bas sur les individus sains, et leur signification dans le processus de vieillissement reste largement débattue.

### **3. les mutations sur la région D-Loop**

La région de contrôle de l'ADNmt humain (D-Loop) est une portion non codante du génome mitochondrial, et contient deux régions hypervariables appelées HV1 et HV2 (Greenberg *et al.* 1983). Comme vu précédemment, l'hétéroplasmie de l'ADNmt a été fréquemment associée aux pathologies dégénératives chroniques, mais des niveaux faibles ont été aussi mis en évidence sur des individus ne présentant pas de symptômes (Münscher *et al.* 1993 ; Wallace 1994b ; Kadenbach *et al.* 1995 ; Zhang *et al.* 1993).

Un ensemble de duplications en tandem de séquences dans la région de contrôle ADNmt ont été décrites en premier lieu dans des patients atteints de myopathies mitochondriales associées à des délétions (Brockington *et al.* 1993). La duplication de 260 pb est un polymorphisme de longueur sous forme d'hétéroplasmie présente dans la région D-Loop qui contrôle la réplication et la transcription de l'ADNmt. Elle est représentée par la répétition d'une petite séquence de 6 bases cytosine de la position 311/316 à la position 568/573. Cette mini-duplication de 260 pb et plusieurs autres ont été détectés dans des individus âgés sans

pathologies (Lee *et al.* 1994 ; Wei *et al.* 1996), pouvant suggérer que ces mini-duplications sont des évènements moléculaires précoces dans le processus de vieillissement humain. Une autre duplication en tandem de 200 pb a été décrite associée avec une mutation sur la région codante du cytochrome b. Il a été proposé une relation entre la formation des mini-duplications et la déficience de la chaîne respiratoire qui s'expliquerait par une possible augmentation de la production de radicaux libres. La déficience de la chaîne respiratoire ayant une origine génétique, par la présence de délétions ou de mutations ponctuelles sur la région codante de l'ADNmt (Bouzidi *et al.* 1998). Plus récemment, une étude a démontré la présence de mini-duplications (de 150 à 650 pb) dans la région de contrôle sur des patients avec des délétions et sur des individus sains contrôles (Tengan *et al.* 2002). La détection de 4 types de mini-duplications a été estimée (tableau 4) et il a été constaté que les patients avec des délétions n'avaient pas de proportions plus élevées ou un nombre plus important de mini-duplications par rapport aux individus contrôles. Par contre, le nombre de mini-duplications (deux et plus) est augmenté dans les patients et les individus contrôles de plus de 40 ans, ce qui démontre la relation avec l'âge de ces mini-duplications dans le tissu musculaire (figure 18).

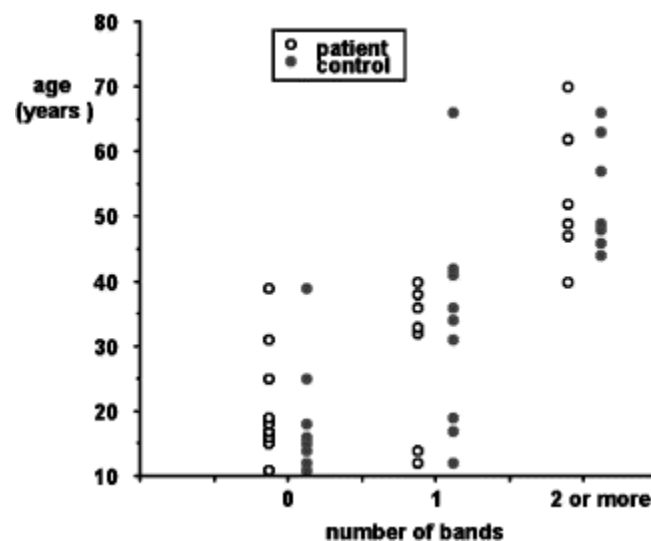


Figure 18 : Nombre de bandes détectées dans les groupes de patients et de contrôles.

*Les amorces utilisées pour l'amplification des mini-duplications ont amplifié une, deux ou trois bandes dans le même patient. Le graphique démontre que le nombre de bandes détectées n'est pas augmenté dans les patients mais deux ou trois bandes sont détectées dans les patients et les contrôles d'un âge supérieur à 40 ans. Selon Tengan et al. 2002 Biochimica et biophysica acta 158 : 65-70.*



Tableau 4 : Mini-duplications de séquences dans la région D-Loop associées à l'âge dans les tissus humains.

Duplications	Position des nucléotides	Tissus présentant les mini-duplications	références
260 pb	311/567	Muscle, peau et foie	Brockington <i>et al.</i> 1993 Lee <i>et al.</i> 1994 Wei <i>et al.</i> 1996 Tengan <i>et al.</i> 2002
150 pb	309/465	Muscle	Tengan <i>et al.</i> 2002
190/200 pb	301/493	Muscle et peau	Bouzidi <i>et al.</i> 1998 Lee <i>et al.</i> 1994 Tengan <i>et al.</i> 2002
650 pb	305/956	Muscle	Tengan <i>et al.</i> 2002

Une étude très informative sur l'accumulation de mutations ponctuelles mitochondriales dans la région D-Loop en relation avec l'âge fût publiée en 1996 (Jazin *et al.*), la technique de détection très sensible utilisée est la technique DGGE puis le séquençage automatique. Les résultats ont révélé des niveaux d'hétéroplasmies élevées, de l'ordre de 34-45%, sur des positions d'une seule base dans des individus très âgés (98 et 99 ans), et des niveaux très réduits sur les plus jeunes. Ces hétéroplasmies ponctuelles de la région non-codante sont détectées dans deux régions du cerveau et sont absentes dans les cellules sanguines d'un même individu. Ainsi, l'hétéroplasmie dans la région D-Loop semble être plus fréquente dans les tissus post-mitotiques. Cela démontre aussi que les niveaux d'hétéroplasmies sont beaucoup plus élevés dans la région non-codante. Les positions mutées sous forme d'hétéroplasmies correspondent aussi à des positions reconnues comme des polymorphismes (figure 19). Les trois grands groupes de position commune sur la région D-Loop correspondent aux positions 140-160 ; 180-200 et 309-320.

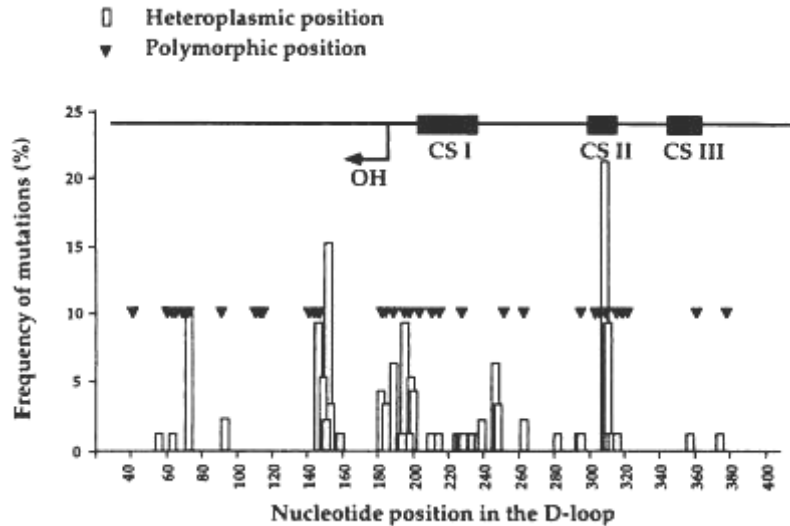


Figure 19 : Distribution des hétéroplasmies et des polymorphismes dans le région D-Loop.

*OH : origine de réplication du brin H. CS I, II, et III : blocs de séquences conservés. Selon Jazin et al. 1996 Proc Natl Acad Sci USA 93 : 12382-12387.*

Les segments de la région D-Loop montrant les niveaux les plus élevés de polymorphismes contiennent aussi une grande proportion de sites d'hétéroplasmies, par exemple pour les nucléotides inclus dans les positions 180-200, qui appartiennent à l'origine de réplication de l'ADNmt. La similarité dans les modèles de substitution et de distribution entre les sites de polymorphismes et d'hétéroplasmies pourrait indiquer que les mêmes mécanismes mutationnels sembleraient impliquer dans leurs générations (ou apparitions).

Dès cette première étude, on constate que les points essentiels dans l'étude de mutations liées au vieillissement sont posés : les mutations somatiques, sous forme d'hétéroplasmies, sont présentes seulement dans des individus âgés, les taux sont plus élevés dans la région non codante, elles s'accumulent dans des tissus post-mitotiques, sur les mêmes positions reconnues dans les polymorphismes individuels. Une technique de détection sensible et fiable permet de valider ces mutations.

Les travaux qui suivirent démontrèrent une accumulation dépendante de l'âge de nombreuses mutations ponctuelles (Michikawa *et al.* 1999). Pour cela, les auteurs ont choisi d'analyser plusieurs segments de la région de contrôle ADNmt par DGGE. Leur hypothèse de départ était que la région de contrôle est le segment le plus variable dans l'évolution, et qu'il semblerait plausible que les mécanismes opérant lors de l'évolution pourraient aussi agir pendant le vieillissement. En fait, si la plupart des polymorphismes attribués aux changements

au cours de l'évolution, ils pourraient être actuellement des mutations somatiques qui apparaissent au cours de la vie de l'individu.

Michikawa et ses collègues réalisent une recherche systématique de mutations ADNmt dépendantes de l'âge dans la région de contrôle de fibroblastes de peau humains sur 30 d'individus âgés de quelques semaines à 101 ans. Cette recherche a révélé un nombre important de mutations, incluant des changements de nucléotides uniques dans des proportions bas, des changements de longueur de motifs répétés de  $(CA)_n$  ( $n=5$  dans les formes normales ou Wild-type), ou des ses variations du nombre de résidus cytidine dans la partie D310 (Homopolymeric tract D310). Ces trois types de mutation se rencontrent dans les deux groupes d'âges, inférieur ou supérieur à 50 ans, mais avec une tendance augmentée de leurs incidences dans les individus les plus âgés. La classe de mutations la plus intéressante est représentée par les mutations ponctuelles, qui sont présentes sur des positions spécifiques de l'ADNmt, seulement sur les individus âgés de plus de 65 ans, et dans des taux inclus entre 20 et 50%.

Dans les fibroblastes de peau, la mutation ponctuelle la plus fréquente est la transversion T414G qui est trouvée dans 8 des 14 individus de plus de 65 ans soit 57% des sujets et est absente dans les plus jeunes. La distribution par l'âge et les résultats de deux prélèvements effectués sur le même individu dans un intervalle d'âge compris entre 15 et 19 ans ont indiqué que les mutations ne sont pas héritées (Chomyn et Attardi 2003). De plus, la possibilité que l'apparition ou l'amplification de ces mutations soit due aux conditions *in vitro* a été exclue. En effet, dans le cas de la transversion T414G, l'observation *in vitro* pendant 2,5 mois, sur trois cultures de fibroblastes provenant d'individus âgés a montré une diminution progressive des proportions de cette mutation (Michikawa *et al.* 2002). Ces trois cultures n'ont pas révélé l'apparition de nouveau évènement mutationnel lors de ces trois mois de croissance *in vitro*, ce qui précise l'importance de l'environnement *in vivo* dans l'apparition et l'amplification de ces mutations spécifiques dans les fibroblastes de peau humain.

La mutation sous forme d'hétéroplasmie T414G a été recherchée dans d'autres types tissulaires, notamment dans des tissus post-mitotiques tel que le muscle et le cerveau (Murdock *et al.* 2000). L'étude est effectuée à partir d'individus de 19 à 71 ans à l'aide d'une technique très sensible de sonde PNA (peptid nucleic acid) appliquée lors de la PCR et qui permet la détection de mutations sur l'ADNmt dans des niveaux très faibles d'hétéroplasmies. Cette méthode est extrêmement spécifique, elle permet l'élimination de faux positifs en l'absence de molécules mutantes, et est très sensible puisque elle permet la détection des

mutations dans des niveaux de 1% (le principe de cette technique et son application seront discutés dans l'introduction des résultats expérimentaux). Cette technique a permis de mettre en évidence, après une digestion enzymatique supplémentaire, des proportions de molécules mutantes 414G plus élevées dans les individus d'un âge supérieur à 50 ans dans le muscle et son absence dans le cerveau. Un criblage de la distribution de cette mutation dans plusieurs tissus des mêmes individus âgés ont révélé sa présence dans la peau, mais son absence dans le muscle squelettique, le cœur, la rate et dans les ganglions lymphatiques (Wang *et al.* 2001). Les études suivantes confirmeront son absence ou une présence marginale dans le muscle, le cerveau et les leucocytes (Wang *et al.* 2001 ; Chinnery *et al.* 2001 ; Zhang *et al.* 2003).

De façon intéressante, une analyse de la région de contrôle ADNmt de fibroblastes de peau provenant de patients atteints du syndrome de Down, qui présentent des signes précoces de vieillissement, a été réalisée (Del Bo *et al.* 2001). La mutation T414G a été détectée avec des niveaux différents d'hétéroplasmies (de 5 à 70%) dans 4 des 9 patients âgés de plus de 45 ans, mais était absente dans les 12 sujets jeunes. La comparaison avec un groupe d'individus non atteints montre que la moyenne d'âge des sujets positifs T414G et atteints du syndrome est significativement plus basse que les individus positifs T414G contrôles (48 ans et 66 ans respectivement).

Une étude de mutations ponctuelles dans le tissu musculaire a été réalisée par Calloway et collègues (2000) à l'aide d'une technique de sondes immobilisées SSO (sequence specific oligonucleotide) suivit d'un séquençage automatique. Cinq types tissulaires ont été prélevés lors d'autopsies : sang, muscle, cœur, et cerveau sur 43 individus d'un âge compris entre 11 et 85 ans et les deux régions hypervariables II sont analysés avec 16 sondes qui détectent les variations de séquence. Sur les 6 individus de 60 ans analysés avec cette technique SSO, 4 présentaient des hétéroplasmies alors qu'une seule hétéroplasmie était détectée sur un individu de moins de 60 ans parmi 21. Afin de vérifier les hétéroplasmies, les échantillons de sang, de muscle, de cœur et de cerveau furent analysés par séquençage automatique à partir des cinq individus précédents. Une mutation prépondérante apparaît dans le tissu musculaire avec la technique de séquençage automatique, la transition A189G qui est présente dans les 4 individus âgés de plus de 60 ans alors qu'elle est absente dans les autres tissus (figure 20). D'autres mutations ponctuelles apparaissent dans le tissu musculaire mais dans des proportions plus faibles, ce sont les mutations C64A, T72C et A73G. Ces hétéroplasmies correspondent à des positions de polymorphisme de séquence sur HVII. Le niveau d'hétéroplasmie de A189G est proche de 50% dans les individus âgés, et est seulement

détectée dans le tissu musculaire et dans aucun autre tissus, dans la limite de détection des deux techniques. Par conséquent, la mutation A189G dans le tissu musculaire serait due à une mutation somatique suivit par une amplification de la mutation et non à une mutation transmise.

Ainsi, nous constatons que l'apparition et l'accumulation de mutations somatiques dans des taux élevés peut avoir lieu plus probablement dans un tissu post -mitotique comme le muscle, le cerveau ou le cœur mais aussi dans un tissu avec une demande énergétique forte et donc soumis à une production de radicaux libres plus importante.

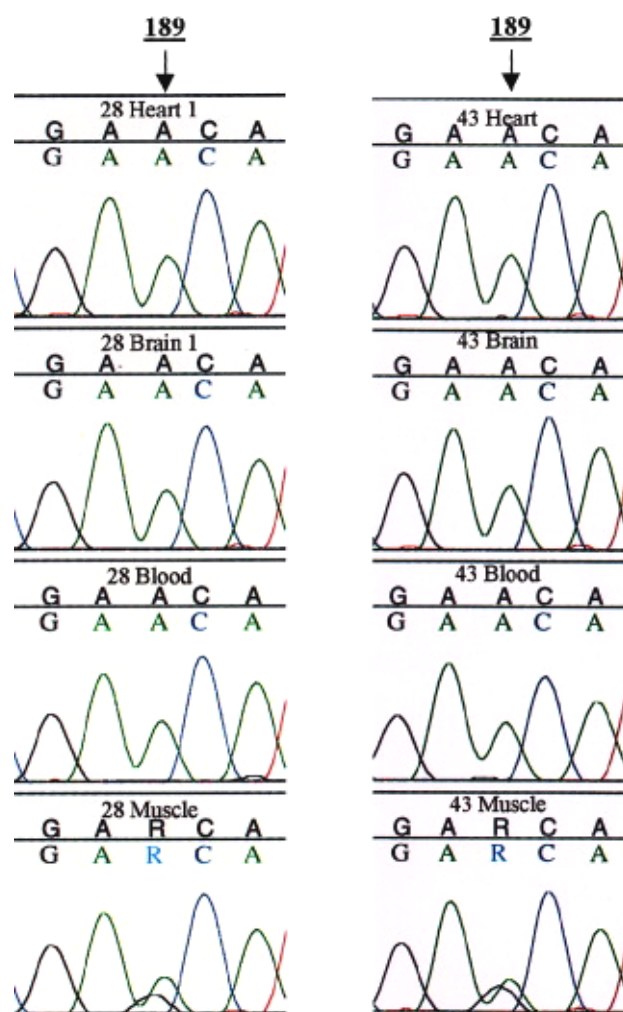


Figure 20 :La technique de séquençage démontre l'hétéroplasmie A189G.

*Elle est détectée dans deux individus (28= 63ans ; 43= 81ans) et dans le tissu musculaire exclusivement. Selon Calloway et al. 2000 Am J Hum Genet 66 : 1384-1397.*

En ce qui concerne le cinquième individu présentant des hétéroplasmies en position 152, celle-ci est démontrée présente dans les trois types tissulaires analysées (cœur, cerveau et sang). L'hypothèse la plus probable de la présence de cette hétéroplasmie est celle d'une transmission maternelle. Des prélèvements provenant de la mère n'étant pas accessibles, les auteurs ont proposé que l'hétéroplasmie observée puisse être un événement de mutation précoce lors de l'ovogenèse ou le développement précoce du zygote. Ils estiment que une mutation somatique est improbable car l'hétéroplasmie est détectée dans tous les tissus accessibles de cet individu (Calloway *et al.* 2000).

Dans la continuité des études sur le tissu musculaire, le groupe de travail ayant mis en évidence la mutation T414G (Michikawa *et al.* 1999) a réalisé une analyse de 42 individus d'un âge inclus entre 19 et 92 ans, en réutilisant la technique DGGE sur les mêmes segments cibles de la région de contrôle (Wang *et al.* 2001). Ils démontrent l'accumulation de deux mutations spécifiques, A189G et T408A, dans les individus d'un âge supérieur à 53 ans dans le tissu musculaire. Les taux d'hétéroplasmies de chaque mutation seraient inclus entre 5 et 50% pour la position 189, et de 12% maximum pour la position 408. Ces résultats sont confirmés dans l'analyse de 91 individus de différents âges dont 70 patients atteints d'encephalomyopathies mitochondriales comparés à 21 individus sains (Del Bo *et al.* 2002). Les deux mutations s'accumulent significativement avec l'âge dans l'ensemble des sujets et dans des taux identiques à l'étude précédente (Wang *et al.* 2001). Ces résultats démontrent que l'accumulation de mutations ponctuelles somatiques dans le muscle squelettique a lieu dans des conditions pathologiques et normales (figure 21). L'âge resterait le plus important facteur de risque, sans exclure les associations génotype-phénotype pour moduler la progression de l'accumulation. Les auteurs de ce travail soutiennent l'idée qu'un mécanisme biologique commun pourrait déterminer l'accumulation de mutations somatiques dans la région D-Loop, dans les sujets sains et chez les patients de myopathies mitochondriales (Del Bo *et al.* 2002).

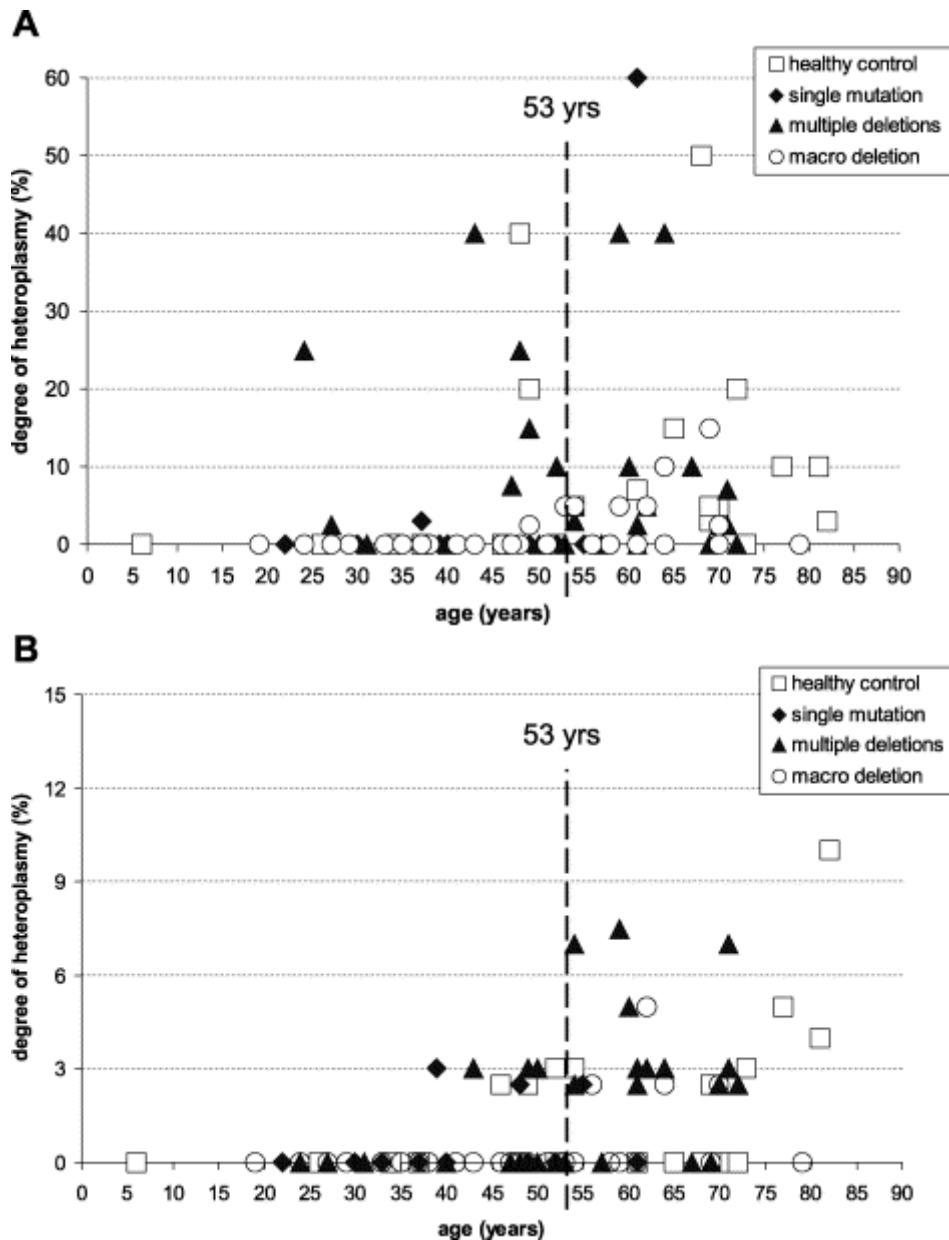


Figure 21 : Graphes représentant la distribution par âge des mutations A189G (A) et T408A (B).

Analyse sur le tissu musculaire de 91 individus. Selon Del Bo et al. 2002 *Journal of the neurobiological sciences* 202 : 85-91.

Afin de déterminer s'il existe une corrélation entre les mutations sur la région D-Loop et l'activité oxydase du complexe du cytochrome C (COX : cytochrome c oxidase) le même laboratoire a analysé des fibres musculaires d'individus âgés sains (Del Bo *et al.* 2003). Le tissu musculaire d'individus âgés présente une mosaïque de fibres quand elles sont colorées chimiquement pour une activité COX, avec une proportion de fibres négatives COX. Les auteurs ont donc analysé la corrélation entre la présence de mutations et leur degré d'hétéroplasmie et le phénotype COX sur des fibres musculaires individuelles de 4 donneurs sains âgés de 81 à 97 ans. La technique employée est aussi une technique de clonage de la région D-Loop de chaque cellule musculaire et l'analyse par séquençage. Les mutations

récurrentes A189G et T408A sont présentes ainsi que la transversion T414G dans toutes les fibres musculaires (figure 22) dans des taux inclus entre 5% et 65%.

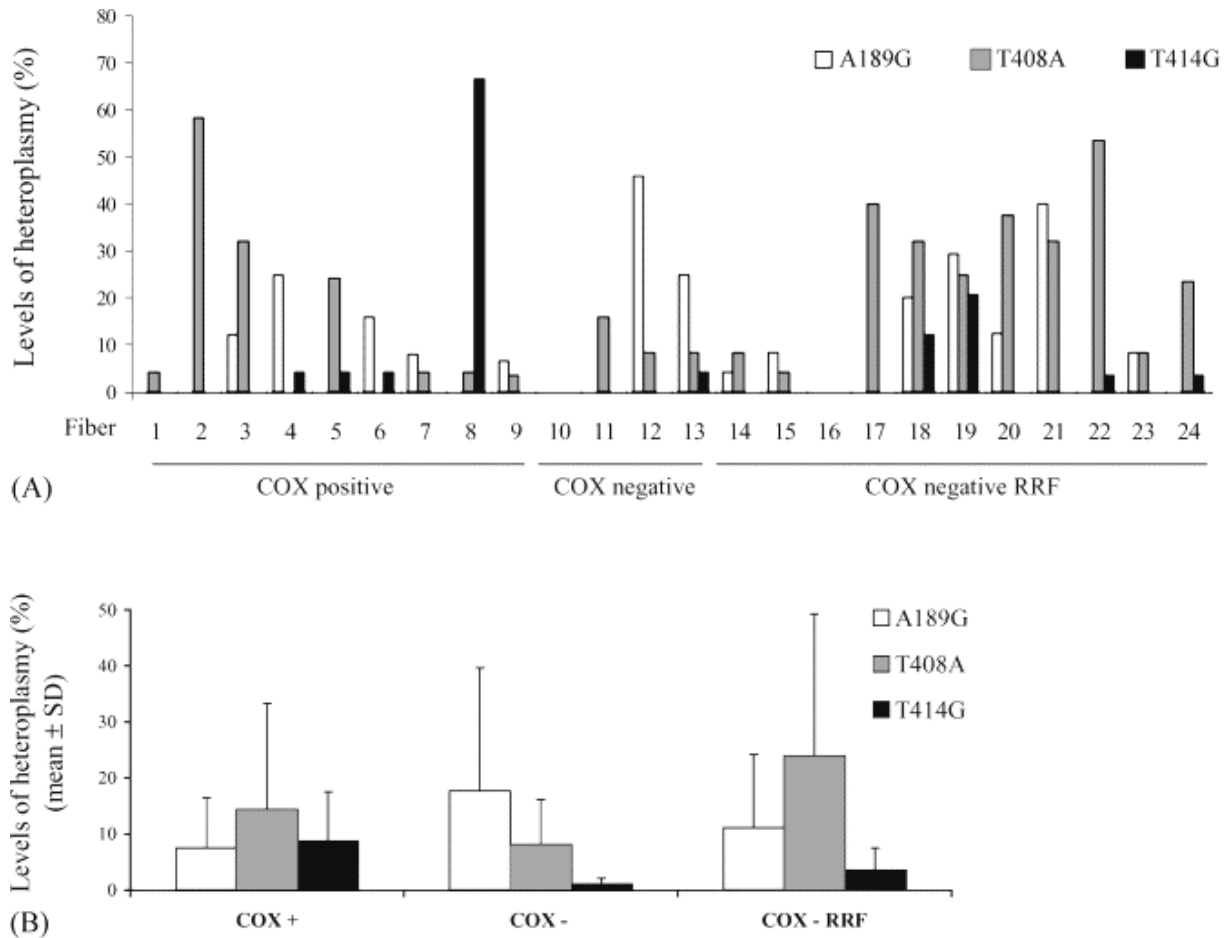


Figure 22 : A :Représentation des différents pourcentages d'hétéroplasmies des mutations dépendantes de l'âge.  
B : Pourcentage moyen d'hétéroplasmies pour chaque mutation dépendante de l'âge.

*Selon le phénotype histochimique. Aucune différence statistiquement significative n'a été détectée (test de student). Selon Del Bo et al. 2003 Neurobiology of Aging 24 : 829-838.*

L'ensemble des mutations détectées (incluant les substitutions, les variations D310, les répétitions (CA)<sub>n</sub> et les macro-délétions) sont corrélées avec les phénotypes COX des fibres, suggérant que les altérations ADNmt pourraient jouer un rôle fonctionnel dans la génétique mitochondriale.

Une étude très récente (Cormio *et al.* 2005) a évalué les changements ADNmt sur des fibres musculaires normales et des fibres RRF (RRF : ragged red fibers qui est le phénotype des fibres musculaires avec une prolifération anormale mitochondriale) sur des individus sains



d'un âge compris entre 45 et 92 ans. Les substitutions de séquence de la région D-Loop sont présentes dans les deux types de fibres musculaires (figure 23).

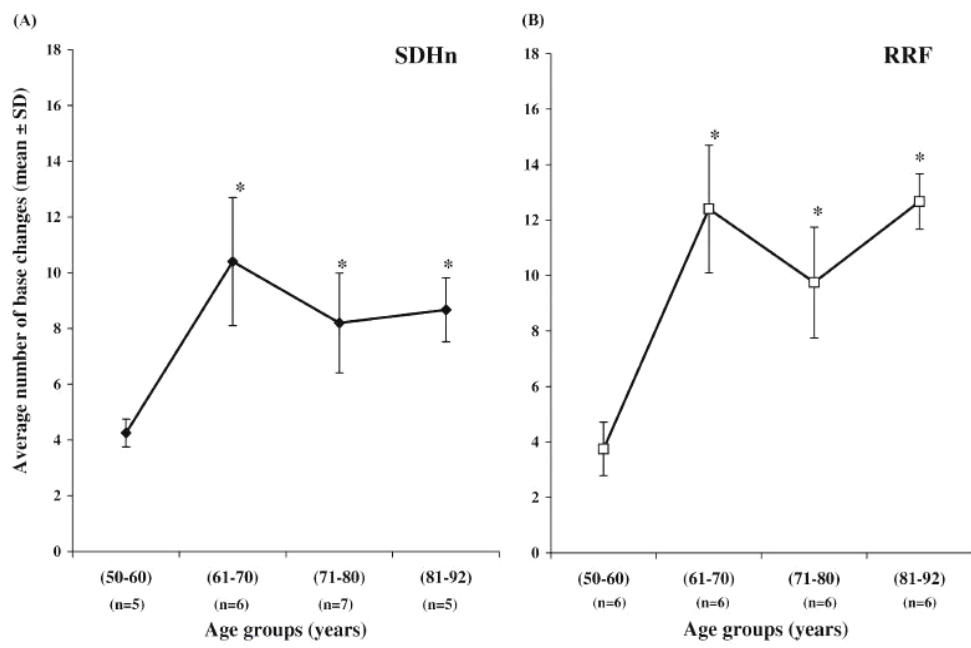


Figure 23 : Effet de l'âge sur le nombre moyen de changements de base dans la région D-Loop sur les fibres musculaires. *SDHn* : fibres normales. *RRF* : ragged red fibers. *n* : nombre de fibres analysées dans chaque groupe d'âge. Selon Cormio *et al.* 2005 *Neurobiology of aging* 26 : 655-664.

Une différence statistique significative est observée entre le groupe de 50-60 ans et les autres groupes d'âges pour les deux types de fibres ( $*P < 0,05$  ; test de student). Les changements sont plus abondants dans les fibres RRF, leurs nombres augmentent après 60 ans et ensuite restent constants (figure 23). En particulier la mutation A189G est trouvée seulement dans les individus âgés de plus de 60 ans dans des proportions de 20 à 50% et avec des taux plus élevés dans les fibres RRF.

Une analyse de séquence très spécifique à partir de cellules isolées provenant de tissus cardiaques musculaires et de prélèvements buccaux a été réalisée sur la région de contrôle ADNmt (Nekhaeva *et al.* 2002). Elle démontre la présence de mutations ponctuelles dans les cardiomyocytes d'individus âgés (de 51 à 109 ans) dans des proportions de 25 à 100% pour une cellule donnée. On peut remarquer la présence de la mutation A189G de l'individu âgé de 109 ans dans des proportions de 58 à 71 %. Dans les cellules buccales se sont des insertions de résidus cytidine dans la partie D310 qui sont caractérisées dans les individus âgés. Sur les cardiomyocytes, la technique de séquençage cellule par cellule révèle surtout une expansion

clonale d'une mutation ponctuelle ou d'une autre dans la région 16025-16055 et leurs absences dans un nombre similaire de cellules provenant d'individus jeunes. Il faut noter que seulement une mutation par cellule est observée.

Un étude très complète, de la région de contrôle ADNmt sur des leucocytes d'un grand groupe d'individus incluant 52 centenaires, a permis de mettre en évidence la transition C150T, dans une forme homoplasmique ou proche de l'homoplasmie sur les sujets très âgés (Zhang *et al.* 2003). Cette mutation était observée dans 17% des 52 sujets de 99 à 106 ans et au contraire de seulement 3,7% dans les 117 jeunes individus.

La démonstration que la transition C150T était un phénomène somatique a été réalisée dans cette même recherche par l'observation de fibroblastes dans cinq études longitudinales. Dans l'ensemble des échantillons de fibroblastes, la mutation C150T était observée sous une forme homoplasmique ou hétéroplasmique dans 28% de l'ensemble des échantillons, avec une apparente augmentation avec l'âge. Les auteurs ont pu effectuer une étude longitudinale en prélevant par deux fois des fibroblastes, sur un même individu, dans des intervalles de temps inclus entre 9 et 19 ans, ce qui leur a permis d'évaluer l'origine somatique ou transmise de la transition dans ce type tissulaire. Sur 5 études longitudinales, ils ont pu constater que la mutation apparaît sous une forme d'hétéroplasmie, ou devient plus abondante dans sa forme hétéroplasmique, aboutissant même à l'homoplasmie sur un échantillon. Ceci met en évidence le rôle d'évènements somatiques dans ce phénomène (Zhang *et al.* 2003).

De plus, la présence de la transition C150T aurait causé le déplacement d'une nouvelle origine de réplication dans les fibroblastes et les lymphocytes immortalisés à la position 149, se substituant à la position normale 151 (Zhang *et al.* 2003).

Les leucocytes analysés ne présentent pas les mutations spécifiques du tissu musculaire (tableau 5).

Tableau 5 : Mutations ponctuelles de la région D-Loop associées à l'âge dans les tissus humains.

Mutations ponctuelles	Position des nucléotides	Tissus présentant les mutations	références
Substitutions sous forme d'hétéroplasmies	141-147 183-198 304-310	cerveau	Jazin <i>et al.</i> 1996
T414G	414	Fibroblastes de peau, muscle	Michikawa <i>et al.</i> 1999 Murdock <i>et al.</i> 2001 Del Bo <i>et al.</i> 2001; 2003
A189G	189	Muscle	Calloway <i>et al.</i> 2000 Wang <i>et al.</i> 2001 Del Bo <i>et al.</i> 2002; 2003 Cormio <i>et al.</i> 2005
T408A	408	Muscle	Wang <i>et al.</i> 2001 Del Bo <i>et al.</i> 2002; 2003
C150T	150	Leucocytes, fibroblastes de peau	Zhang <i>et al.</i> 2003
C64A T72C A73G	64 72 73	Muscle	Calloway <i>et al.</i> 2000
T146C T152C T195C	146 152 195	Fibroblastes de peau	Michikawa <i>et al.</i> 1999
Substitutions sous forme d'hétéroplasmies	16025-16055	Cœur	Nekhaeva <i>et al.</i> 2000
Insertion C	D310	Cellules buccales	Nekhaeva <i>et al.</i> 2000

Comme vu dans la figure 24, l'ensemble des mutations ponctuelles spécifiques décrites sont localisées sur des sites critiques pour la réplication de l'ADNmt. Ainsi, la mutation T414G se trouve au milieu du promoteur LSP (LSP : promoteur pour la transcription du brin L et synthèse de l'amorce RNA pour la synthèse du brin H), tandis que les mutations aux positions 189, 195, 146, 150 et 152 sont très proches de l'origine primaire (OH1 : nucléotide 191) et de l'origine secondaire (OH2 : nucléotides 147-151) de la synthèse du brin H.

Selon les auteurs, la localisation de ces mutations pourraient indiquer leur pertinence fonctionnelle, et ont proposé une hypothèse selon laquelle ces mutations ponctuelles somatiques dépendantes de l'âge pourraient jouer un rôle dans la longévité (Zhang *et al.* 2003 ; Chomyn et Attardi 2003).

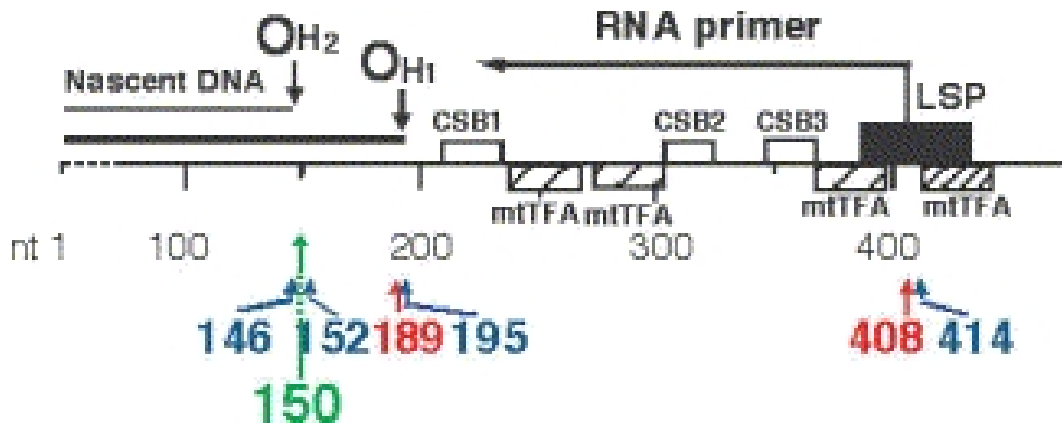


Figure 24 : Position des mutations somatiques tissu-spécifique identifiées dans la région de contrôle ADNmt humain. Bleu : dans les fibroblastes. Rouge : dans le tissu musculaire. Vert : dans les leucocytes. Selon Zhang *et al.* 2003 *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 1116-1121.

Ainsi, les substitutions sous forme d'hétéroplasmies ADNmt/âge sont tissu-spécifique et présentes dans des niveaux élevés dans ces tissus.

Il apparaît que chaque tissu peut accumuler sa propre et unique mutation somatique dans la région de contrôle, mais une part de ces variants pourrait être aussi transmis.

Les mutations somatiques ADNmt de la région de contrôle sont délétères et contribuent au vieillissement dans leur tissu d'origine, mais la mutation C150T serait avantageuse dans les fibroblastes de peau des centenaires.

Ces mutations somatiques sont aussi décrites comme transmises dans des haplogroupes mitochondriaux.

Il est clair que les mêmes mutations peuvent se rencontrer dans les cas d'accumulation somatique tissu-spécifique et de transmission maternelle. Cette ambiguïté implique une grande fiabilité des séquences de la région de contrôle lors d'identification individuelle.

## **Conclusion sur les mutations de l'ADN mitochondrial**

En résumé des études des mutations sur l'ADN mitochondrial, nous pouvons poser :

Les mutations somatiques, sous forme d'hétéroplasmies, sont prépondérantes seulement dans les individus âgés et, pour l'instant, il n'y a pas de différences significatives entre les individus sains et malades.

Les taux sont plus élevés dans la région D-Loop par rapport à la région codante. En effet les niveaux de délétions et de mutations ponctuelles dans la région codante sont inclus entre 1 et 2% alors que les mutations telles que T414G, A189G et T408A peuvent être inclus entre 5 et 50%.

Le taux de mutation semble présenter une augmentation significative dans des âges supérieurs à 60 ans pour l'ensemble des mutations ponctuelles (D-loop et région codante même si les taux diffèrent) et en ce qui concerne les mini-duplications, un âge seuil du nombre de ces duplications semble être de 40 ans.

Elles s'accumulent dans des tissus post-mitotiques à demande énergétique élevée telle que le tissu musculaire et elles présentent une forte spécificité tissulaire, la mutation T414G étant spécifique aux fibroblastes par rapport aux mutations A189G et T408A attribuées au tissu musculaire et les mutations ponctuelles de la région 16025-16055 aux cellules du muscle cardiaque.

L'ensemble des mutations sous forme d'hétéroplasmie est identifié sur les mêmes positions que les polymorphismes individuels suggérant des mécanismes sous-jacents communs.

Des techniques de détection sensible et fiable sont nécessaires afin d'identifier et de valider ces mutations.



# RESULTATS EXPERIMENTAUX

## **DEUXIEME PARTIE : RESULTATS EXPERIMENTAUX**

### **INTRODUCTION AUX TECHNIQUES D'ANALYSES EXPERIMENTEES**

Avant la sélection d'une technique de détection il est indispensable de se poser trois questions (Golden et Melov 2001). Quel type de mutations recherchons-nous? Quelle est la sensibilité de la méthode choisie? L'hétéroplasmie est le facteur important, la détection d'une mutation en présence d'un vaste excès d'autres formes de molécules représente une difficulté. La méthode est-elle capable d'accéder à l'effectif complet de mutations présent dans l'échantillon? Nous voulons mettre en évidence les mutations ponctuelles A189G, T408A et T414G dans différents types tissulaires et évaluer leur relation avec l'âge. Ceci nécessite de mettre en place une méthode de détection fine et sensible afin d'accéder à un nombre de molécules faibles et ensuite de quantifier celles-ci par rapport à la totalité des molécules de l'ADNmt.

#### **1. Le séquençage automatique de l'ADN :**

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre des nucléotides sur la molécule d'ADN. La méthode utilisée aujourd'hui (établie par Sanger en 1977) repose sur l'utilisation de didésoxynucléotides, qui bloquent la synthèse de l'ADN après leur incorporation. Cette méthode a évolué avec la mise au point de séquenceurs automatiques et de marquage des nucléotides à l'aide de fluorochromes.

Le principe réside dans la lecture successive des bases d'un brin ADN précédemment amplifié par PCR. Pour cela, une deuxième PCR est nécessaire, elle ne permet pas l'amplification du nombre de fragments ADN mais l'incorporation de nucléotides fluorescents à partir des brins matrices.



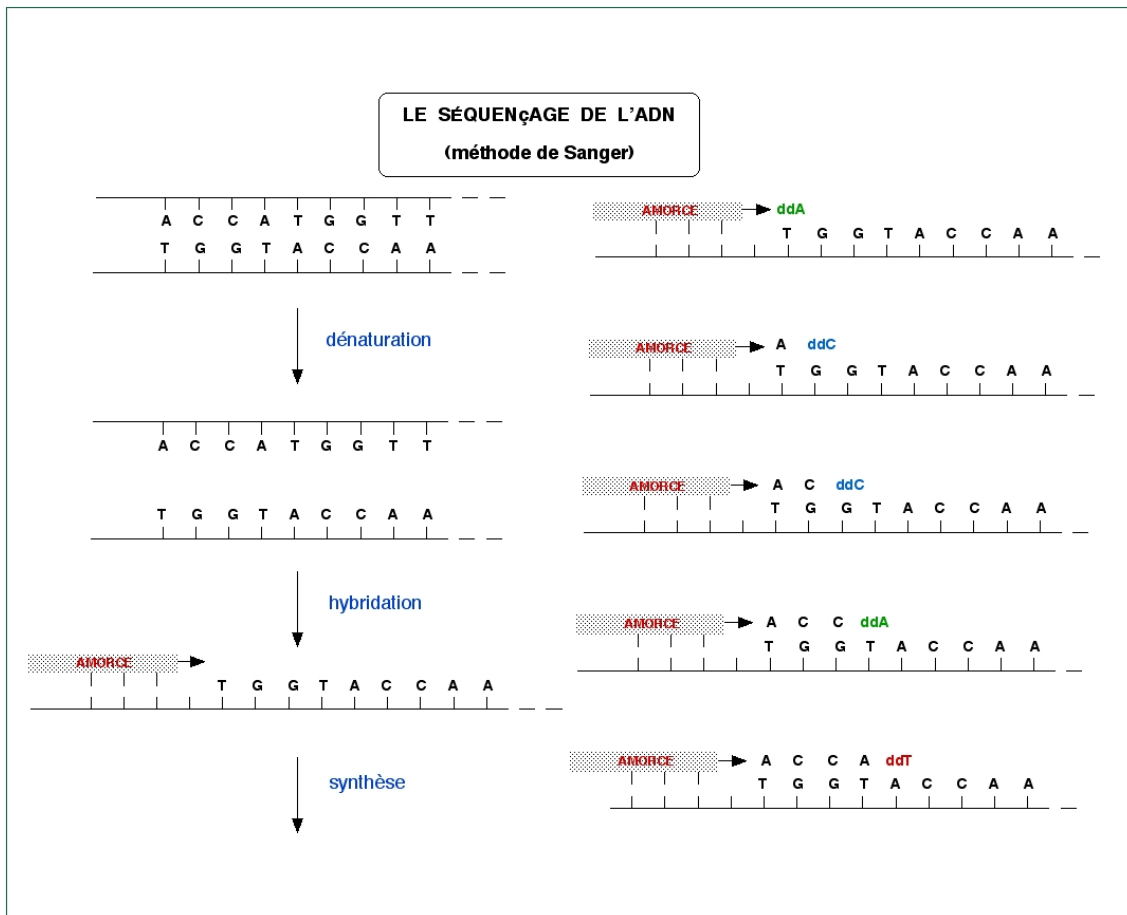


Figure 25 : Principe de la réaction de séquençage.

*Après des étapes de dénaturation, hybridation et élongation, la polymérisation a lieu plus ou moins longtemps selon le dNTP ou le ddNTP incorporé et produira des fragments de longueur variable marqués sur la dernière base par un fluorochrome.*

*(Sur <http://www.sesep.uvsq.fr>)*

Le milieu réactionnel contient l'ensemble des 4 désoxynucléotides habituels et les 4 didésoxy-nucléotides marqués chacun par un fluorochrome différent. L'ensemble est soumis à une succession de cycles de polymérisation au cours desquels l'ADN polymérase peut incorporer un désoxynucléotide (dNTP) ou un didésoxy-nucléotide (ddNTP) au niveau de chaque base de la matrice ADN. Le choix de l'incorporation de l'un ou l'autre des nucléotides étant aléatoire, chaque base de l'ADN matrice aura statistiquement une incorporation d'un didésoxy-nucléotide, ainsi le milieu réactionnel contient l'ensemble des molécules néosynthétisées possibles. L'analyse s'effectue ensuite à l'aide d'un séquenceur automatique, ou chaque brin va migrer par électrophorèse capillaire et passer devant une fenêtre où un faisceau laser permettra l'excitation du fluorochrome, l'émission de fluorescence typique de chacun sera enregistrée et l'ensemble de la séquence sera retranscrite sous la forme d'un électrophorégramme.

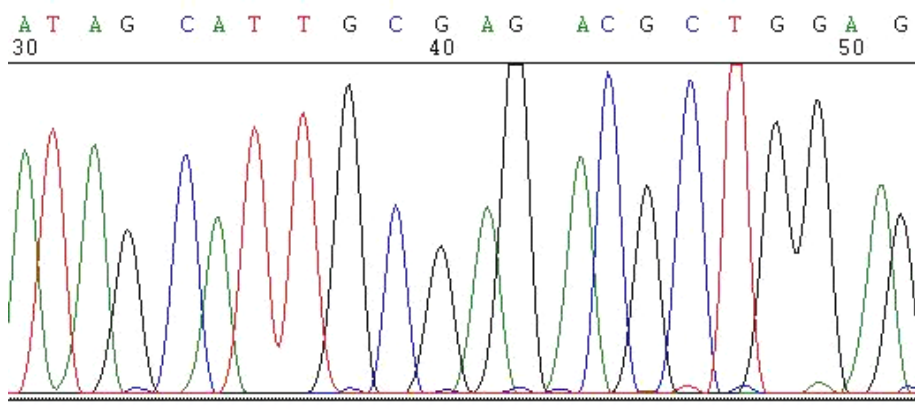


Figure 26 : Exemple d'un électrophorégramme.

La figure montre l'enchaînement des bases le long d'une séquence et leurs identifications selon la couleur de fluorochrome assigné à chaque base. (Sur <http://www.sesep.uvsq.fr>)

Cette technique nous permet d'aborder toute la séquence dans la région analysée, d'identifier les polymorphismes dans la région cible et leurs conséquences sur nos techniques de détection et d'évaluer les hétéroplasmies présentes sur les 3 positions recherchées.

Le séquençage automatique de l'ADN est une technologie répandue et utilisée de façon routinière par les laboratoires de recherche et médico-légal pour les études génétiques de population ou dans les cas d'identification individuelle (Rosenblum *et al.* 1997). Mais, il a été démontré que les techniques de séquençage automatique ne peuvent mettre en évidence des mutations présentes à moins de 20 % du total des molécules (Chinnery *et al.* 2001) pour d'une part, des raisons techniques et d'autre part, par l'interprétation des profils de séquence. Nous en reparlerons plus loin.

## **2. La technique des sondes PNA:**

La molécule PNA (Peptid Nucleic Acid) est une chimère d'une molécule ADN, dans laquelle le sucre et le phosphate sont remplacés par un peptide achiral et neutre, et forme le long de la séquence des bases d'unités répétées de N-(2-aminoethyl) glycine (Nielsen *et al.* 1994).

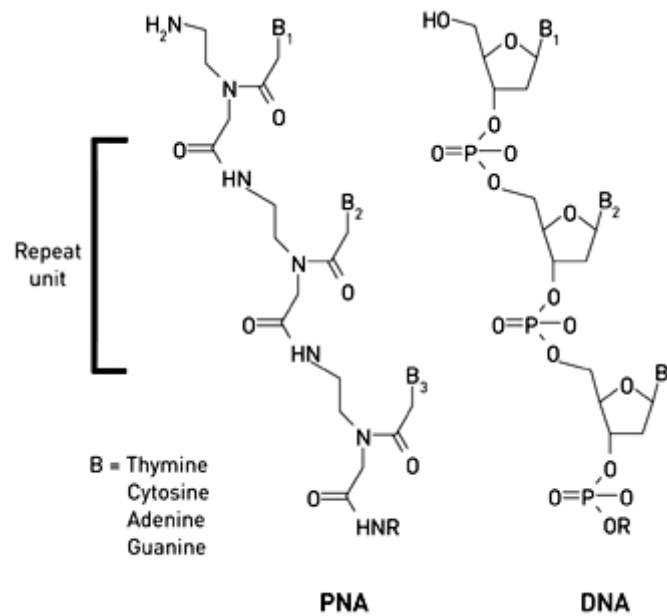


Figure 27 : Comparaison des structures d'un brin ADN et d'une sonde PNA.

(Sur [http://www.eurogentec.com/code/en/page\\_08\\_274\\_0.htm](http://www.eurogentec.com/code/en/page_08_274_0.htm))

La technique de blocage (clamping) dirigé de l'amplification PCR par la sonde PNA a été développée pour une analyse directe de mutation d'une seule base (Ørüm *et al.* 1993 ; Ørüm 2000). Cette méthode utilise le fait que les molécules PNAs reconnaissent et se lient à leur séquence d'acides nucléiques complémentaire avec une plus grande stabilité thermique et une plus grande affinité que l'amorce nucléotidique correspondante et ne peuvent pas servir d'amorces pour les polymérase ADN. Le complexe formé PNA/ADN peut efficacement bloquer la formation de produits PCR en compétition avec l'amorce sur le même site. Ainsi, ce blocage permet l'amplification et/ou la suppression des séquences cibles qui diffèrent par une seule paire de base. Nous avons choisi le blocage par "exclusion d'amorce", c'est-à-dire que l'amorce 5' et la sonde PNA d'un même site sont chevauchantes sur 7 bases permettant l'exclusion de l'une ou l'autre selon la spécificité d'appariement et la température (Ørüm *et al.* 1993).

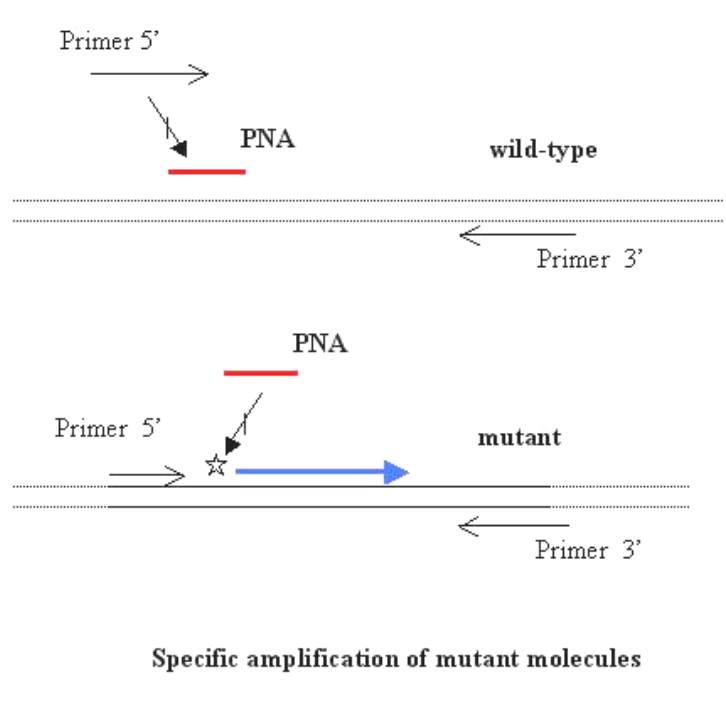


Figure 28 : Méthode de blocage dirigé de la PCR par la molécule PNA.

*Les flèches désignent les amorces, les barres la sonde PNA et les astérisques représentent les mutations.*

Comme vu dans la figure 28, sous les conditions de température appropriée, la sonde PNA hybridée parfaitement et spécifiquement à la région cible, empêche la liaison de l'amorce PCR, tandis qu'un mésappariement d'une seule base de la sonde PNA provoque une perte de température élevée et permet l'hybridation de l'amorce avec une inhibition minimale. Ainsi, selon la séquence de la sonde PNA choisie, l'amplification PCR permettra l'amplification des molécules mutantes présentes ou aucune amplification si ces molécules mutantes ne sont pas présentes dans l'échantillon.

Dans ce travail, il est nécessaire de choisir une méthode de détection discriminante, dont la sensibilité puisse mettre en évidence des fréquences de molécules mutantes très faibles en présence d'un vaste excès d'autres formes de molécules ADNmt. La technique des molécules PNA a été réalisée dans les travaux de Murdock *et al.* (2000) et a montré une extrême spécificité et sensibilité. Cette méthode mise en place par Ørüm *et al.* (1993) est extrêmement spécifique, éliminant les faux positifs en l'absence de molécules mutantes, étant capable de détecter des mutations à un niveau de 1% du total des molécules.

### 3. La PCR en Temps Réel:

La technique de Real Time PCR permet une quantification reproductible (Higushi *et al.* 1993 ; Heid *et al.* 1996). Le SYBR<sup>®</sup> Green est un fluorophore capable de se lier à l'ADN double brin. En solution, le SYBR Green n'est pas fluorescent lorsqu'il est sous sa forme libre, alors qu'il est très fluorescent lorsqu'il est lié à l'ADN.

Le fluorophore est incorporé lors de la formation des doubles-brins ADN pendant la PCR, et est excité par l'émission d'un faisceau laser, le spectrofluorimètre couplé à l'appareil permet de lire cette fluorescence et un enregistrement d'une sensibilité excellente (Wittwer *et al.* 1997). Pour une revue complète sur la PCR en Temps Réel écrite en français voir : Poitras et Houde (2002).

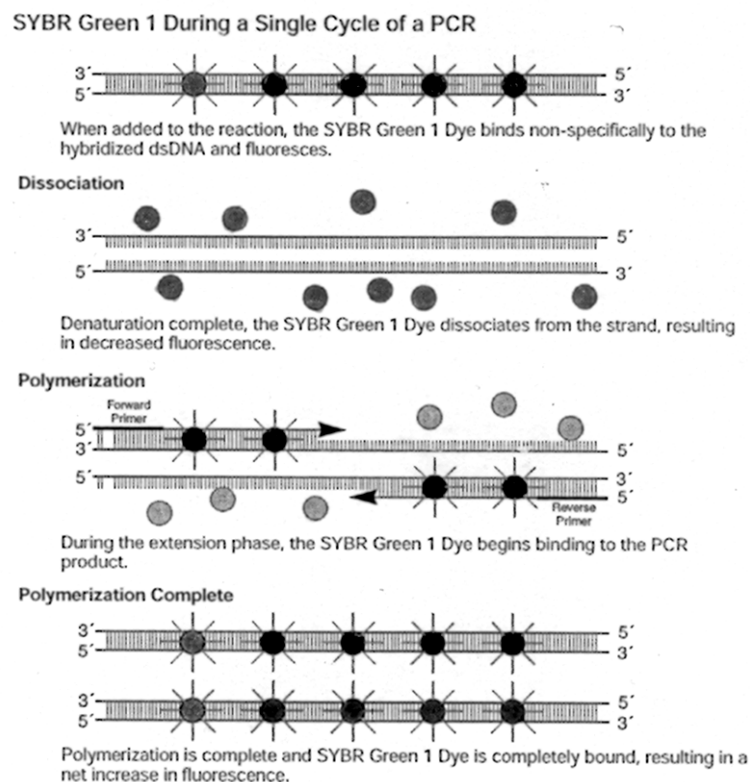


Figure 29 : Principe de l'émission de fluorescence lors de la PCR en Temps Réel.

*Au début de l'amplification, le mélange réactionnel contient de l'ADN dénaturé, les amorces et le fluorophore non lié. Après le couplage des amorces, le fluorophore se lie au double brin. La liaison à l'ADN se traduit par une augmentation de la fluorescence. Pendant l'étape d'élongation, le nombre de molécules de fluorophore lié à l'ADN synthétisé augmente, ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence. La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle.*

*D'après le manuel Applied Biosystems. ABI Prism<sup>®</sup> 7000 Detection systems. Appendice A :A-7.*

Cette technique permet l'enregistrement en temps réel de l'amplification ADN, elle est quantitative car l'amplification dans sa phase exponentielle est proportionnelle à la quantité d'ADN initiale. La valeur du cycle seuil (Cycle threshold: Ct) est défini par le cycle auquel la fluorescence du SYBR<sup>®</sup> Green augmente significativement au-dessus du bruit de fond et est le résultat d'une amplification spécifique. Les valeurs de Ct sont calculées par extrapolation à partir de l'axe des  $x$  sur la portion linéaire de la phase exponentielle de l'amplification. Le cycle seuil reporté (Ct) est le numéro de cycle voisin de l'axe du  $x$  attribué (Gibson *et al.* 1996).

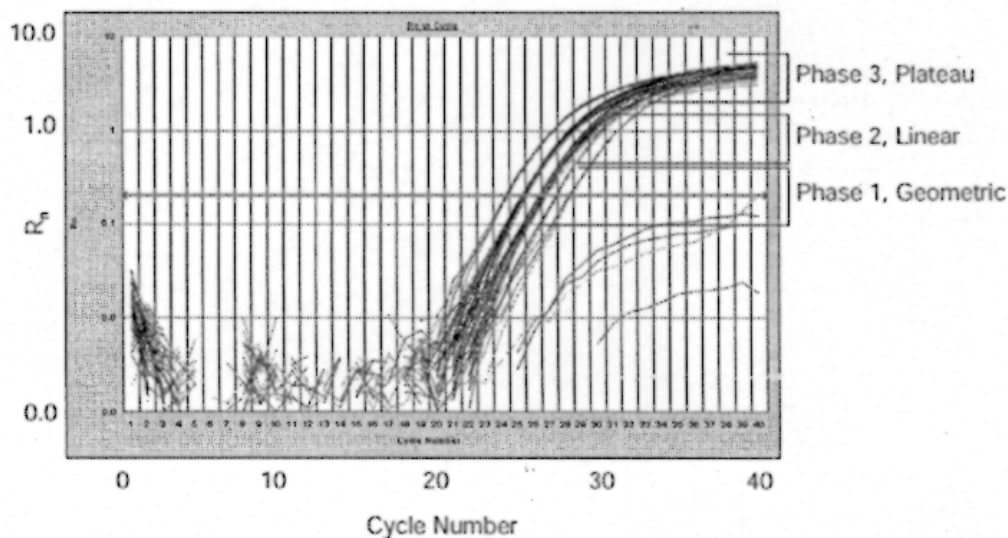


Figure 30 : Lecture de l'émission de fluorescence émise en fin de chaque cycle d'élongation.

Les résultats s'expriment en Ct. Le Ct est le nombre de cycle auquel l'amplification est supérieure à la valeur seuil fixée, dans le début de la phase exponentielle (1). Le Ct est proportionnel à la quantité ADN présente au départ.

D'après le manuel Applied Biosystems. ABI\* Prism 7000 Detection Systems. Appendice A : A-3.

A chaque fin de PCR, une analyse de la courbe de fusion est réalisée. Chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion ( $T_m$ ) spécifique, définie comme étant la température à partir de laquelle 50 % de l'ADN est sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin.

Après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95°C pour dénaturer l'ADN double brin, puis elle est abaissée ce qui provoque la "reformation" d'ADN double brin. La température est ensuite élevée lentement à 95°C.

La fluorescence est lue en continu pendant cette remontée : le SYBR Green est fluorescent tant qu'il est lié à l'ADN double brin ; quand la température augmente, l'ADN double brin se dissocie, ce qui entraîne la libération du SYBR Green dans le milieu et une diminution progressive de la fluorescence ; lorsque 50 % de l'ADN double brin est dissocié, la

fluorescence chute brutalement, c'est à cette température que correspond la température de fusion du produit synthétisé.

Cette approche de quantification des molécules par PCR en Temps Réel (qPCR) a été faite à partir de la délétion de 4977 pb sur des tissus musculaires et des cellules sanguines (Meissner *et al.* 1999 ; Meissner *et al.* 2000 ; von Wurmb-Schwark *et al.* 2002). Cette méthode est fiable et précise comme technique de quantification et, sur le même principe, une quantification de mutations ponctuelles peut être réalisée.

#### **4. La méthode associée des sondes PNA et de la PCR en Temps Réel:**

La technique de sondes PNA est réalisée en combinaison avec la technique de Real Time PCR. Le processus d'amplification est enregistré en temps réel par l'émission de fluorescence émise par l'incorporation du fluorophore SYBR<sup>®</sup> Green et la sonde PNA incorporée dans le milieu réactionnel bloque l'amplification des molécules cibles. L'ensemble doit nous permettre une lecture fine et sensible de l'amplification de chaque espèce et d'évaluer une quantification relative des hétéroplasmies.

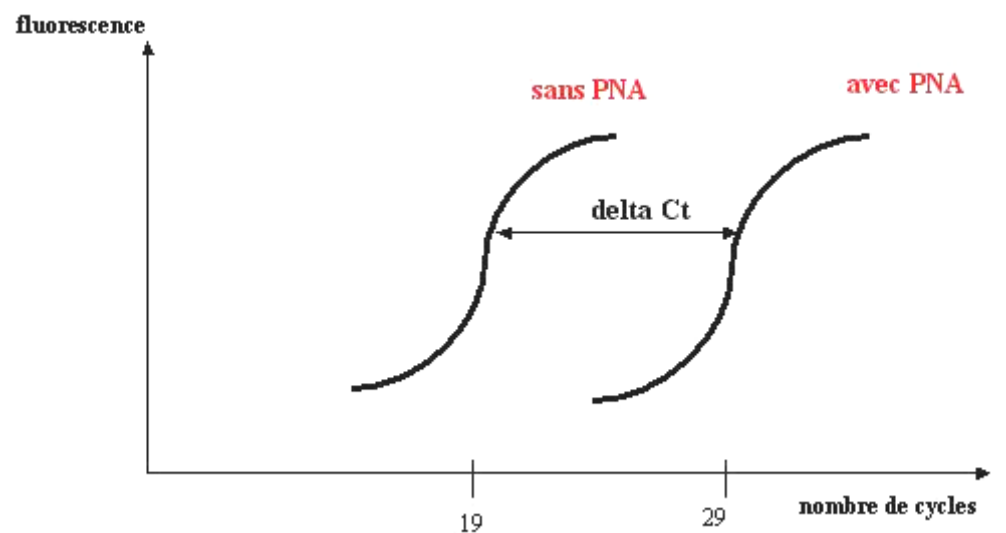


Figure 31 : Principe de la méthode combinée PNA/qPCR.

*L'amplification de chaque échantillon sans la sonde PNA permet de déterminer la quantité ADN initiale incluant les deux types de molécules WT et M par le cycle seuil (Ct). L'incorporation d'une sonde donnée dans le milieu réactionnel de la PCR bloquera les matrices ADN cibles et complémentaires et le cycle seuil sera alors caractéristique de l'amplification des molécules ayant la mutation d'intérêt.*

Comme vu dans la figure 31, une quantification relative de ces molécules mutantes pourra être effectuée en comparaison avec des contrôles ne contenant que des formes normales (nucléotide identique à la séquence de référence Cambridge : WT) ou que des formes mutées (nucléotide différent la séquence de référence Cambridge : M) par comparaison de leur delta Ct, ou par l'établissement d'une courbe de référence expérimentale. Cette méthode combinée n'a aucune référence de travail, seuls les travaux de Kyger *et al.* (1998) peuvent être une référence en sachant que ces auteurs ont travaillé sur du génome nucléaire et que la discrimination des molécules a lieu sous forme hétérozygote ou homozygote. Il sera donc nécessaire dans nos travaux d'établir toutes les conditions d'optimisation, de courbe de référence, de contrôles, d'analyse et d'interprétation.

Cette méthode combinée de détection des mutations ne nécessite pas de manipulation post-PCR, réduisant ainsi le temps des tests et la probabilité de contamination en laboratoire.

## **5. La technique de Southern Blot :**

Le Southern blot est une technique standard d'hybridation entre une molécule ADN et une sonde complémentaire à sa séquence. Les deux brins à appairer doivent être complémentaires et anti-parallèles. La sonde est marquée par une molécule de digoxigénine et est reconnue par un anti-corps lié à une enzyme. On ajoute le substrat qui permet la réaction enzymatique chimiluminescente et celle-ci est ensuite révélée sur un film photographique.

Les conditions de stringence qui permettent la formation d'une double hélice stable entre la matrice et la sonde sont: la température et la force ionique (la concentration en sel). Après la synthèse de la séquence ADN complémentaire sur 19 bases et le marquage en 5' par la molécule de digoxigénine, le procédé d'hybridation est le suivant (figure 32) :

1° étape: Une première amplification par PCR à partir de chaque échantillon d'un segment contenant la séquence cible (la matrice) est réalisée. Ensuite les fragments sont séparés sur un gel non dénaturant, transférés sur une membrane nylon chargée positivement et la fixation des acides nucléiques sur la membrane est faite par une irradiation UV dans un temps court.

2° étape : L'hybridation de la sonde avec la matrice est effectuée dans des conditions de pH et de température établies expérimentalement, et est suivit de lavages stringents permettant l'élimination des sondes non spécifiques.



3° étape: la révélation : La sonde ADN marquée par digoxigénine et hybridée spécifiquement à la matrice complémentaire peut être détectée par une protéine anti-digoxigénine (anti-corps) couplée à une enzyme et visualisée par une réaction chimiluminescente (Höltke et Kessler 1990 ; Höltke *et al.* 1995).

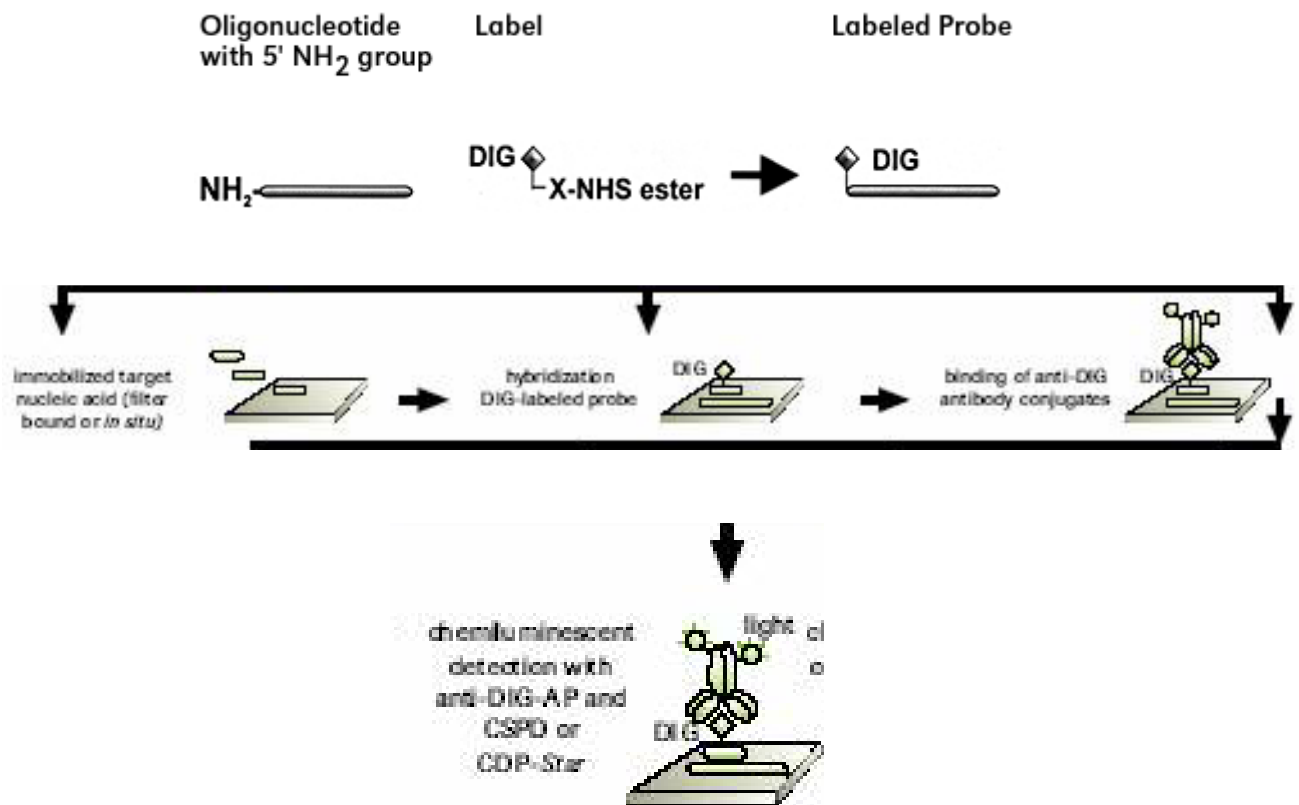


Figure 32 : Schéma représentant les différentes étapes de la technique de Southern blot.

(Sur <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1363514a.pdf>)

L'analyse par hybridation en Southern blot est une technique classique et sensible de détection qui peut discriminer à des niveaux faibles les deux formes d'hétéroplasmies présentes dans des échantillons. La sensibilité des sondes ADN marqués en 5' par une molécule de digoxigénine peut être de l'ordre du picogramme après des expositions de 16h (Höltke et Kessler 1990).

Au final, la comparaison des trois techniques : le séquençage automatique, la méthode combinée PNA/qPCR et le Southern blot nous permettra d'évaluer la fiabilité de chacune et d'estimer la technique la plus adaptée aux types d'échantillons et aux mutations recherchées.

## **CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODES**

### **1. Matériel : Les tissus analysés**

#### **1.1. Les cellules buccales**

Les prélèvements buccaux ont été réalisés sur cytobrosses, prélevés sur des sujets d'âge compris entre 4 et 90 ans<sup>1</sup>. Sur les 39 prélèvements buccaux effectués, 37 l'ont été sur des sujets vivants avec leur consentement et pour certains choisis au sein d'une même lignée maternelle, tandis que 2 autres ont été prélevés sur des sujets décédés parallèlement à des prélèvements musculaires.

Chacune des 10 lignées maternelles étaient représentées par 2 à 5 membres (tableau dans annexe 1).

#### **1.2. Le tissu musculaire**

Les échantillons musculaires ont été prélevés à partir du psoas lors d'autopsies médico-légales<sup>2</sup>, sur 75 individus sans relation de parenté et dans un âge compris entre 1 et 97 ans. Les prélèvements ont été effectués au cours autopsie de cadavres non identifiés initialement, scellés en vue d'identification ultérieure et étudiés comme tels. Seuls les prélèvements dont l'identité a été confirmée formellement secondairement sont inclus dans cette étude. Les individus décédés accidentellement ne présentaient pas de maladies spécifiques macroscopiquement détectables. Les tissus musculaires prélevés ont été stockés directement dans des contenants stériles à – 80°C (tableau dans annexe1).

#### **1.3. Le tissu osseux**

Les échantillons osseux issus de prélèvements lors d'autopsies médico-légales et que nous appellerons “modernes”, sont au nombre de 26, provenant d'individus dans des âges inclus entre 21 et 105 ans<sup>2</sup>. Les prélèvements ont été effectués au cours autopsie de cadavres non

---

<sup>1</sup>Je remercie Sarah Romac qui a effectué ces analyses au laboratoire d'Anthropologie Moléculaire de Strasbourg lors d'un stage de fin d'étude de DUT (sous la direction de Mme Christine Keyser-Tracqui).

<sup>2</sup> Je remercie le Dr. Bernard Martinez et le Pr. Norbert Telmon qui ont réalisé ces prélèvements dans le Service de Médecine Légale du C.H.U de Toulouse (Hôpital de Rangueil).

identifiés initialement, scellés en vue d'identification ultérieure et étudiés comme tels. Seuls les prélèvements dont l'identité a été confirmée formellement secondairement sont inclus dans cette étude. Le protocole consiste à une alternance de cuisson dans un flacon en verre individuel entre 90 et 100°C et d'un décharnement manuel. La période de cuisson était de 8 heures répétée 2 à 3 fois. La cuisson a lieu dans un flacon individuel nettoyé entre chaque fragment osseux. Le décharnement de l'os avait lieu après chaque cuisson, l'un après l'autre. Lors de la préparation de ces échantillons pour l'analyse ADN, les os ont été abrasés sur leur surface puis nettoyés à l'éthanol 95%, afin d'éliminer les contaminants de surface (tableau dans annexe 1). La surface de travail était nettoyée à l'eau de javel et à l'alcool 100% après chaque abrasion, les os étant manipulés indépendamment dans le temps et individuellement à cette étape.

Les 4 échantillons osseux "anciens" proviennent de prélèvements effectués lors de la Mission Archéologique Française en Sibérie Orientale<sup>3</sup>. Les os ont été abrasés sur 2 à 3 mm avec une Dremel® afin d'éliminer les contaminants de surface<sup>4</sup>. Ils sont ensuite réduits en poudre à l'aide d'un trépan chirurgical (tableau dans annexe 1).

## **2. Méthodes**

### **2.1. Extraction de l'ADN**

Les protocoles d'extraction de l'ADN sont différents selon le type de prélèvements tissulaires.

Les cellules buccales (déposées sur l'embout des cytobrosses) sont incubées dans 400µl de tampon d'extraction (EDTA 5 mM, SDS 2%, Tris HCl 10 mM pH 7,5 et acétate de sodium 0,3M) auquel sont ajoutés 10 µl de protéinase K (20mg/ml) à 50°C pendant 2 heures sous agitation. Une extraction phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1 ; vol/vol) est réalisée sur le mélange de lyse cellulaire. La phase aqueuse récupérée est ensuite purifiée sur colonnes à l'aide du Kit Cleanmix™ (Talent). A la phase aqueuse est ajoutée 550 µl de "Binding Solution" et 60 µl de résine. L'ensemble est déposé sur une colonne à filtre et

---

<sup>3</sup> Dirigée par le Pr. Eric Crubézy.

<sup>4</sup>Je remercie Sylvain Amory, doctorant au sein du Laboratoire d'Anthropologie Moléculaire de Strasbourg qui a effectué le traitement des os.

centrifugé 1 min à 800 g. Un volume de 500 µl de solution de lavage est ajouté sur la colonne et centrifugé 1 min à 8000 g. Après purification, l'ADN est élué avec 30 µl d'eau bidistillée stérile.

Approximativement 1cm<sup>3</sup> de fragments musculaires sont incubés dans 3 ml de tampon d'extraction (10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 2% SDS, 10 mM Tris HCl (pH 7.5) et 50 µl de Protéinase K (20mg/ml ; >20U/mg) à 58°C dans un four rotatif toute la nuit.

L'ADN total est extrait à partir du lysat cellulaire selon la méthode de précipitation à l'acétate de sodium saturé (Cattanéo *et al.* 1995). Une centrifugation à 13000 g pendant 4 min (x2) permet d'éliminer les débris cellulaires. Un millilitre d'Acétate de Sodium saturé (3M) est additionné à l'échantillon (1/3 de son volume), secoué et centrifugé à 6500 g pendant 8 minutes. Quatre millilitres d'Isopropanol à 100% sont additionnés (vol/vol) et retournés manuellement pendant 10 minutes pour précipiter l'ADN et l'ensemble est centrifugé à 6500 g pendant 7 minutes.

Le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est repris par une précipitation à l'éthanol à 70%. La suspension du culot est réalisée dans 100 µl d'eau MilliQ® stérile (Millipore).

Tous les échantillons osseux ont été traités selon un protocole précédemment publié (Fily *et al.* 1998 ; Keyser-Tracqui *et al.* 2003). Les fragments osseux modernes (approximativement 1 cm<sup>3</sup>) abrasés et nettoyés à l'éthanol et la poudre d'os obtenue (2,5 g) à partir des os anciens sont mis en incubation dans 5 ml de tampon d'extraction (EDTA 5 mM, SDS 2%, Tris HCl 10 mM Ph 7,5 et acétate de sodium 0,3M) auquel sont ajoutés 25 µl de protéinase K (20mg/ml) à 50°C toute la nuit. Après une extraction organique (phénol/chloroforme/ alcool isoamylique ; 25/24/1), l'ADN est purifié sur colonnes avec le Kit Cleanmix™ (Talent). Au volume du surnageant est ajouté 2,5 ml de "Binding Solution" et 250 µl de résine et l'ensemble est déposé successivement sur la colonne. Après une centrifugation à 8000 g, le filtre est lavé 2 fois avec la "Washing Solution" et l'élution est ensuite faite dans 400µl d'eau MilliQ® stérile (Millipore). Une étape de concentration supplémentaire est réalisée sur colonnes Microcon® YM-30 (Millipore) pour un volume final de 40 µl.

Ces 2 types d'échantillons osseux sont extraits indépendamment dans des temps différents et dans deux laboratoires différents.

Un blanc est systématiquement inclus dans toutes les extractions.

## **2.2. Les précautions et les conditions d'analyses**

L'évaluation de mutations sous forme d'hétéroplasmies nécessite des précautions importantes afin de ne pas contaminer les échantillons et produire de faux positifs. Pour cela, le prélèvement de cellules buccales des principaux manipulateurs a été fait, l'extraction ADN et le séquençage de la région HVII sur l'ADN mitochondrial réalisés (incluant B. Martinez ; N. Telmon ; S. Romac ; C. Thèves).

En ce qui concerne les échantillons, l'extraction ADN par type tissulaire a été réalisée sur des journées différentes et l'ADN extrait était stocké dans différents endroits (-20°C). L'extraction se déroulait sous une hotte à flux laminaire. Une salle spécifique était dédiée aux amplifications PCR, les salles pré et post PCR étaient séparées et tous les consommables étaient traités par UV. Le matériel était nettoyé à l'eau de javel et l'eau MilliQ® (Millipore).

Des précautions supplémentaires ont été prises en ce qui concerne les échantillons osseux anciens, le petit matériel utilisé pour ceux-ci étant exclusivement dédié à cet usage et irradié par UV. Le traitement de ces échantillons (extraction, préparation pré-PCR) a été réalisé dans un laboratoire différent où le traitement ADN n'a pas lieu habituellement. Le traitement du matériel était identique aux échantillons modernes avec un nettoyage supplémentaire à l'alcool.

Des contrôles négatifs (blanc) sont réalisés à chaque étape en laboratoire: blanc d'extraction, blanc de PCR, blanc pour la PCR du séquençage, blanc dans chaque amplification PNA/qPCR, blanc pour les PCR de la technique Southern. Les blancs d'extraction sont menés la première fois jusqu'en fin d'analyse (principalement dans l'analyse en séquençage automatique). En laboratoire nous avons suivi les conditions de travail proposées par le groupe EDNAP pour minimiser autant que possible les possibilités de contamination (Tully et al. 2001).

La quantité ADN des échantillons étant suffisante et de bonne qualité le nombre de cycles PCR est limité à 35 cycles pour les premières PCR d'amplification du segment spécifique avant l'analyse en séquençage. Toutes les PCR initiales ont été réalisées avec un nombre de cycles compris entre 35 et 40 (45 maximum pour les qPCR) en ce qui concerne les trois techniques de détection. En effet, il a été constaté la formation d'artefact d'hétéroplasmies quand la quantité ADN est assez faible et nécessite un nombre de cycles plus important notamment quand il s'agit d'analyses ADNmt à partir des cheveux lors du séquençage automatique (Grzybowski 2000 ; Budowle et al. 2002).

A noter aussi que nous avons exclu de l'analyse les individus qui, lors des autopsies, auraient présenté des signes spécifiques de maladies telle que des maladies mitochondriales ou neurodégénératives. Les prélèvements musculaires ont tous été faits au niveau du psoas. En ce qui concerne les individus des familles pour les prélèvements buccaux, aucun ne présentaient des maladies impliquant le stress oxydatif.

### **2.3. Les digestions enzymatiques**

Une première évaluation de la présence des formes normales (WT) et mutantes (M) a été réalisée à partir de l'amplification directe des segments d'ADNmt sur quelques échantillons et la présence ou l'absence de sites de restriction enzymatique selon le nucléotide présent sur la position cible.

En ce qui concerne la position 414, la présence du nucléotide T correspondant au nucléotide référencé dans la séquence de Cambridge (WT. Anderson *et al.* 1981)), il n'existe pas de site de restriction à cette position. Par contre, la présence du nucléotide G à la position 414 (M) crée un site de restriction pour l'enzyme FokI (Murdock *et al.* 2000). De même, pour la position 189, la présence du nucléotide G (M) crée un site de restriction pour l'enzyme Cac8I, alors que pour la position 408, il est nécessaire d'utiliser une amorce supplémentaire qui permettra la formation du site de restriction avec le nucléotide A (M) pour l'enzyme DdeI (Del Bo *et al.* 2002 ; tableau 6).

Toutes les réactions de PCR ont été faites dans un thermocycleur Perkin Elmer 2400 avec les conditions suivantes: dans un volume réactionnel final de 50 µl sont ajoutés: 2 µl ADN, 500 nM de chaque amorce, 200 nM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, du tampon 1X et 1,5 U de Taq polymérase (Promega). L'amplification est réalisée après une dénaturation initiale de 1 min à 94°C, par 35 cycles de PCR selon les étapes suivantes: une dénaturation de 15 s à 94°C, une hybridation des amorces de 30 s à 50°C pour le segment FokI et à 57°C pour les segments Cac8I et DdeI, une extension de 45 s à 72°C, et une extension finale de 2 min à 72°C.

Les digestions enzymatiques ont été effectuées dans un volume total de 20 µl incluant : 10 µl de produits PCR, du tampon 1X approprié à chaque enzyme et 4 U d'enzyme correspondante (Biolabs). Le mélange réactionnel était soumis à un bain-marie à 37°C pendant 1h30 afin de permettre la réaction enzymatique. La réaction est stoppée pendant 10 à 20 min à 65°C suivant les enzymes. Les produits de PCR digérés et non digérés sont déposés dans un gel

d'agarose à 3% avec un marqueur de taille de 25-250 pb (Q-BIOgene). La visualisation des bandes est faite sous lumière UV analytique (BioRad. Gel Doc 1000).

Tableau 6 : Liste des enzymes et des amorces utilisées pour les digestions enzymatiques sur les 3 positions.

Région	Amorces et enzymes	Séquence (5'-3') selon Anderson <i>et al.</i> (1981)
HVII Position 189	Cac8I	GCN↓NGC CGN↑NCG
	Amorce 5': L111	ACC CTA TGT CGC AGT ATC TGT C
	Amorce 3':H253	GAC GTG TCG GTG AAA GGT G
HVIII Position 414	FokI	GGATG(N) <sub>9</sub> ↓ CCTAC(N) <sub>13</sub> ↑
	Amorce 5':L261	CCA CTT TCC ACA CAG ACA TC
	Amorce 3':H524	GCG ACG ATT GGG GTA TG
HVIII Position 408	DdeI	C↓TNAG GANT↑C
	Amorce 5':L376	TAA CCA GAT TTC AAA TTT TAT CCT T
	Amorce 3':H502	TGT GTG CTG GGT AGG ATG

#### **2.4. Les clones M et WT pour chaque mutation**

Lors de notre année de DEA nous avons construit des plasmides à partir du vecteur pGEM-T Easy Vector (Promega) pour les 3 positions 189, 408 et 414 afin de valider la technique d'ASO Hybridation utilisée. Ces clones ont été utilisés sur notre travail actuel dans la mise au point des techniques de PNA et de PCR en Temps Réel. Pour rappel, nous citons ici les principales étapes du clonage jusqu'à l'obtention de clones positifs et la vérification par séquençage (le protocole détaillé est inclus dans l'annexe 2).

Des amorces portant spécifiquement le nucléotide sauvage (WT) ou mutant (M) aux positions d'intérêt sont synthétisées (tableau 7 ; Q-BIOgene).

Les segments sont amplifiés par PCR avec les amorces correspondantes. Une migration sur gel d'agarose Low Melting Point à 0,7% permet l'excision des bandes de produits de PCR sur le gel. L'extraction de l'ADN à partir du gel se fait avec le Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN).

Le Kit pGEM-T Easy Vector System (Promega) est utilisé pour la ligation des produits de PCR dans le vecteur. Les bactéries compétentes DH 5α sont transformées avec les produits de

ligation. Les colonies sur boîte sont sélectionnées et prélevées. Nous faisons une vérification des clones positifs, c'est-à-dire contenant le vecteur et le fragment d'intérêt, par un criblage par PCR avec les amorces spécifiques ayant servi à construire les séquences.

Les produits de PCR sont soumis à une électrophorèse dans un gel d'agarose à 2% et visualisés sous lumière UV. Des aliquots de chaque clone de 10 µl à 200 ng/µl sont analysés par séquençage automatique<sup>5</sup>.

Tableau 7 : Liste des amorces pour la construction de clones contrôles sur les positions 189, 408 et 414.

Région	Amorces	Séquence (5'-3') selon Anderson <i>et al.</i> (1981)
HVII Position 189	5' WT 189	CAATATTACAGGCGAACATACTTACTAAAG
	5' M 189	CAATATTACAGGCGAGCATACTTACTAAAG
	Amorce 3':H253	GAC GTG TCG GTG AAA GGT G
HVIII Position 408 et 414	5' WT 408/414	TATCTTTTGGCGGTATGCACTTTTAAC
	5' M 408	TATCTTTAGGCGGTATGCACTTTTAAC
	5' M 414	TATCTTTTGGCGGGATGCACTTTTAAC
	Amorce 3':H524	GCG ACG ATT GGG GTA TG

## **2.5. Le séquençage automatique**

Si la région de contrôle de l'ADN mitochondrial était notre séquence cible, différents segments ont été amplifiés selon la qualité de l'ADN et donc la longueur des segments accessibles sur les échantillons.

Sur l'ensemble des 39 échantillons de cellules buccales et sur 5 échantillons musculaires et 1 échantillon osseux, les régions HVII et HVIII représentées par des segments de 379 pb et 232 pb respectivement, ont été amplifiés<sup>6</sup> (tableau 8).

Ensuite, pour les 70 échantillons musculaires, le séquençage<sup>7</sup> a été effectué sur un segment de 413 pb englobant les 2 régions cibles de la position 111 à 524 (tableau 8).

Les échantillons osseux présentaient un ADN fragmenté, qui ne permettaient pas une amplification sur des longueurs de séquences de 400 pb. Ce sont donc des segments de 260 pb et/ou de 160 pb qui ont été amplifiés sur la région HVII<sup>8</sup>. Ce séquençage ne permet pas

<sup>5</sup> Réalisé au Service Commun de Séquençage de l'IFR 30 (CNRS, Purpan).

<sup>6</sup> Réalisé au Laboratoire d'Anthropologie Moléculaire de Strasbourg par S. Romac.

<sup>7</sup> Réalisé au Service Commun de Séquençage de l'IFR 30 (CNRS, Purpan).

<sup>8</sup> Ces analyses ont été faites dans le laboratoire d'Anthropobiologie de Toulouse.



d'obtenir la séquence complète de HVII mais permet l'analyse de la région entourant la position 189. La région HVIII n'a pas été analysée sur ces échantillons (tableau 8).

Nous avons effectué l'analyse des séquences sur les deux brins L et H de l'ADNmt pour chaque échantillon afin de confirmer les hétéroplasmies. Elles sont analysées comme telle seulement quand les deux bases sur la même position sont visibles sur les deux brins et supérieures au bruit de fond (Tully *et al.* 2001). Un témoin positif et la séquence du manipulateur sont analysés systématiquement pour s'assurer de la non-contamination des échantillons.

Les extraits ADN des échantillons osseux modernes et anciens étaient très fragmentés, de part leur traitement ou leur état de conservation, nous avons donc effectué deux séquençages indépendants sur les deux brins pour chaque échantillon.

Une première réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est effectuée afin d'amplifier à partir de chaque échantillon les fragments d'intérêt.

L'amplification PCR est réalisée en utilisant 1µl d'ADN total, la concentration ADN des extraits n'est pas quantifiée et pouvait donc varier d'un échantillon à l'autre. La réaction de PCR a lieu dans un volume de 50µl contenant : 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 nM de dNTPs, les amorces spécifiques à 200 nM, du tampon 1X and 0.5 U de polymérase ADN Taq HotGoldstar (Eurogentec). Les amorces correspondantes au segment d'intérêt et leurs séquences sont indiquées dans le tableau 8.

L'amplification ADN de chaque segment cible a été réalisée dans un thermocycleur T3 (Biometra) ou dans un thermocycleur Perkin Elmer 2400 selon les laboratoires.

L'amplification est effectuée par une 1<sup>o</sup> étape de dénaturation à 94°C pendant 10 minutes, suivi de 35 cycles comprenant: une dénaturation à 94°C de 45 secondes, une hybridation à 53°C pour HVII (incluant les 2 possibilités de segments de 373 et 260 pb) et pour le segment complet de 413 pb englobant les 2 régions, et à 58°C pour HVIII et pour le segment de 160 pb de HVII pendant 1 minute, et une élongation à 72°C pendant 1 minute. Un cycle d'élongation final à 72°C pendant 7 minutes permet d'amplifier la totalité des segments amorcés (voir tableau 8).

Comme précisé dans le paragraphe 1.2.2, un blanc est réalisé (témoin négatif) afin de vérifier les possibilités de contamination à cette étape.

Les produits d'amplification sont ensuite analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% (2 g d'agarose dans 100 ml de TAE 1X (400mM Tris-Acetate, 10 mM EDTA)). Cinq  $\mu$ l de BET (Bromure d'Ethidium à 10 mg/ml) sont ajoutés à 50 ml de gel pour permettre la visualisation sous UV. Les échantillons sont mélangés à du Bleu de Bromophénol 1X pour suivre leurs migrations sur le gel. Un marqueur de taille de 100 pb est ajouté dans un puits (15% Ficoll, 0,03% bromophenol blue, 0,03% xylene cyanol, 0,4% orange G, 10 mM Tris-HCl(pH 7,5) et 50 mM EDTA (Promega)) pour contrôler la taille des fragments obtenus.

L'électrophorèse est réalisée pendant 30 minutes sous 100 Volts.

La visualisation des bandes est faite sous lumière UV analytique (BioRad. Gel Doc 1000).

La taille des fragments obtenus est comparée au marqueur de taille de 100 pb pour vérifier que la taille des fragments correspond à celle des régions recherchées. La concentration des fragments amplifiés à partir de chaque échantillon est estimée par comparaison de l'intensité de fluorescence (proportionnelle à la quantité d'ADN) à un fragment de concentration connue : le fragment de 500 pb à 160 ng/ $\mu$ l du marqueur de poids moléculaire. A partir de cette estimation de la concentration des fragments de chaque échantillon nous ajusterons la concentration nécessaire à 2 ng/ $\mu$ l pour réaliser la réaction de PCR permettant l'incorporation des didésoxynucléotides fluorescents.

La purification des produits d'amplification de cette première PCR est réalisée par ultracentrifugation au moyen soit de colonnes Microcon®PCR (Millipore) pour les analyses effectuées à Strasbourg, soit de colonnes du Kit QIAquick® gel extraction (QIAGEN) pour les analyses réalisées à Toulouse. Cette étape (quelle que soit la technique de purification utilisée) permet l'élimination des sels, des amorces et des dNTPs qui sont présents en excès dans le milieu réactionnel. Un volume final de TE 1X (Tris EDTA) calculé est ajouté au concentrât pour obtenir une concentration finale de 2 ng/ $\mu$ l.

Les séquences sont réalisées à partir des fragments précédemment amplifiés et en utilisant le Kit BigDye™ Terminator (Applied Biosystems). Cette étape permet l'incorporation des deux types de nucléotides, dNTPs et ddNTPs, dans un seul brin (Forward ou 5' et Reverse ou 3') au cours de la réaction et permettra ensuite l'analyse sur un séquenceur automatique ABI Prism® 310 ou 3100 (suivant les laboratoires; Applied Biosystems) de chaque brin marqué par fluorescence.

A 2 µl de produit d'amplification purifié (à une concentration de 2 ng/µl) sont ajoutés 4 µl de mix contenant les 4 dNTPs et les 4ddNTPs fluorescents et une ADN polymérase. A ce mélange sont ajoutés 2 µl de l'une des amorces spécifiées dans le tableau à une concentration de 0,8 µM et qui détermineront le sens de lecture de la polymérase et l'amplification d'un seul brin (5' ou 3'), et enfin 2 µl d'eau MilliQ® stérile (Millipore). Ainsi, chaque brin d'un fragment donné est séquencé séparément, les 4 ddNTPs incorporés sont marqués par un fluorochrome différent.

La PCR BigDye™ Terminator est effectuée dans des conditions identiques quelque soit le segment. Elle comprend une première étape de dénaturation à 96°C de 10 secondes, suivit de 25 cycles d'amplification incluant une dénaturation à 96°C de 35 secondes, une hybridation à 50°C de 15 secondes et une élongation à 60°C de 4 minutes.

Les produits d'extension de la PCR BigDye™ Terminator sont purifiés par précipitation avec des solutions d'éthanol de concentration décroissante (95% puis 70%), séchés à température ambiante, puis mis en suspension dans 10 µl d'eau MilliQ® stérile. Cette étape permet l'élimination maximum de sels, d'amorces et de dNTPs en excès. Elle est très importante car si elle s'est correctement déroulée, l'électrophorégramme, obtenu après migration dans le capillaire du séquenceur automatique, présente peu de "bruit de fond".

Les séquences obtenues sont analysées sur les séquenceurs ABI Prism ® 310 ou 3100 à l'aide du logiciel Sequencing Analysis 3.7 (Applied Biosystems) qui permet l'identification de chaque pic et leur attribution à un nucléotide en fonction de la couleur du fluorochrome.

L'alignement des séquences par rapport à la séquence de Cambridge est réalisée par le logiciel BioEdit (Ibis Therapeutics), afin d'identifier les polymorphismes individuels. Les hétéroplasmies sont identifiées par le logiciel Sequencing Analysis 3.7 et visualisé et confirmé par l'analyste selon les conditions décrites précédemment.

Tableau 8 : Liste des amorces utilisées lors du séquençage automatique.

*L'hybridation des amorces s'effectuent à une température de 53°C pour les segments de 373 pb, 260 pb et*

*413 pb et à une température de 58°C pour les segments de 232 pb et 160 pb.*

Région	longueur	Amorces	Séquence (5'-3') selon Anderson <i>et al.</i> (1981)
HVII	379 pb	Amorce 5': L29	GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C
		Amorce 3': H408	CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC A
	260 pb	Amorce 5': L29	GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C
		Amorce 3':H253	GAC GTG TCG GTG AAA GGT G
	160 pb	Amorce 5': L111	ACC CTA TGT CGC AGT ATC TGT C
		Amorce 3':H253	GAC GTG TCG GTG AAA GGT G
HVII et HVIII	413 pb	Amorce 5': L111	ACC CTA TGT CGC AGT ATC TGT C
		Amorce 3': H524	GTA TGG GGT TAG CAG CG
HVIII	232 pb	Amorce 5': L387	ACC CTA ACA CCA GCC TAA CC
		Amorce 3': H619	GGT GAT GTG AGC CCG TCT AA

Nous avons testé la limite de détection de la technique de séquençage automatique pour la mutation 189 à partir de deux extraits d'échantillons musculaires. Ces échantillons que nous appellerons "contrôles" ont été auparavant séquencés et identifiés comme A (wild-type = WT) ou G (mutant = M) à la position 189. A partir de ces deux contrôles, nous avons préparé sept points (dans les pourcentages suivants : 0, 10, 20, 30, 40, 50 et 100%), en mélangeant dans des proportions équimolaires les ADN des contrôles M et WT.

Un dosage par spectrophotométrie de la concentration ADN de chacun permet de mesurer une concentration initiale de 1 µg/µl. Nous avons préparé ensuite pour chaque point des aliquots de volume final de 10 µl, et mélangé dans les volumes adéquats les deux contrôles. Par exemple : pour le variant G de 10%, 1 µl de contrôle M et 9 µl de contrôle WT sont mélangés et homogénéisés, ensuite 1 µl est prélevé pour la première PCR de séquençage. Ces "variants" G sont soumis au séquençage automatique selon le même protocole que les échantillons.

## **2.6. Les techniques conjuguées PNA et PCR en Temps Réel**

Les séquences des sondes PNA pour les mutations A189G T408A et T414 G et les amorces complémentaires à chacune sont données dans le tableau 9. Toutes les sondes PNA ont été synthétisées par Eurogentec.

L'analyse par séquençage des échantillons est nécessaire en premier lieu pour détecter les polymorphismes présents dans la région d'hybridation des sondes PNA, afin d'évaluer les effets de ces polymorphismes sur la méthode PNA/qPCR. Dans le principe de la sonde PNA, un mésappariement sur les séquences complémentaires provoque une instabilité et une perte élevée de la température d'hybridation de la sonde. La perte de température d'hybridation est plus ou moins élevée selon la nature de la base "mésappariée" et selon sa position sur la séquence de la sonde (Ørüm *et al.* 1993).

Si le mésappariement est central, l'instabilité est plus grande et la perte de température d'hybridation peut s'élever jusqu'à 15°C. C'est ainsi que nous avons choisi une position centrale des deux nucléotides A et G de la position 189 afin que le mésappariement éventuel à cette position permette une perte de température élevée et l'hybridation des amorces pour une amplification spécifique. La présence de polymorphismes dans la région centrale de la sonde aura la même conséquence, c'est-à-dire une perte élevée de la température d'hybridation ne permettant pas l'analyse de la position cible.

Quand le mésappariement a lieu sur les extrémités de la sonde, la perte de température est moins élevée (environ 7 à 8°C) et l'hybridation des amorces et/ou de la sonde PNA peut avoir lieu dans des proportions variables et indépendamment de la base en position 189.

Pour la sonde PNA 408, du fait de la présence d'un palindrome sur la séquence de la sonde, il est nécessaire avant de l'ajouter au mélange réactionnel, de l'incuber à 100°C pendant 10 minutes et ensuite de la stabiliser dans la glace et de maintenir tous les mélanges réactionnels dans la glace jusqu'au lancement dans l'appareil ABI Prism<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

En ce qui concerne les réactions de PCR classiques avec les sondes PNA afin d'évaluer la présence ou l'absence des segments cibles après migration dans un gel d'agarose et visualisation sous lumière UV. Dans 26 µl de volume final sont ajoutés: 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 nM de dNTPs, 300nM de chaque amorce, du tampon 1X et 1,5 U de Taq polymérase et

1 µl d'ADN (Promega). Les PCR étaient réalisées dans un thermocycleur Perkin Elmer 2400 avec une étape de dénaturation initiale de 10 min à 94°C suivit de 25 cycles comprenant: une étape de dénaturation (30 secondes à 94°C), une étape d'hybridation de la sonde PNA (30 s à 69°C, identique à toutes les sondes PNA), une étape d'hybridation des amorces (30 s à 60°C pour la position 189 et 56°C pour les positions 408 et 414) et une étape d'extension (30 s à 72°C), terminé par une extension finale de 5 min à 72°C.

En ce qui concerne la réaction de blocage de la sonde PNA lors des PCR en Temps Réel, les réactions contenaient: 2X de SYBR<sup>®</sup>Green Jump Start<sup>™</sup> Taq Ready Mix<sup>™</sup> (Sigma-Aldrich), 5 µl d'ADN, 300 nM de chaque amorce et 2 µM de la sonde PNA appropriée ou de H<sub>2</sub>O dans 26 µl de volume final. Le mélange réactionnel était soumis à une étape de digestion par une enzyme uracil-DNA glycosidase de 50°C pendant 2 min (élimination de l'ARN et des produits contaminants) suivit de 10 min à 95°C (activation de la polymérase Taq Gold) dans l'appareil ABI Prism<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Les qPCR étaient réalisées sur 40 ou 45 cycles selon les conditions citées précédemment, sauf pour l'étape d'extension finale qui n'est pas nécessaire pour la PCR en Temps Réel.

Les optimisations préliminaires et la validation de la méthode combinée PNA/qPCR ont été réalisées sur les deux extraits d'ADN musculaires cités dans le paragraphe précédent. Ces échantillons que nous appellerons "contrôles" ont été auparavant séquencés et identifiés comme A (wild-type = WT) ou G (mutant = M) à la position 189.

Un protocole de dissociation (Applied Biosystems) était réalisé systématiquement pour toutes les qPCR afin d'identifier le produit unique amplifié selon sa température de fusion (T<sub>m</sub>).

Tableau 9 : Liste des amorces et des sondes PNA utilisées pour la technique combinée PNA/qPCR.

Les amorces 5' sont chevauchantes sur les 7 premières bases de la sonde PNA afin de permettre l'exclusion de l'une ou l'autre suivant le nucléotide présent à la position cible et à la température donnée.

Région	Amorces et sondes PNA	Séquence (5'-3') selon Anderson <i>et al.</i> (20)
HVII: position 189	Amorce 5': L166	CCT ACG TTC AAT ATT <u>ACA GGC GA</u>
	Amorce 3': H253	GTG GAA AGT GGC TGT GCA G
	Sonde PNA 189A: <b>A</b> sur la position 189	CAG GCG AAC ATA CTT
	Sonde PNA 189G: <b>G</b> sur la position 189	CAG GCG <b>AGC</b> ATA CTT
HVIII: position 408	Amorce 5':L382	CTA ACC AGA TTT CAA ATT <u>TTA TCT TT</u>
	Amorce 3': H502	TGT GTG CTG GGT AGG ATG
	Sonde PNA 408T: <b>T</b> sur la position 408	TAT CTT <b>TTG</b> GCG GTA
HVIII: position 414	Amorce 5': L394	CAA ATT TTA TCT <u>TTT GGC GG</u>
	Amorce 3':H524	GTA TGG GGT TAG CAG CG
	Sonde PNA 414T: <b>T</b> sur la position 414	TTG GCG <b>GTA</b> TGC ACT

## **2.7. La quantification relative**

La quantification relative: c'est l'estimation du pourcentage de mutants par l'établissement d'une courbe de référence, ou par la variation de cycle entre l'amplification sans et avec la sonde PNA ( $\Delta C_t$ ).

Nous avons construit une courbe de référence expérimentale pour la mutation 189 à partir d'une échelle de pourcentage de variants G de 0 à 100, en mélangeant dans des proportions équimolaires en premier lieu les ADN des clones M et WT puis des contrôles M et WT. Un dosage par spectrophotométrie de la concentration ADN de chacun permet de mesurer une concentration initiale de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Une dilution au 1/10 suivit de 1/5 de chacun permet d'obtenir une concentration à 20  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , ce qui correspond à une quantité ADN finale de 100 ng (volume final ADN de 5  $\mu\text{l}$ ) qui est une quantité correcte pour une amplification par PCR en Temps Réel. La préparation des variants G est réalisée dans un volume final de 60  $\mu\text{l}$  pour chaque point.

Dans une première expérience, onze points (dans les pourcentages suivants : 0, 10, 20, ..., 90 et 100%) sont évalués, et chaque point est amplifié dans trois conditions : sans sonde PNA, avec la sonde PNA G et avec la sonde PNA A (tableau 9). Les onze points de cette échelle

ont été réalisés en triplicats (3 puits) dans les trois conditions sur une même manipulation ce qui nous a permis d'établir les valeurs des cycles seuil (Ct) pour chaque condition et d'évaluer la précision intra-test (Gibson *et al.* 1996). Ce test de précision est calculé en faisant la moyenne des trois valeurs de Ct des triplicats et l'écart type déduit. Cet écart type est exprimé en pourcentage par rapport à la valeur moyenne des Ct. Ce test permet d'évaluer la variation enregistrée dans une manipulation pour les différentes conditions d'amplification.

Une deuxième expérience était effectuée incluant sept points supplémentaires de 0, 1, 2, 3,...10, 15 et 20% et sept de 80, 85, 90, 91, 92, 93...jusqu'à 100% de variants G. Les points communs 0, 10, 20, 80, 90 et 100% de variants G entre les deux expériences nous ont permis d'évaluer la précision inter-test pour les valeurs de Ct mesurées (Gibson *et al.* 1996).

Cette courbe expérimentale établie ( $x = \% \text{ de mutant}$  ;  $y = \text{ratio des valeurs de Ct G/A}$ ) nous a permis d'évaluer le pourcentage de mutants par la relation inversée ( $x = \text{ratio des valeurs de Ct G/A}$  ;  $y = \% \text{ de mutant}$ ) à l'aide du logiciel Statistica v5.1 (StatSoft). La formule de la polynomiale est calculée par ce même logiciel et les points calculés à partir de cette courbe sont comparés aux points mesurés. La différence entre les points mesurés (expérimentaux) et les points calculés est évaluée et l'écart type moyenné pour l'ensemble de la courbe. Le traitement des données des échantillons est réalisé par ce même logiciel.

Pour chaque échantillon: Sur une même expérience, d'une part, trois réactions d'amplification sans PNA ont été faites et les valeurs de Ct établies. La quantité initiale de molécules matrices incluant les deux types molécules (Mutant (M) et Wild-Type (WT) donc la totalité des molécules ADNmt) est caractérisée par cette valeur de Ct. D'autre part, un triplicat d'amplification avec chaque sonde PNA est réalisé. Les Ct obtenus (Ct A pour la sonde PNA A et Ct G pour la sonde PNA G) sont utilisés pour calculer le taux de variant G ou A présent dans la totalité de l'ADNmt de l'échantillon.

Les triplicats d'un échantillon amplifié pour une même condition ne doivent varier que de 0,5 Ct dans une même manipulation pour être analysable (conseil du fabricant : Applied Biosystems) et nous pourrons ainsi évaluer la précision intra-test propre à chacun.

Pour chaque PCR en Temps Réel, un blanc d'amplification ainsi que les deux contrôles WT et M sont systématiquement inclus et sont des témoins de non-contamination, positif et négatif respectivement.



En ce qui concerne les positions 408 et 414, nous avons fait synthétisé seulement les sondes permettant le blocage des formes WT (PNA 408T et PNA 414T, voir tableau 9). Les réactions en qPCR étaient réalisées en triplicats pour les amplifications sans PNA et avec la sonde PNA WT. Nous avons déduit la quantification des formes mutées dans les échantillons par la variation de Ct entre l'amplification sans sonde et avec sonde ( $\Delta C_t$ ; voir figure 31, dans introduction aux techniques, paragraphe 4) et par extrapolation à partir de la courbe de référence 189 pour des valeurs de mutants  $<$  à 20%. En effet, pour ces deux mutations, aucun échantillon ne présentait un polymorphisme sur ces deux positions permettant d'avoir un contrôle M. Nous verrons plus loin que les clones ne pouvaient pas nous servir dans l'établissement d'une courbe de référence pour ces deux positions.

## **2.8. Le Southern blot**

Le Southern blot est une technique standard d'hybridation entre une molécule ADN et une sonde complémentaire à sa séquence. Cette technique a été réalisée seulement pour la position 189 afin de confirmer les résultats obtenus avec les autres techniques.

Un volume de 1  $\mu$ l d'ADN total était amplifié par PCR en utilisant les amorces inscrites dans le tableau 10 et permettaient l'amplification d'un segment de 160 pb. Les conditions de PCR étaient réalisées avec un thermocycleur ADN Perkin Elmer 2400 dans 26  $\mu$ l de volume réactionnel contenant: 1,5 mM  $MgCl_2$ , 200 nM dNTPs, 300 nM de chaque amorce, du tampon 1X (Promega), 1U de Taq polymérase (Promega). Les étapes PCR étaient déterminées suivant une dénaturation initiale à 94°C pendant 1 min, suivit de 35 cycles incluant une dénaturation de 15 s à 94°C, une hybridation de 30 s à 57°C, une extension de 45 s à 72°C et une extension finale de 2 min à 72°C.

Un volume de 10  $\mu$ l de produits de PCR pour l'ensemble des échantillons "modernes" était déposé dans un gel d'agarose à 0,7%. En ce qui concerne les échantillons osseux anciens, 24  $\mu$ l de produits de PCR était déposés après une PCR de 40 cycles.

Le transfert des segments ADN cibles était effectué sur une membrane Immobilon NY+ (Millipore), l'ADN étant transféré sur la membrane par capillarité puis ensuite fixé sous lumière UV. L'hybridation des membranes avec les sondes marquées en 5' par une molécule de digoxigénine à une concentration de 20  $\mu$ M (soit 20 pmoles dans 20 ml de tampon d'hybridation; Eurogentec; tableau 10) avait lieu à une température de 45°C dans un tampon

d'hybridation (8X SSC, 8X Denhardt's, 0,8% SDS) toute la nuit. Ensuite, les membranes ont été lavées deux fois dans un tampon de 2X SSC et 0,1% de SDS pendant 10 min à température ambiante, et lavées sous des conditions stringentes dans un tampon de 5X SSC et 0,1% SDS pendant 30 min à 60°C.

La détection des sondes hybridées et marquées était réalisée avec le Kit DIG Luminescent Detection (Roche Applied). La réaction anti-corps est réalisée dans un tampon de "Blocking Reagent" à 1% sous agitation pendant 30 minutes. Trois lavages étaient effectués sur les membranes, et le substrat (CSPD) était ajouté pendant 5 min. La révélation des sondes marquées par digoxigénine était faite par exposition sur des films photographiques dans des temps inclus entre 3 et 30 minutes et le marquage analysé avec le logiciel ImageQuant v1.1 (Molecular Dynamics).

Tableau 10 : Liste des amorces et des sondes marquées en 5' par une molécule de digoxigénine pour la technique de Southern blot sur la position 189 (région HVII).

Amorces et sondes digoxigénine	Séquence (5'-3') par Anderson <i>et al.</i> (1981)
Sonde digoxigénine WT: <b>A</b> sur la position 189	TAC AGG CGA <b>ACA</b> TAC TTA C
Sonde digoxigénine M: <b>G</b> sur la position 189	TAC AGG CGA <b>GCA</b> TAC TTA C
Amorce 5': L111	ACC CTA TGT CGC AGT ATC TGT C
Amorce 3': H253	GTG GAA AGT GGC TGT GCA G

## **2.9. L'analyse statistique**

Une analyse statistique a été réalisée sur 50 échantillons musculaires à partir des résultats de pourcentages de mutants 189 calculés avec la méthode PNA/qPCR .

Les analyses statistiques de comparaison des variables quantitatives ont été effectuées par des tests de student (Schwartz 1986) et réalisées sur le logiciel R v2.2 (The R Foundation for Statistical Computing). Pour l'ensemble des analyses statistiques le seuil de 5 % a été retenu comme significatif.

Les graphiques ont été effectués à partir logiciels Statistica v5.1 (StatSoft) et Excell (Microsoft).

## **2.10. La méthode ostéologique**

L'analyse des squelettes osseux des 4 individus Yakoutes<sup>9</sup> par les méthodes ostéologiques a été faite afin de déterminer leur appartenance à une tranche d'âge. Pour les 2 individus âgés (Yak 32 et Yak 20), leurs squelettes présentaient des stades extrêmes au niveau de la symphyse pubienne (Brooks et Suchey 1990) et de la jonction sacro-iliaque (Lovejoy 1985) et des phénomènes dégénératifs importants. En ce qui concerne les deux autres individus (Yak 22 et Yak 31), ils présentaient des caractères de sujets immatures (un jeune enfant et un adulte), leurs épiphyses n'étant pas totalement soudées (Scheuer et Black 2000).

---

<sup>9</sup> Réalisée par le Professeur Eric Crubézy

## CHAPITRE 2: RESULTATS

Nous recherchons à mettre en évidence trois mutations sous forme d'hétéroplasmie : A189G, T408A et T414G dans trois types de prélèvement tissulaire : des cellules buccales, du tissu musculaire et osseux. Pour cela nous avons mis en œuvre principalement trois techniques de détection : le séquençage automatique, la technique combinant des sondes PNA et la PCR en Temps Réel et le Southern blot.

### 1. Les digestions enzymatiques

La digestion enzymatique par l'enzyme de restriction Cac8I sur la position 189 est testée sur 10 échantillons musculaires.

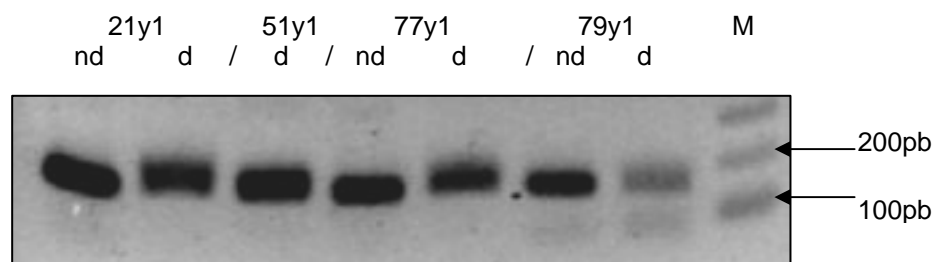


Figure 33: Digestion enzymatique par l'enzyme Cac8I.

Sur un segment de 160 pb : *nd*: non digéré: segment de 160 pb; *d*: digéré: deux segment de 80 pb.

*M*: marqueur de taille.

Comme montré dans la figure 33, l'évaluation de la présence de la mutation 189G à partir de cette technique est très difficile. Nous pouvons seulement constater pour l'homme âgé de 79 ans que le segment de 160 pb est présent dans un taux beaucoup plus faible dans le puits *d* par rapport au puits représentant les segments non digérés (*nd*). Le segment digéré de 80 pb est à peine décelable. Pour l'individu de 77 ans, les segments soumis à la digestion enzymatique (*d*) semblent en quantité plus faible par rapport au puits *nd*.

De même, des échantillons musculaires sont soumis à l'enzyme DdeI pour la mutation 408.

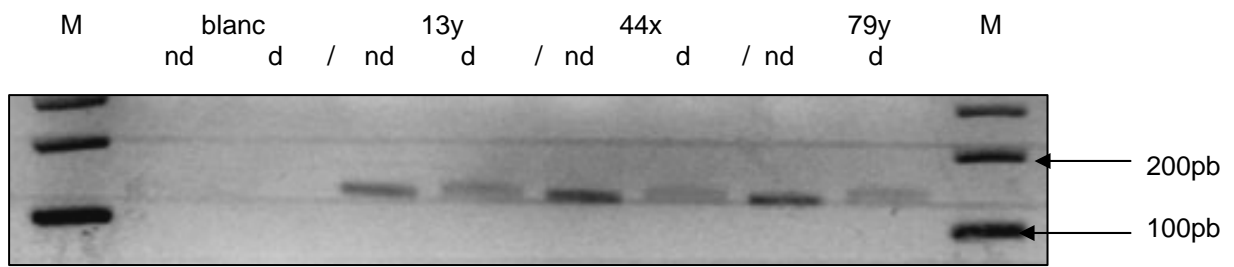


Figure 34: Digestion enzymatique par l'enzyme DdeI.

Sur un segment de 142 p : nd: non digéré: segment de 142 pb; d: digéré: deux segment de 117 et 25 pb;

M: marqueur de taille.

Les segments digérés sont plus faibles par rapport au non digérés, mais aucun segment de 142 pb n'est identifié.

Les digestions par l'enzyme FokI pour la position 414 sont elles aussi négatives.

## **2. Le séquençage automatique**

Les séquences des manipulateurs sont dans le tableau HVII OS de l'annexe 3, elles peuvent être identifiées et sont différentes des échantillons osseux et musculaires.

### **2.1. Les polymorphismes**

Tous les échantillons ont été analysés dans un premier temps par séquençage. En effet, la région recherchée en 189 est hautement polymorphe sur des positions voisines, par exemple en 182 ou en 195, et les sondes (pour la méthode PNA ou la technique de Southern blot) ont été synthétisées sur 15 bases ou 20 bases selon la séquence de Cambridge (Anderson *et al.* 1981) avec une variable des bases A et G sur la position 189 (tableaux 9 et 10). Il est donc nécessaire de connaître les séquences dans la région d'hybridation de la sonde afin de sélectionner les échantillons présentant une séquence de Cambridge complémentaire aux séquences des sondes. Les régions 408 et 414 sont peu polymorphes sur les positions voisines et donc ne présentaient pas la possibilité d'une variation de l'hybridation des sondes PNA par rapport à des polymorphismes adjacents (tableaux des polymorphismes des échantillons sur les régions HVII et HVIII : Annexe 3).

Sur les 74 échantillons musculaires analysés, 13 présentaient des polymorphismes entre la position 182 et 195 et n'ont pu être analysés par les méthodes de PNA/qPCR ou de Southern blot car leurs séquences n'étaient pas complémentaires aux sondes. Parmi ces 13 polymorphismes (tableau 11), 9 sont situés sur les extrémités des sondes (195 ou 182) et 4 en position plus centrale (185 ou 188).

Trente-neufs prélèvements buccaux provenant d'individus de 4 à 85 ans sont aussi testés par cette technologie. Pour 6 d'entre eux (appartenant à 2 familles de lignée maternelle différente) nous avons identifié un G à la position 189 (tableau 11) analysé comme un polymorphisme transmis car il est observé dans tous les membres de chaque famille. D'autres polymorphismes sont aussi détectés par la méthode de séquençage (tableau 11) et ils sont situés soit aux extrémités soit en position centrale dans la région d'hybridation des sondes. Le recrutement des échantillons buccaux ayant été effectué selon un regroupement familial, la détection des polymorphismes nécessite d'éliminer plusieurs familles (au total 14 individus) de l'analyse par PNA/qPCR ou par Southern blot.

Pour les échantillons osseux, parmi les 26 os modernes, cinq individus présentaient un polymorphisme dans la région d'hybridation des sondes PNA, 4 pour des positions sur l'extrémité des sondes et 1 en position centrale (tableau 11). Sur ces 5 individus, 3 sont des individus âgés de 62, 71 et 81 ans et n'ont pas pu être analysés par les techniques PNA/qPCR et de Southern blot. De plus, un individu de 35 ans présentait deux polymorphismes, en position 195 et 198 qui sont inclus dans la région d'hybridation de la sonde digoxigénine, qui est une sonde de 19 bases s'hybridant des positions 180 à 198.

Sur les 4 échantillons osseux anciens, pour un individu (jeune enfant), nous n'avons jamais pu obtenir d'ADN sur cet extrait, et nous n'avons pu réaliser aucune technique à partir de cet échantillon. Pour les 3 autres individus, le séquençage a été fait à partir d'un segment amplifié de 160 pb, et aucun polymorphisme n'est identifié dans la région d'hybridation des deux types de sondes en 189.

Tableau 11 : Caractérisation des polymorphismes dans la région d'hybridation des sondes PNA 189.

Sequence de Reference (Anderson <i>et al.</i> 1981)		1	1	1	1	1	1	1
		8	8	8	8	8	9	9
		2	4	5	8	9	4	5
	n	C	G	G	A	A	C	T
Echantillons musculaires	7	.	.	.	.	.	.	C
	1	.	.	.	.	G	.	C
	1	T	.	.	.	.	.	.
	2	.	.	A	G	.	.	.
	1	.	.	A	.	.	.	.
	1	T	.	C	.	.	.	C
Echantillons buccaux	6	.	.	.	.	G	.	.
	1	.	.	.	.	.	.	C
	2	T	A	.	.	.	.	.
	6	.	.	A	G	.	.	.
Echantillons osseux modernes	3	.	.	.	.	.	.	C
	1	.	.	.	.	.	T	.
	1	.	.	A	.	.	.	.

## 2.2. La limite de détection

Afin de tester la limite de détection de la méthode de séquençage automatique, des proportions de variants G de 0, 10, 20, 30, 40, 50 et 100% pour la position 189, préparés à partir d'un mélange ADN équimolaire des contrôles M et WT, ont été soumis à cette technique.

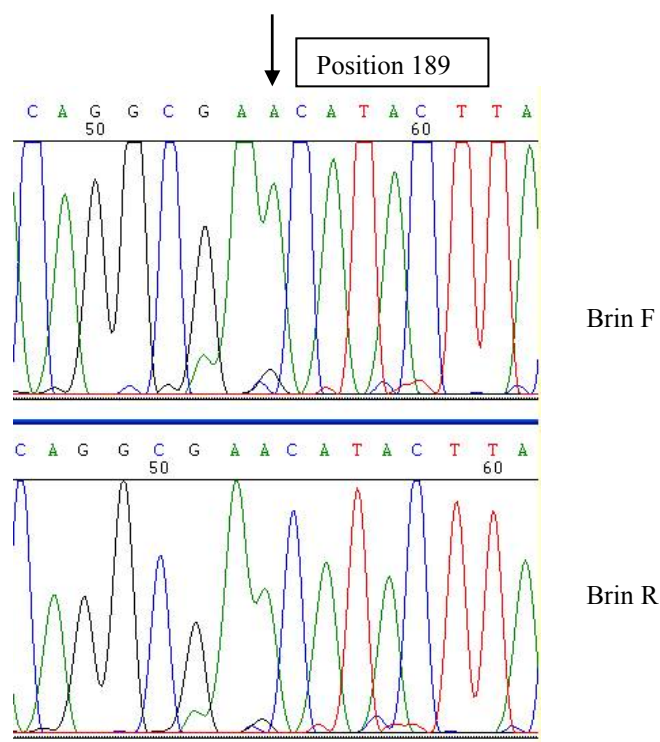


Figure 35 : Electrophorégramme à la position 189 des deux brins Fet R pour le variant G à 10%.

Un pic G très faible à la position 189 est visible mais ne peut en aucun cas être distingué des autres pics sur d'autres positions, s'incorporant complètement dans le bruit de fond.



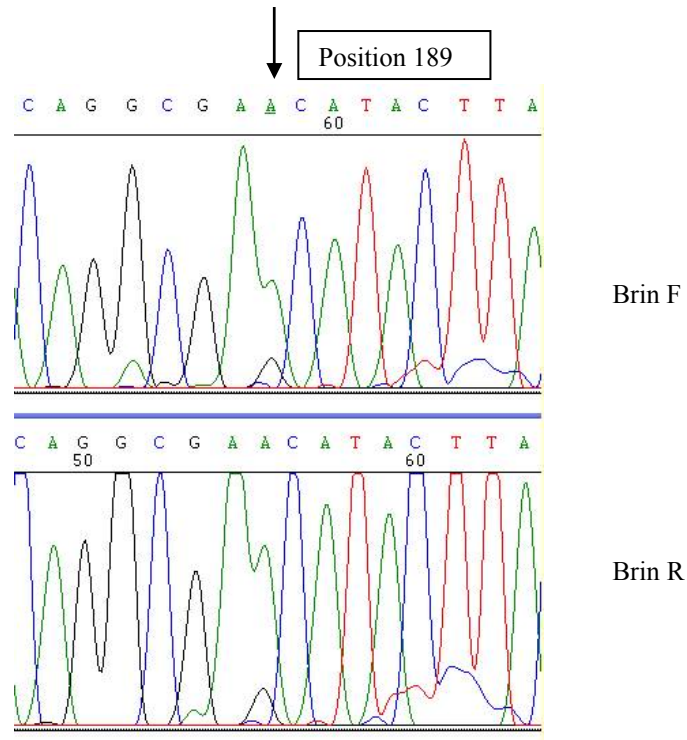


Figure 36 : Electrophorégramme à la position 189 des deux brins Fet R pour le variant G à 20%.

Un pic G à la position 189 est visible mais pour l'analyste ne recherchant pas spécifiquement une hétéroplasmie à cette position, les pics G s'insèrent dans le bruit de fond global.

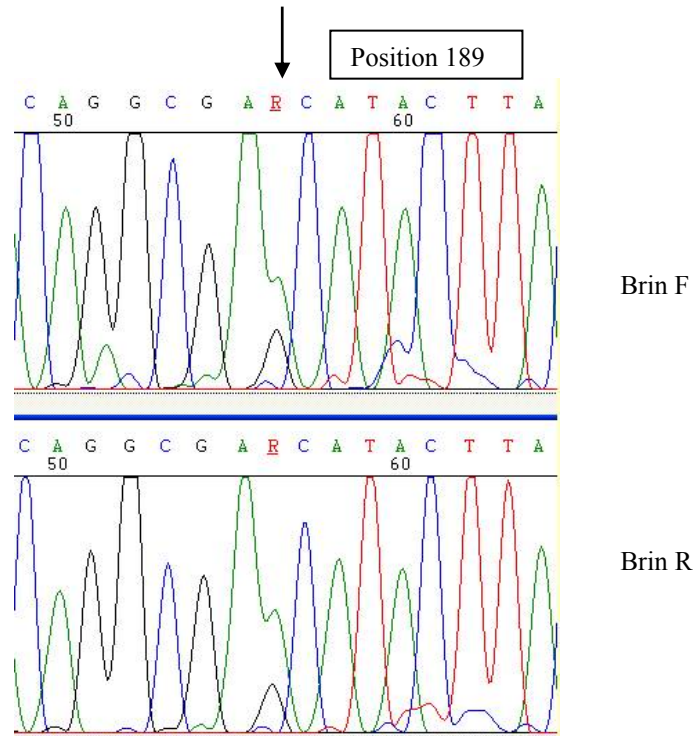


Figure 37 : Electrophorégramme à la position 189 des deux brins Fet R pour le variant G à 30%.

Un pic G à la position 189 n'est vraiment détectable qu'à partir de 30% de variants G. Le logiciel Sequencing Analysis 3.7 (Applied Biosystem) lui attribuant un n pour cette position (n : non déterminé). En ce qui concerne l'analyste, il peut sans doute identifier le pic G, et si le bruit de fond reste un peu trop important pour ces séquences et que le doute subsiste, il pourra réitérer la manipulation en partant de l'ADN initial de l'échantillon.

Il a été démontré par des expériences de dilutions en série que les niveaux faibles ( $\leq 20\%$ ) d'hétéroplasmie ADNmt ne peuvent pas être correctement détectés par séquençage automatique (Chinnery *et al.* 2001). A partir des figures 35, 36 et 37, nous démontrons aussi que la technique de séquençage automatique de l'ADN ne permet pas une estimation quantitative de proportion de mutants inférieure à 30%.

### 2.3. Les hétéroplasmies sur les positions 189, 408 et 414

Sur les 74 échantillons musculaires qui ont pu être analysés par la méthode de séquençage, onze ont été identifiés avec une hétéroplasmie A/G à la position 189, un individu de 38 ans et les 10 autres inclus dans des âges de 62 à 97 ans (tableau HVII muscle dans annexe 3 et tableau 12).

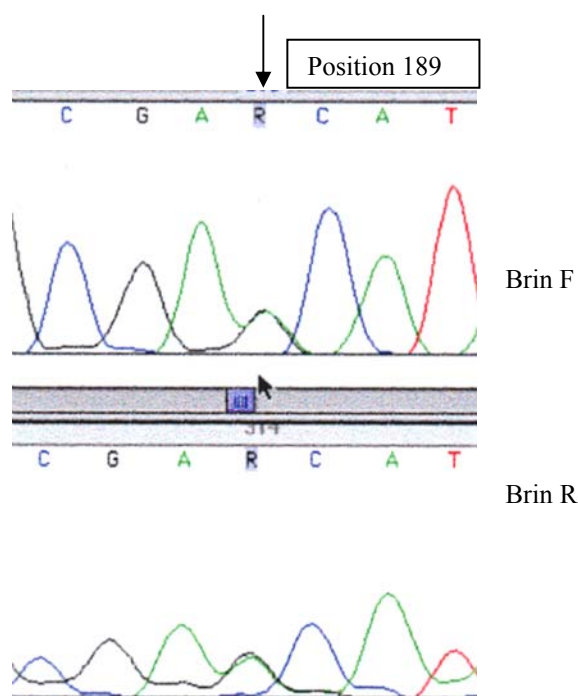


Figure 38 : hétéroplasmie A189G sur un prélèvement musculaire issu d'un homme âgé de 79 ans.

Parmi ces onze hétéroplasmies détectées, deux individus, âgés de 68 et 77 ans, présentaient un polymorphisme en position 195, de ce fait ils ne pouvaient être analysés par les méthodes utilisant les sondes (tableau HVII muscle dans annexe 3).

Aucune hétéroplasmie A189G n'a été détectée par la méthode de séquençage dans les 39 prélèvements buccaux et dans tous les échantillons osseux (tableau HVII buccal et os dans annexe 3 et tableau 12).

En ce qui concerne les positions 408 et 414, aucune hétéroplasmie ne sont détectées par la méthode de séquençage automatique dans tous les types tissulaires analysés (tableaux HVIII pour tous les types tissulaires dans annexe 3).

## 2.4. Les hétéroplasmies sur d'autres positions

Le séquençage automatique nous a permis d'analyser l'ensemble des régions HVII et HVIII. Ainsi, d'autres hétéroplasmies ont pu être analysées sur d'autres positions: 3 prélèvements musculaires provenant d'individus âgés de 59 à 63 ans présentaient une hétéroplasmie T/C à la position 72 (tableau 12). Parmi ceux-ci nous remarquerons que pour une femme âgée de 63 ans dont nous avons obtenu les deux types de prélèvements, l'hétéroplasmie T72C mis en évidence dans le tissu musculaire est absente dans les cellules buccales (figure 39).

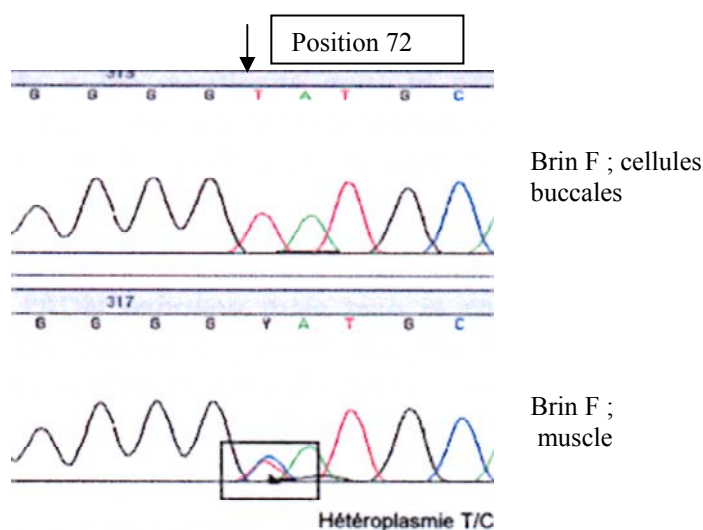


Figure 39: Comparaison des deux profils de séquence sur la position 72 entre le muscle et les cellules buccales d'un individu de 63 ans. *D'après le rapport de DUT de S.Romac 2003: p19.*

De plus un individu de 54 ans était identifié 73A/G et un autre de 30 ans 185A/G dans le tissu musculaire (tableau 12).

Au niveau des prélèvements osseux, sur un prélèvement issu d'une femme âgée de 105 ans, une seule hétéroplasmie est reconnue A/G sur la position 73 (figure 40 et tableau 12).

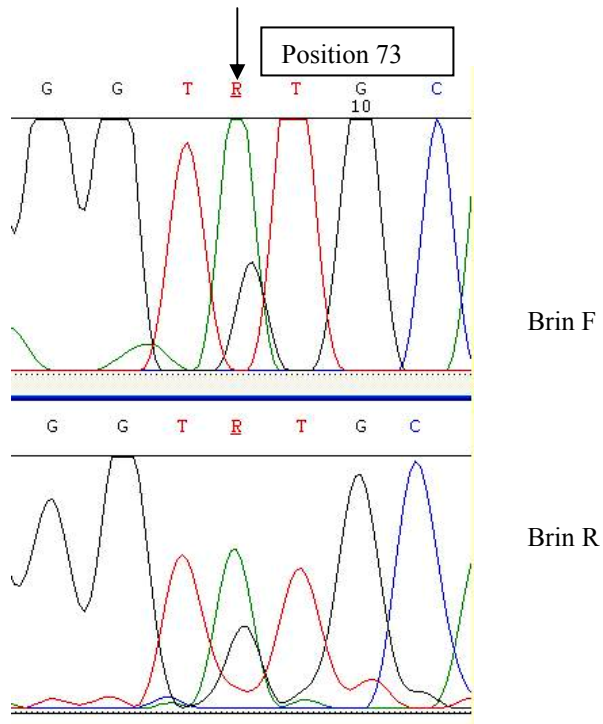


Figure 40: Hétéroplasmie A73G identifiée sur un prélèvement osseux d'une femme âgée de 105 ans. Une deuxième analyse de séquence indépendante a été réalisée à partir de l'échantillon initial, les profils restants identiques en fin d'analyse.

Aucunes hétéroplasmies ne sont identifiées dans les prélèvements buccaux (tableau 12).

Tableau 12: Hétéroplasmies détectées par la méthode de séquençage automatique.

		Séquençage automatique				
		Hétéroplasmies				
Echantillons	n	n	A185G	A189G	T72C	A73G
Tissu musculaire	75	74	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
Cellules buccales	39	39	0	0	0	0
Os modernes	26	23	0	0	0	<b>1</b>
Os anciens	4	3	0	0	0	0

### 3. La technique PNA

#### 3.1. La mise au point sur les clones

La mise au point des concentrations de sonde et des quantités ADN sur gel d'agarose avec les clones correspondants et des ratios de ceux-ci afin de tester le blocage par les sondes PNA a été effectuée.

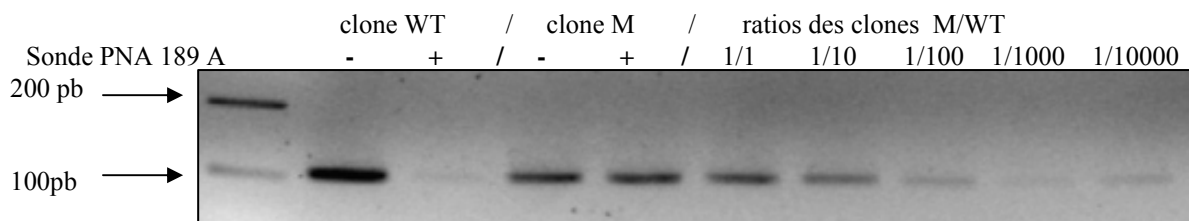


Figure 41: Evaluation du blocage de l'amplification PCR sur les clones WT et M de la position 189 par la sonde PNA 189A.

Pour une PCR de 25 cycles, l'amplification est réalisée sans sonde PNA ou avec la sonde PNA 189A à une concentration de 2  $\mu$ M. Le blocage par la sonde est observé sur le clone WT et l'amplification a lieu sur le clone M malgré la présence de la sonde avec une inhibition minimale. L'application de la sonde PNA sur les ratios des clones M/WT permet de d'observer que, dans les taux très faibles à partir de 1%, on ne peut vraiment différencier les points.

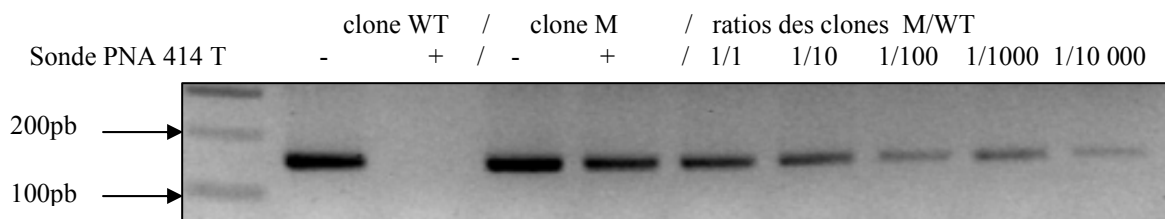


Figure 42: Evaluation du blocage de l'amplification PCR sur les clones WT et M de la position 414 par la sonde PNA 414T.

L'amplification PCR de 28 cycles sans ou avec la sonde PNA 414T (2  $\mu$ M) nous montre le blocage du clone WT, et une inhibition un peu plus élevée pour l'amplification avec la sonde sur le clone M. Dans les taux de mutants faibles, nous pouvons constater que l'amplification

du point 1/1000 est plus importante que pour le point 1/100. Il a déjà été constaté que parfois le blocage par la sonde PNA n'est pas complet lors de la PCR (Murdock et Wallace 2002). Ces manipulations ont été réalisées de nombreuses fois avec différentes concentrations de sonde ou de nombre de cycles. Pour une condition donnée, le blocage varie légèrement d'une PCR à l'autre. Ce blocage incomplet est surtout visible dans des taux faibles de mutants.

### **3.2. La mise au point sur les contrôles**

A partir des conditions évaluées précédemment (25 à 28 cycles de PCR, 2  $\mu$ M de sonde PNA, 300 nM de chaque amorce) les deux sondes PNA 189 A et G sont appliquées lors de l'amplification ADN des contrôles WT et M pour la position 189 et d'un individu âgé de 79 ans.

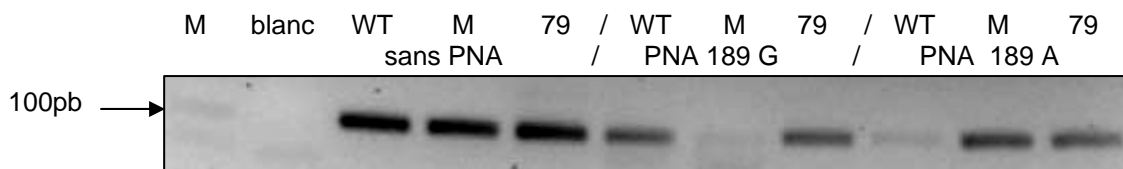


Figure 43: Evaluation du blocage de l'amplification PCR sur les contrôles WT et M de la position 189 et sur un individu âgé de 79 ans par les sondes PNA 189A et 189G.

L'amplification PCR sans sonde montre que les concentrations ADN initiales et l'efficacité des amorces sont identiques pour les 3 aliquots. La sonde PNA 189G, bloque effectivement le contrôle M, et permet l'amplification du contrôle WT et de l'échantillon 79 avec une légère inhibition de la PCR. De même, la sonde PNA 189A bloque l'amplification du contrôle WT, le contrôle M et l'échantillon 79 étant amplifiés.

## **4. La PCR en Temps Réel**

### **4.1. La spécificité des amorces**

Dans la technique d'amplification par PCR en Temps Réel avec le fluorophore SYBR® Green, il est nécessaire de démontrer l'amplification d'un seul segment par un protocole de dissociation en fin de PCR : la courbe de fusion (introduction partie 2 paragraphe 3).

La présence d'un seul produit d'amplification par segment amplifié est confirmé et la température de dissociation de chacun d'eux est identifiée (annexe 4). En ce qui concerne le segment amplifié pour la position 189, sa longueur est de 105 pb et son T<sub>m</sub> spécifique est de 75°C. Pour le segment comprenant la position 414, sa longueur est de 147 pb et son T<sub>m</sub> de 83°C, et pour le segment incluant la position cible 408, sa longueur est de 137 pb et son T<sub>m</sub> est de 81°C.

### **4.2. L'efficacité de la PCR**

L'efficacité des PCR pour les trois segments cibles a été déterminée. Elle consiste à tester 4 concentrations d'amorces sur 4 concentrations ADN. Nous avons évalué systématiquement les concentrations d'amorces à 900, 600, 300 et 100 nM sur des concentrations ADN de 100, 50, 25 et 12,5 ng/μl (annexe 5).

L'efficacité de PCR ( $E$ ) est calculée selon l'équation:  $E = 10^{(-1/\text{pente})}$  et doit être comprise entre 90 et 120% (Gibson *et al.* 1996).

L'efficacité d'amplification pour le segment incluant la position 189 était de 114%, et de 97% et 105% pour les segments cibles des positions 408 et 414 respectivement, à une concentration d'amorces de 300 nM (annexe 5).



### 4.3. La linéarité de l'amplification PCR

Pour tester la linéarité de l'amplification par PCR en Temps Réel, nous avons réalisé des dilutions comprises entre 100 ng/μl et 0,01 ng/μl d'ADN total à partir des contrôles WT et M. L'évaluation de l'amplification est réalisée pour les 5 concentrations ADN en duplicats (2 puits) sur les deux contrôles WT et M pour le segment de la mutation 189 et sur un contrôle WT pour les deux autres segments des positions 414 et 408.

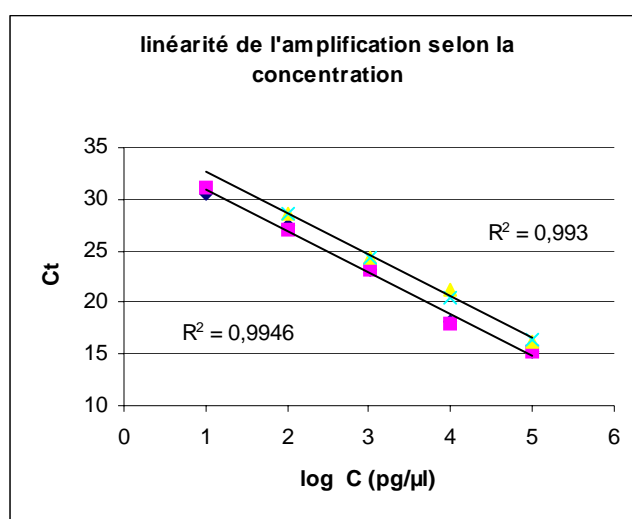


Figure 44 : Linéarité de l'amplification en relation avec la concentration ADN à partir des contrôles WT et M pour la position 189.

L'amplification des dilutions en série des ADN des contrôles réalisée sans sonde PNA montre une relation linéaire inverse entre les valeurs de Ct et le logarithme de la concentration ADN initiale.

Cette relation linéaire inverse entre le logarithme de la concentration ADN et le cycle seuil d'amplification (Ct) est démontrée pour les 3 segments cibles.

## 5. La méthode combinée PNA/qPCR

### 5.1. La linéarité du blocage de la PCR par les sondes PNA

Pour évaluer la linéarité du blocage de l'amplification PCR par les sondes PNA selon la concentration ADN, nous avons effectué une série de dilutions comprises entre 100 ng/μl et 0,001 ng/μl d'ADN total à partir des contrôles WT et M sur la position 189. Chaque point est analysé en duplicats.

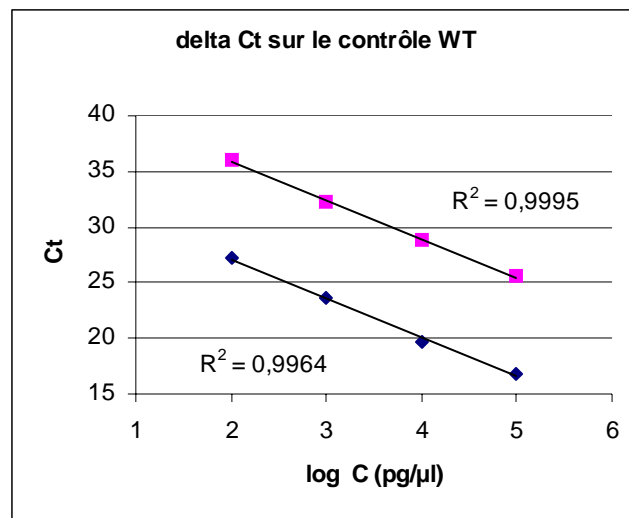


Figure 45 : Linéarité de l'amplification sur les dilutions en série des matrices ADN du contrôle WT en position 189 sans et avec PNA.

*Les triangles représentent l'amplification sans PNA et les carrés, l'amplification avec la sonde PNA 189A (WT).*

La différence entre le cycle seuil (Ct) des amplifications sans et avec PNA ( $\Delta Ct$ ) était constante pour chaque concentration ADN initiale. Le  $\Delta Ct$  du contrôle WT était d'environ 10 cycles pour toutes les concentrations.

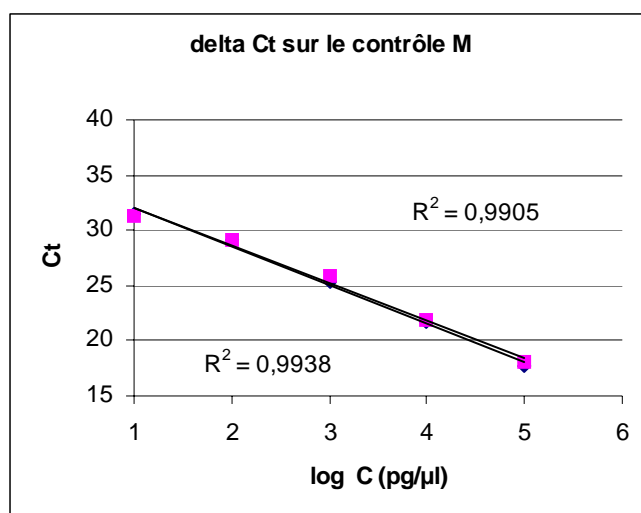


Figure 46 : Linéarité de l'amplification sur les dilutions en série des matrices ADN du contrôle M en position 189 sans et avec PNA.

*Les triangles représentent l'amplification sans PNA et les carrés, l'amplification avec la sonde PNA 189A (WT).*

Le  $\Delta Ct$  du contrôle M était caractérisé par une faible variation de Ct.

Les différences de cycles ( $\Delta Ct$ ) entre l'amplification sans sonde et avec les sondes PNA restent constantes pour les concentrations ADN total comprises entre 100 et 0,1 ng/μl.

Ainsi l'amplification initiale de chaque échantillon sans sonde devait être comprise dans des cycles (Ct) de 16 à 26. Cette linéarité du blocage de la sonde PNA A était aussi mesurée sur deux autres échantillons, les  $\Delta Ct$  de l'ordre de 2,3 et 1,5 étaient constants pour les 4 concentrations de 100 ng/μl à 0,1 ng/μl.

Si la concentration ou la qualité de l'ADN des échantillons s'avéraient trop faible, l'analyse par PNA/qPCR ne pouvait être faite, car en dehors de la phase linéaire des sondes PNA.

Pour cette raison, onze échantillons musculaires et deux échantillons osseux modernes ont été exclus de l'analyse PNA/qPCR.

## 5.2. L'efficacité du blocage de la PCR par les sondes PNA

Afin d'évaluer l'efficacité du blocage PCR par les sondes PNA 189A et 189G (PCR clamping) selon le pourcentage de mutants présent dans l'ADNmt total nous avons réalisé, dans un premier temps, des ratios de variants G à partir des clones WT et M de la position 189. Nous avons appliqué les 2 types de sondes PNA (A et G) lors des amplifications en qPCR, chaque point étant analysé en triplicats (figures 47 et 48).

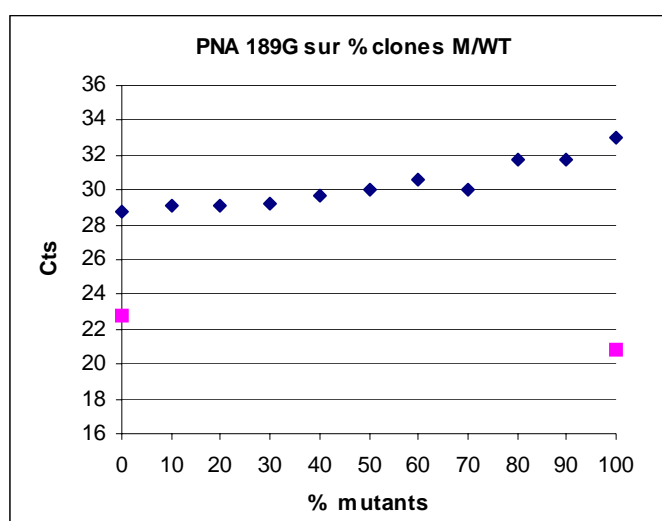


Figure 47 : Amplification selon le pourcentage de mutants (variants 189G obtenus à partir des clones WT et M) avec la sonde PNA G.

*Les losanges représentent le cycle d'amplification (Ct) des mutants G avec la sonde PNA G, les carrés représentent le Ct des clones WT et M sans sonde PNA.*

Nous pouvons constater à partir de la figure 47 que la variation de cycle entre l'amplification sans sonde et avec sonde ( $\Delta Ct$ ) est de 12,5 pour le contrôle M et de 6 pour le contrôle WT quand on applique la sonde PNA 189G (M). Mais la courbe reste très linéaire, et la variation des cycles entre deux points reste très faible.

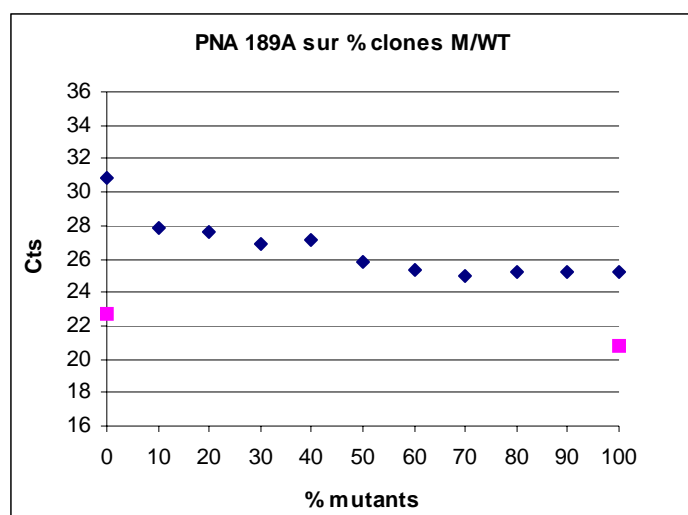


Figure 48 : Amplification selon le pourcentage de mutants (variants 189G obtenus à partir des clones WT et M) avec la sonde PNA A.

*Les losanges représentent le cycle d'amplification (Ct) des mutants G avec la sonde PNA A, les carrés représentent les Ct des clones WT et M sans sonde PNA.*

De la même manière, sur la figure 48, les  $\Delta C_t$  pour les contrôles WT et M sont de 8,2 et 4,5 respectivement avec la sonde PNA 189A (WT), mais la courbe reste encore très linéaire et la variation entre les cycles ne permet pas une discrimination correcte du taux de mutants. Cette expérimentation avec la sonde PNA A a été réalisée une deuxième fois en vérifiant bien les concentrations ADN initiales et les proportions des contrôles, le résultat s'est avéré identique.

Dans un deuxième temps, l'efficacité du blocage PCR par les sondes PNA 189A et 189G selon le pourcentage de mutants présent dans l'ADNmt total est évaluée sur les ratios de variants G provenant des contrôles WT et M de la position 189. Nous avons appliqué les 2 types de sondes PNA (A et G) lors des amplifications en qPCR chaque point étant analysé en triplicats (figures 49 et 50).

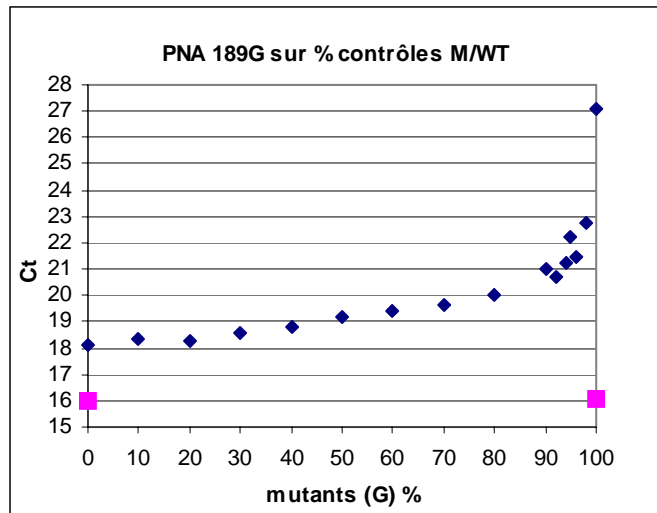


Figure 49 : Amplification selon le pourcentage de mutants (variants 189G) avec la sonde PNA G.

Les losanges représentent le cycle d'amplification (Ct) des mutants G avec la sonde PNA G, les carrés représentent les Ct des contrôles WT et M sans sonde PNA.

L'évaluation du pourcentage de mutants par la différence de Ct entre l'amplification sans sonde PNA et avec la sonde PNA G ( $\Delta Ct G$ ) est résolutive dans des valeurs soit  $<$  à 80%, soit  $>$  à 80%.

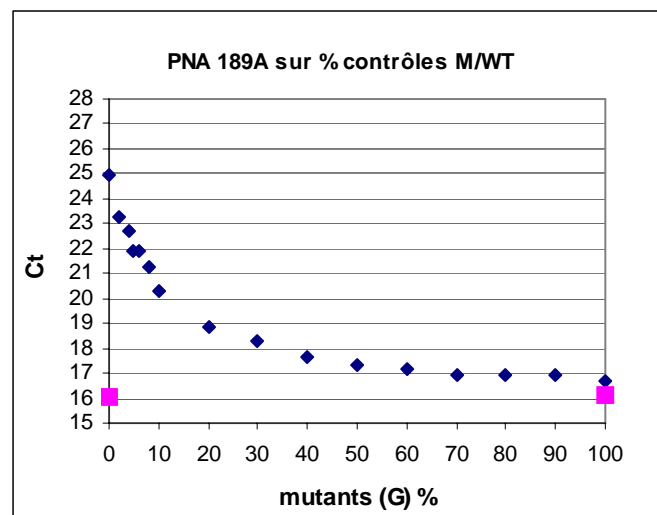


Figure 50 : Amplification selon le pourcentage de mutants (variants 189G) avec la sonde PNA A.

Les losanges représentent les valeurs de Ct des mutants G avec la sonde PNA A, les carrés représentent les valeurs de Ct des contrôles WT et M sans sonde PNA.

L'évaluation du pourcentage de mutants par la différence de Ct entre l'amplification sans sonde PNA et avec la sonde PNA A ( $\Delta Ct A$ ) est résolutive dans des valeurs soit  $<$  à 20%, soit  $>$  à 20%.

Chaque graphe nous montre que la relation entre la proportion de mutants et le blocage de l'amplification (PCR clamping) est exponentielle et que les courbes sont inversées entre les deux sondes. Ainsi, les valeurs de cycles (Ct) comprises entre 0 et 80% de variant G pour la sonde PNA G (figure 49) et entre 20 et 100% pour la sonde PNA A (figure 50) varient très faiblement.

Les différences de cycles entre l'amplification sans PNA et avec une sonde PNA ( $\Delta Ct$ ) ne sont vraiment résolutive qu'entre 80 et 100% de mutants avec la sonde PNA G (figure 49) et entre 0 et 20 % pour la sonde PNA A (figure 50). Finalement, l'utilisation d'une seule sonde nous aurait permis seulement de discriminer d'une part un taux de mutants  $\leq$  ou  $\geq$  à 80 % de variant G pour la sonde PNA G et d'autre part d'un taux de mutants  $\leq$  ou  $\geq$  à 20% de variant G pour la sonde PNA A (figure 49 et 50). De plus, pour que les valeurs de Ct soient opposées et éventuellement complémentaires entre les 2 sondes PNA il faut se placer dans les extrémités de variant G (0 à 20% ou de 80 à 100%).

Les différences de blocage de la PCR par la sonde PNA entre les clones et les contrôles peuvent s'expliquer par les types de matrice soumis à la PCR en Temps Réel. En effet, il a été constaté que les valeurs de Ct peuvent être plus basses quand les matrices proviennent de produits PCR ou directement de l'ADN initial (génomique ou mitochondrial) à l'opposé des clones utilisés pour établir une courbe standard (Shi et al. 2004). Il est conseillé alors que les échantillons utilisés pour établir la courbe standard soient de même nature que les échantillons testés.

### **5.3. La courbe de référence 189 à partir des contrôles**

Afin d'estimer les taux de mutation de façon plus résolutive nous avons établi une courbe de référence des variants G en faisant le rapport des Ct de la sonde G sur la sonde A (rapport des Ct G/A). Nous pouvons constater, à partir de la figure 51, que le rapport des valeurs de Ct G/A nous permet d'améliorer la résolution dans la quantification des taux de mutants présents entre 20 et 80% grâce à une pente plus forte et d'augmenter la précision.

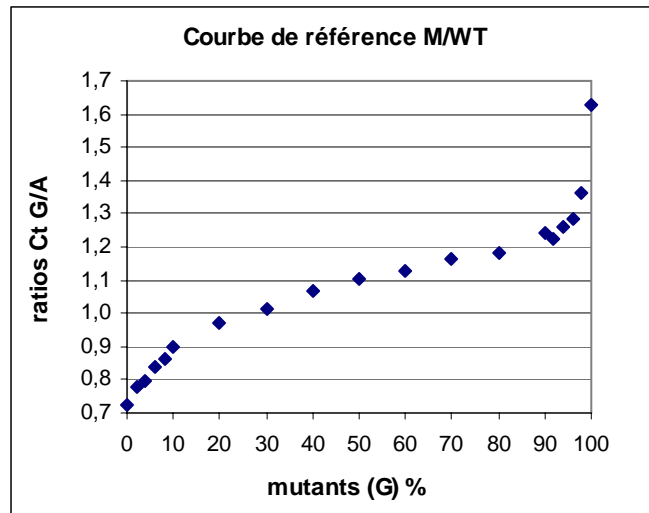


Figure 51 : Rapport des valeurs de cycle seuil (Ct) des sondes PNA G sur PNA A mesurées (ratio Ct G/A) selon le pourcentage de mutants (variants 189G).

A partir de la courbe de référence de variants G (contrôles M/WT) et les rapports des Ct G/A mesurés expérimentalement (figure 51), nous avons pu établir la relation inversée et rechercher la fonction applicable avec le logiciel Statistica v5.1 (StatSoft).

Dans cette relation inversée nous avons exclu les points 0 et 100% de variants G et leurs rapports de Ct G/A (de 0,725 pour le point 0% et de 1,6 pour le point 100%) car ils ne nous apportaient pas d'information supplémentaire. Cela nous a permis d'appliquer une fonction polynomiale calculée par le logiciel Statistica v5.1 (figure 52).

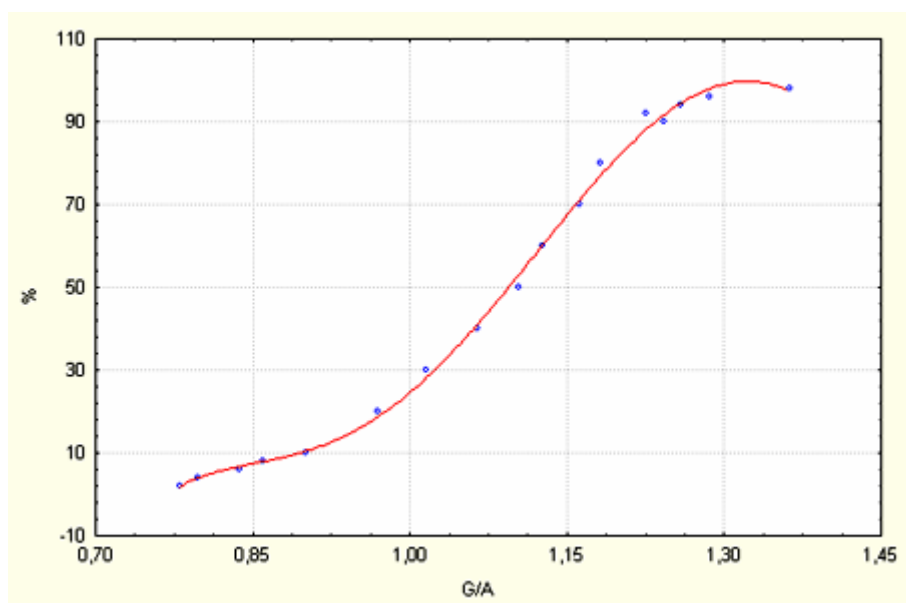


Figure 52 : Pourcentage de mutants 189G calculé à partir du rapport des valeurs de Ct G/A.



La formule de cette fonction polynomiale ( $y = -2737,2 + 11918x - 19242,5x^2 + 13574,1x^3 - 3486,6x^4$ ) appliquée aux rapports de Ct G/A mesurés de la courbe expérimentale a permis d'obtenir les valeurs de pourcentage de mutants calculés avec une moyenne de l'écart type de 1,4% (écart type minimal : 0,02%, écart type maximal : 4,1%).

Ainsi, nous avons appliqué la formule de cette fonction polynomiale aux rapports de Ct G/A mesurés sur les échantillons pour estimer un pourcentage de mutants calculé.

#### **5.4. La précision des tests**

Afin d'évaluer la précision des tests effectués pour les courbes de variants G, nous avons réalisé dans une même expérience et pour chaque condition (sans sonde PNA, avec sonde PNA G ou A) des triplicats d'amplification. Comme conseillé par le fabricant (Applied Biosystems), nous avons accepté comme variation de cycle entre les triplicats d'une même condition une valeur  $\leq$  à 0,5. Ainsi la précision intra-test sur les contrôles WT et M dans les trois conditions PCR était incluse entre 0,1 et 0,5% (Gibson *et al.* 1996).

La précision des tests réalisée sur 2 expérimentations sur 2 jours différents et représentant deux fois un triplicat pour chaque contrôle a été aussi calculée. La précision inter-test de l'amplification était comprise entre 1,5% et 4,4% pour les 3 conditions PCR des deux contrôles (Gibson *et al.* 1996).

#### **6. Les échantillons analysés par PNA/qPCR**

Pour tous les échantillons, la variation entre les triplicats d'un même échantillon dans une même expérience devait être inférieure à 0,5 Ct pour être statistiquement représentatif selon les recommandations du fabricant (Applied biosystems). Ainsi les échantillons ne présentant pas une amplification stable lors d'une même expérience sont soit re-analysés soit exclus.

Les échantillons ayant une amplification correcte et stable présente des variations de Ct faibles ( $\leq$  à 0,5). Ainsi la précision intra-test mesurés à partir des triplicats de chaque échantillon, provenant des trois types tissulaires, sont inclus entre 0,06% et 1,68% (Gibson *et al.* 1996).

## 6.1. La mutation A189G

Dans l'analyse des 23 échantillons buccaux par PNA/qPCR, l'hétéroplasmie en position 189 a été détectée sur 18 échantillons à un niveau supérieur à 5%, le maximum s'élevant à 12,6% (figure 53).

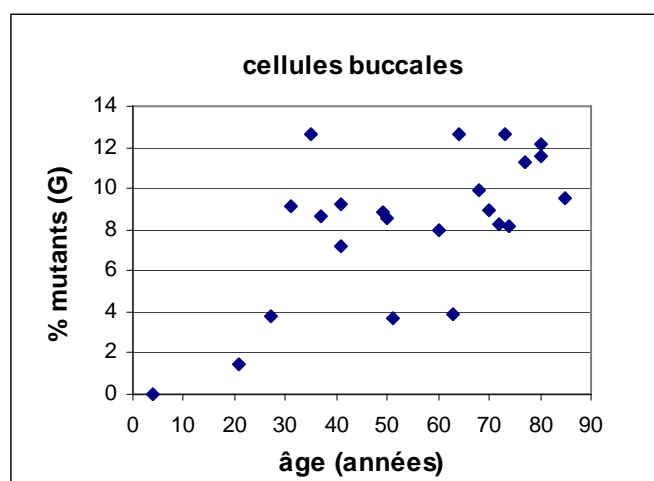


Figure 53 : Accumulation dans les cellules buccales de l'hétéroplasmie A189G par rapport à l'âge.

La méthode PNA/qPCR a permis d'enregistrer des variations d'amplification avec les sondes PNA G et A dans les échantillons buccaux. L'ensemble des rapports de Ct G/A mesurés n'a jamais dépassé la valeur de 0,92 ce qui a donné une estimation maximum de pourcentage de variant G calculé de 12,6%.

De telles hétéroplasmies étaient notablement observées dans quatre individus (4, 37, 60 et 85 ans) appartenant au même lignage maternel (famille 1 ; figure 54). Tandis que la mutation était détectée dans les trois adultes (dans des niveaux de 7 à 9,5%), elle n'est pas observée pour l'enfant. Similairement l'hétéroplasmie détectée dans les membres âgés de 73 et 80 ans des autres familles (famille 2 et 4), est plus faiblement observé dans les plus jeunes (de 1,5 à 8,9% ; figure 54).

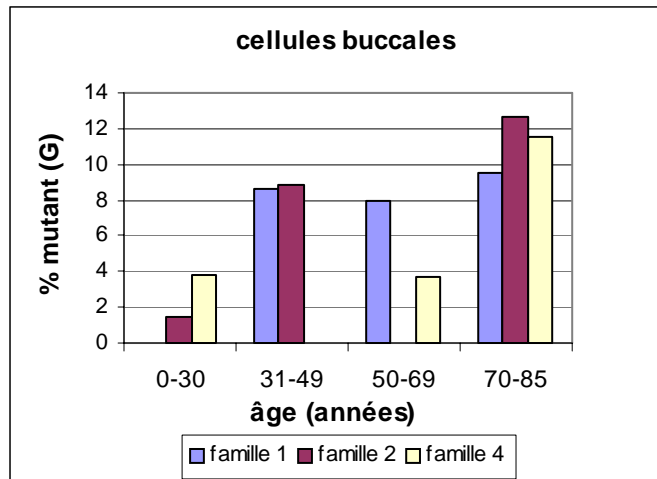


Figure 54 : Accumulation de l'hétéroplasmie A189G dans les cellules buccales d'individus appartenant à la même lignée maternelle dans trois familles différentes.

Nous pouvons constater, à partir de ces familles et malgré les niveaux faibles de mutation, que la transition A189G sous forme d'hétéroplasmie est une mutation somatique. Au regard de l'ensemble des individus de l'échantillonnage (figure 53) les niveaux d'hétéroplasmies sont très faibles et il n'apparaît pas un âge seuil de mutation spécifique.

Cinquante échantillons musculaires à partir d'individus de 1 à 97 ans sont analysés par la méthode PNA/qPCR. La figure 55 montre l'accumulation de la mutation A189G en fonction de l'âge du sujet étudié.

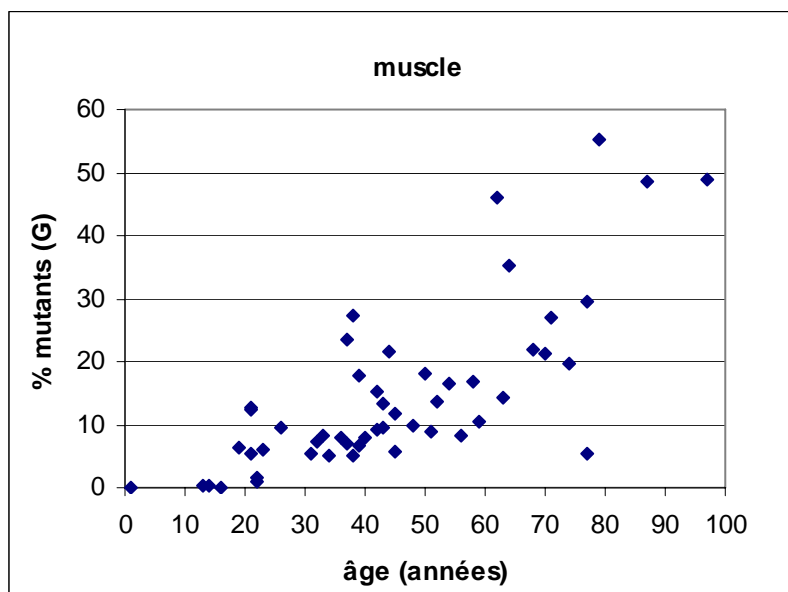


Figure 55 : Accumulation de l'hétéroplasmie A189G dans le tissu musculaire avec l'âge.

A partir de 50 ans les taux sont majoritairement  $\geq$  à 10% (15/19) et à un âge supérieur à 60 ans les taux sont proches de 20% et plus (10/12). Les individus d'un âge inférieur à 40 ans présentent des pourcentages de mutation  $\leq$  à 10% à l'exception de quelques individus (5/23). Entre 40 et 50 ans les taux de mutants peuvent varier de 7 à 15%.

Nous notons des niveaux élevés de l'hétéroplasmie A189G dans le tissu musculaire comparé aux échantillons buccaux. En effet, pour les individus de 60 ans et plus, le pourcentage de molécules mutantes est proche de 20% ou supérieur, pour 10 individus sur 12 (contre 12,6 % pour les cellules buccales). Par contre, dans un âge inférieur à 40 ans, les pourcentages de mutation sont faibles,  $\leq$  à 10%, dans 18 individus pour les 23 analysés.

Bien sûr, la méthode PNA/qPCR a aussi détecté les polymorphismes 189G identifiés dans les 6 échantillons buccaux par séquençage (annexe 2 ; tableau 11). Comme attendu, dans les cas de polymorphisme 189G, les valeurs de Ct G/A étaient similaires aux valeurs de Ct G/A du contrôle 100% M ( $\geq$  1,6).

Dix-neuf échantillons osseux modernes ont pu être analysés par la méthode avec les deux sondes PNA. Seulement 3 individus sont identifiés avec un taux de mutant supérieur à 10%, les autres individus, dans des âges compris entre 23 et 51 ans, sont reconnus dans des taux de mutant entre 0 et 8%, mais l'ensemble étant très dissemblable dû au nombre faible d'échantillons, une relation avec l'âge ne peut être mis en évidence avec ces résultats.

Mais nous pouvons noter les résultats pour les deux femmes âgées de 71 ans et de 105 ans, les pourcentages sont de 15,9% et 11,5% respectivement et pour une femme âgée de 71 ans de 29%.

Les échantillons osseux anciens n'ont pas été analysés par la méthode de PNA/qPCR, car les volumes et les concentrations initiales sont trop faibles pour cette technique. C'est-à-dire, la technique qPCR est très sensible et peut faire des enregistrements d'amplification dans des concentrations faibles, mais au niveau des volumes (40  $\mu$ l) plus aucune autre technique ne pourra être appliquée. Nous avons donc fait le choix de conserver ces échantillons pour les techniques de séquençage automatique et de Southern blot où les volumes requis sont peu important (1 à 2  $\mu$ l pour chaque expérience).

La variation inter-test entre toutes les expérimentations sur les échantillons a été évaluée sur les contrôles WT et M. La précision inter-test calculée en pourcentage est comprise entre 1,75 et 3% pour les amplifications sans sonde, entre 5 et 8% avec la sonde PNA G et entre 2,5 et 6,7% avec la sonde PNA A.

## **6.2. Les mutations T408A et T414G**

Nous vous rappelons que pour les mutations 408 et 414, une seule sonde a été synthétisée pour la forme WT (PNA 408T et PNA 414T).

Les analyses menées sur les positions 408 et 414 par la technique PNA/qPCR mettent en évidence un premier point. La différence entre l'amplification sans sonde et avec la sonde PNA ( $\Delta Ct$ ) est beaucoup plus importante pour ces deux positions, de l'ordre de 20 cycles par rapport à la position 189 (de 10 cycles).

Cette différence de blocage de l'amplification PCR peut s'expliquer par la séquence de chaque sonde. En effet, il est conseillé par le fabricant (Eurogentec) de limiter la contenance en purines (les bases Adénine et Guanine) à un taux inférieur à 60%. Pour les sondes PNA 408 et 414, synthétisées sur 15 bases, la contenance en purines est de 40% et 46% respectivement, par contre les sondes PNA 189 contiennent plus de 53% de purines, entraînant un blocage moins efficace dans le nombre de cycles de l'amplification PCR. Ce blocage plus important pour les sondes PNA 408 et 414 nécessite, lors des amplifications en qPCR, un nombre de cycles total de 45 pour permettre l'analyse de l'amplification avec les sondes.

Comme expliqué dans le paragraphe Méthode (2.7), aucun échantillon ne présente un polymorphisme de base A à la position 408 et de base G à la position 414 pour jouer son rôle de contrôle M. Nous ne pouvons donc pas construire une échelle de mutants pour ces 2 positions comme pour la position 189. Mais nous pouvons penser que le blocage de l'amplification suit le même schéma malgré des  $\Delta Ct$  beaucoup plus grands. Ainsi si l'on se réfère à la figure 50, qui représente le blocage des formes WT avec la sonde WT sur la position 189, la plus grande variation de cycles entre l'amplification sans PNA et avec PNA se situe dans les taux de mutants  $<$  à 20%. Il est donc possible d'évaluer des taux de mutants  $<$  à 20% par des grandes différences de  $\Delta Ct$ , ceci par rapport au contrôle WT et par rapport au Ct sans sonde de l'échantillon même.

En ce qui concerne la position 408, 49 échantillons musculaires (d'âge inclus entre 19 et 97 ans) sont soumis à l'amplification par PCR en Temps Réel sans et avec la sonde PNA 408. Trois individus de 54 à 64 ans sont enregistrés avec un  $\Delta Ct$  de 11 à 12 cycles par rapport au  $\Delta Ct$  de référence de 20 cycles, permettant une estimation vraisemblable d'environ 10% de mutants 408A.

Aucunes différences ne sont enregistrées dans l'amplification des ADNmt provenant des échantillons de cellules buccales ou d'os modernes par rapport au contrôle de référence.

Sur l'ensemble des échantillons musculaires (62) d'individus d'un âge inclus entre 14 et 97 ans analysés par PNA/qPCR sur la position 414, seulement 3 échantillons ont des  $\Delta Ct$  de l'ordre de 15 cycles par rapport à la majorité de 20-22 cycles. Ce sont des individus d'âge de 52 et 54 ans, nous pouvons donc suspecter la présence de la mutation 414G, mais dans des taux faibles,  $\leq$  à 10% ou 5% au vu de la variation des cycles.

De même, les échantillons buccaux (22) ont été analysés sur la position 414, on note un  $\Delta Ct$  de 15 pour 3 individus de 60, 80 et 85 ans, nous questionnant sur la présence de la mutation 414G.

Au niveau des échantillons osseux modernes, aucuns ne révèlent de différence d'amplification avec la sonde PNA 414.

## **7. Le Southern Blot**

Tous les échantillons buccaux, musculaires et osseux présentant une séquence de Cambridge dans les régions d'hybridation des sondes et permettant ainsi un appariement spécifique ont été analysés par la méthode de Southern blot pour la position 189.

### **7.1. La limite de détection de la technique**

Nous avons évalué la limite de détection de cette technique dans des temps d'exposition inclus entre 3 et 30 minutes.

Les ratios de variants G préparés à partir des contrôles WT et M sont préparés dans des quantités d'ADN initiales de 100ng et 50 ng pour des taux de 5, 10, 15 et 20% dans le but d'évaluer la limite de détection dans des temps courts et aussi la capacité de quantification par le logiciel ImageQuant.

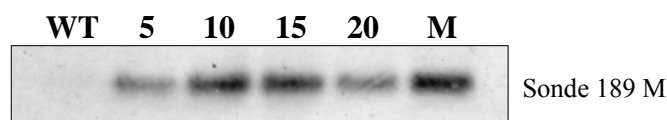


Figure 56a : Détection de la mutation 189G selon le pourcentage de variants G par la sonde digoxigénine M (189G) pour une quantité ADN initiale de 100 ng.

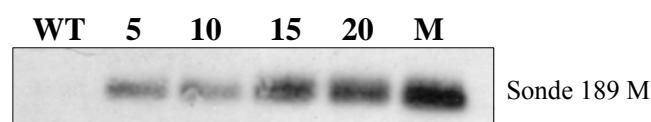


Figure 56b : Détection de la mutation 189G selon le pourcentage de variants G par la sonde digoxigénine M (189G) pour une quantité ADN initiale de 50 ng.

Dans des temps d'exposition relativement courts (3 minutes) nous constatons que la technique de marquage avec une sonde digoxigénine permet une détection du taux de mutants à 5% dans les deux concentrations.

Si l'on augmente le temps d'exposition au-delà de 30 minutes, le marquage global augmente mais n'est plus proportionnel à la quantité de molécules, puisque le marquage du contrôle M n'augmente pas proportionnellement par rapport aux taux de mutant plus faibles. Au niveau de la concentration ADN initiale, nous sommes dans des valeurs qui rentrent dans la gamme de concentration pour un marquage linéaire (Roche Applied).

De plus, si nous évaluons la quantification de variants G par rapport au contrôle M à l'aide du logiciel ImageQuant, dans la figure 56a, les taux de 10 et 15% de variants G ne peuvent être différenciés, et dans la figure 56b, les taux de 5 et 10% et de 15 et 20% sont évalués dans les mêmes valeurs. Cette proportion de marquage entre les points cités sont conservés dans des temps d'exposition de 30 minutes.

Ceci indique que la quantification faite par le logiciel ImageQuant pourra être imputée d'une erreur de  $\pm 5\%$ . Les concentrations ADN initial des échantillons seront au maximum de 50 ng/ $\mu$ l avant l'amplification par PCR.

Pour rester dans des proportions linéaires, les dilutions anti-corps sont passées de 1/2500 à 1/5000 ou 1/10 000 suivant la concentration ADN initial (notamment pour les échantillons osseux anciens, la quantité ADN étant faible, la dilution anti-corps est conservée à 1/5000).

Cependant, il faut aussi noter que suivant le lot de substrat CSPD, le marquage est efficace et sensible mais sera variable selon le lot.

Ces nouvelles conditions : 50 ng/μl d'ADN initial, des temps d'exposition < à 30 minutes et les dilutions anti-corps sont appliquées aux échantillons.

## 7.2. La détection dans le tissu musculaire

Comme vu dans la figure 57, la détection de la forme 189G dans le tissu musculaire est importante pour les individus âgés de plus de 60 ans, et cela après un temps d'exposition relativement court, cette expérience étant réalisée 3 fois avec des temps d'exposition inclus entre 5 à 30 minutes.

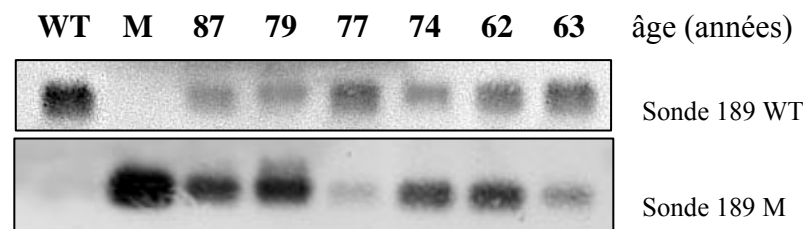


Figure 57 : Détection des deux formes A et G en position 189 sur des échantillons musculaires d'individus âgés de plus de 60 ans.

*Les deux premières lignes correspondent aux contrôles WT et M qui ont été détectés par leurs sondes complémentaires. Les échantillons ont été spécifiés par leurs âges.*

La sonde M (189G) a révélé nettement les variants 189G sur le tissu musculaire des individus d'un âge supérieur à 60 ans.

La quantification relative de l'ADN marqué par le logiciel ImageQuant est réalisée et le pourcentage de mutants est calculé par rapport au contrôle M. Les pourcentages de mutation sont proches ou supérieurs à 20% (10/12) sur l'ensemble des individus criblés sauf pour un individu de 77 ans qui était détecté à un taux faible  $\leq$  à 5%.

En ce qui concerne les individus de moins de 60 ans (figure 58), où le pourcentage de variants G est plus bas, la détection est plus faible mais présente jusqu'à l'âge de 40 ans, cette expérience étant réalisée 3 fois .



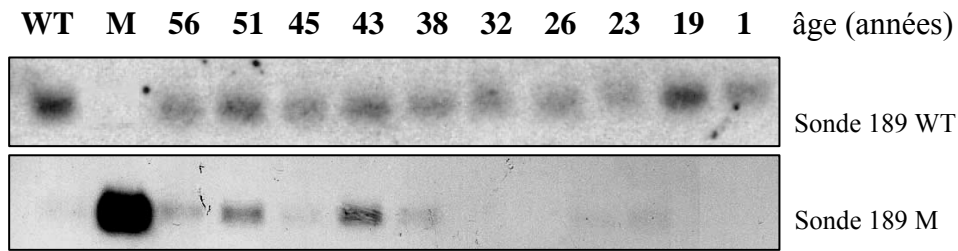


Figure 58 : Détection des deux formes A et G en position 189 sur des échantillons musculaires d'individus âgés de moins de 60 ans.

La sonde M a permis la détection de taux de mutants 189G  $\geq$  à 10%. L'ensemble des individus d'un âge supérieur à 50 ans présente majoritairement (5/7) des pourcentages de mutants  $\geq$  à 10 %. Dans un âge inférieur à 40 ans les pourcentages de mutation sont  $\leq$  à 10% (18/23) et étaient faiblement ou pas détectés par la méthode de Southern blot.

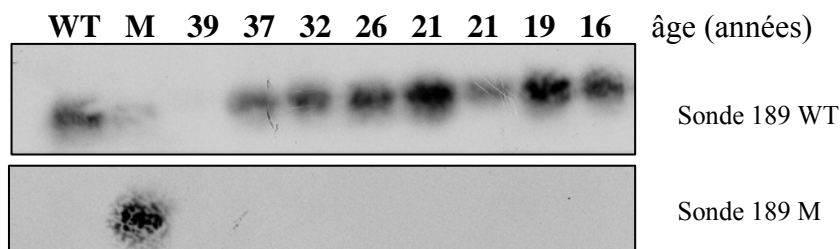


Figure 59 : Détection des deux formes A et G en position 189 sur des échantillons musculaires d'individus âgés de moins de 40 ans.

*L'ADN de l'individu de 39 ans était en quantité trop faible pour permettre un marquage par les sondes.*

Cette expérience confirme que L'ADNmt des individus d'un âge inférieur à 40 ans (à quelques exceptions près) sont marqués très faiblement ou ne présentent pas de marquage, même en augmentant le temps d'exposition jusqu'à la limite d'apparition du contrôle WT.

Sur les 50 échantillons musculaires analysés par la technique de Southern blot, la détection de la forme 189G est démontrée dans 27 individus jusqu'à des taux proches de 10% et peut être quantifiée par ImageQuant.

Dans l'évaluation par Southern blot de la mutation 189G dans le tissu musculaire d'individus de plus de 50 ans, nous avons réalisé une expérience incluant les deux types de sondes et dans des temps d'exposition de 1 heure dans le but de "visualiser" les différences entre les individus de moins de 60 ans et de plus de 60 ans.

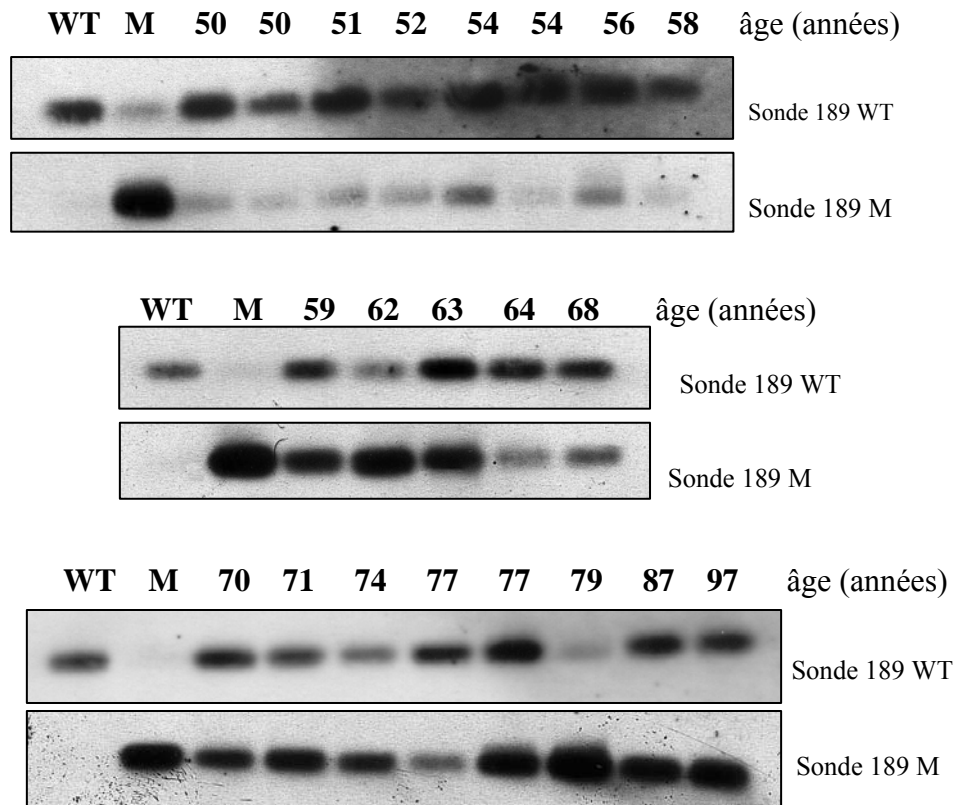


Figure 60 : Détection des deux formes A et G en position 189 sur des échantillons musculaires d'individus âgés de plus de 50 ans.

Dans un temps d'exposition plus long, on peut discerner nettement la différence d'accumulation de la mutation 189G, qui est faiblement présente dans l'ADNmt des individus de moins de 60 ans et est nettement détectée dans les individus de plus de 60 ans. Ces manipulations (l'ensemble des 6 membranes) ont été faites dans les mêmes temps et ont subi exactement les mêmes conditions d'expérimentations. Mais ce temps d'exposition long ne permet pas une quantification par le logiciel ImageQuant car le marquage n'est pas proportionnel à la quantité de molécules, ceci est très visible pour les 4 individus de plus de 77 ans où le marquage est aussi important que le contrôle M.

### **7.3. La détection dans les cellules buccales**

La détection des molécules mutantes par la sonde M marquée avec une molécule de digoxigénine est faible ou inexistante dans les cellules buccales et ne permettent pas une discrimination entre les échantillons (figure 61) et ceci en réalisant 2 fois l'expérience. En effet, quand nous voulons évaluer ce marquage par ImageQuant, les valeurs de pourcentage de variants G ne peuvent pas être estimées.

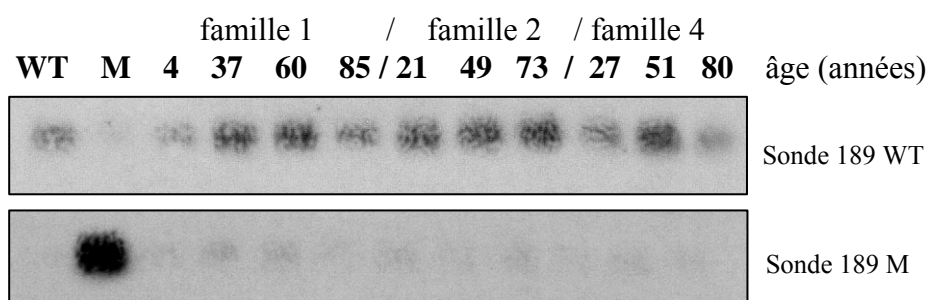


Figure 61 : Détection des formes A et G en position 189 sur des échantillons buccaux d'individus appartenant à la même lignée maternelle dans trois familles différentes.

La sonde M (189G) ne révèle pas les formes 189G dans les échantillons buccaux même dans les limites des temps d'exposition (jusqu'à la détection du contrôle WT). Les pourcentages de mutants sont faibles ( $\leq$  à 10%) dans ce type tissulaire. Nous sommes dans la limite de détection de la technique de Southern blot.

### **7.4. L'évaluation de la variabilité tissulaire**

Nous avons pu obtenir à partir de deux individus décédés de 63 et 70 ans les prélèvements tissulaires de cellules buccales et de tissu musculaire. Comme montré dans la figure 62, l'hétéroplasmie 189G est détectée dans le tissu musculaire de chacun (d'un pourcentage de 12% et 22% respectivement) et, est finalement faiblement apparente dans les cellules buccales ( $\leq$  5%). Cette expérience a été réalisée 2 fois.

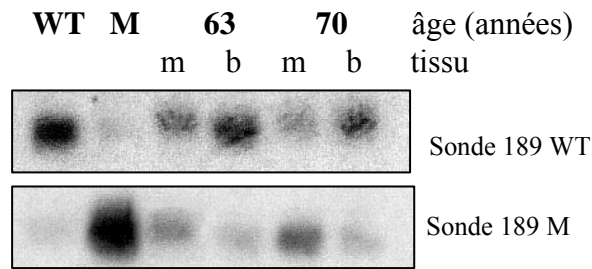


Figure 62: Détection des deux formes A et G sur la position 189 sur un double échantillonnage musculaire et buccal provenant de deux individus. *m* : *tissu musculaire* ; *b* : *cellules buccales*.

La sonde M permet la détection des formes 189G dans le tissu musculaire des deux individus. La variabilité tissulaire entre le tissu musculaire et les cellules buccales de l'hétéroplasmie 189G dans ces deux individus est démontrée. Celle-ci était aussi analysée par la méthode PNA/qPCR.

### 7.5. La détection dans le tissu osseux

Dans le tissu osseux, sur les échantillons modernes: Sur les 26 échantillons initiaux, nous n'avons jamais obtenu d'ADN pour un échantillon, et cinq autres étaient identifiés avec un polymorphisme dans la région d'hybridation des sondes digoxigénine.

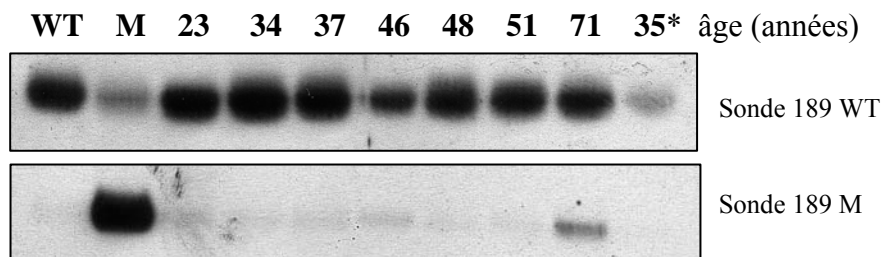


Figure 63: Détection des deux formes A et G en position 189 sur un échantillon osseux moderne d'un homme âgé de 71 ans.

Dans une première expérience, nous avons un seul individu âgé de plus de 60 ans, et nous pouvons observer que celui-ci présente un marquage pour la position 189G, et que le marquage est absent pour les autres individus de 23 à 51 ans.

Le marquage de la sonde M a été quantifié par le logiciel ImageQuant à 22 % de mutants pour l'individu de 71 ans.

Au sujet de l'individu de 35 ans, marqué d'un astérisque, celui-ci présente deux polymorphismes aux positions 195 et 198, et qui sont des bases incluses dans les extrémités des sondes digoxigénine. L'hybridation ne peut avoir lieu entre les sondes et la séquence ADNmt de l'échantillon, le marquage visualisé pour la sonde WT étant plus faible que le marquage du contrôle M, ce qui démontre qu'il n'est pas spécifique, le temps d'exposition étant très court, seulement de 3 minutes.

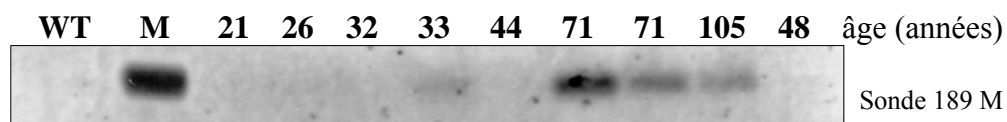


Figure 64: Détection des deux formes A et G en position 189 sur des échantillons osseux modernes d'individus âgés de plus de 70 ans.

Par la suite nous avons obtenu d'autres échantillons osseux, incluant deux individus supplémentaires de 71 et 105 ans. La détection de la mutation 189G est visible sur les 3 individus âgés de plus de 70 ans et absent chez les moins de 44 ans.

L'évaluation du marquage de la sonde 189 M par le logiciel ImageQuant donne des pourcentages de mutants de 25% sur l'échantillon le plus marqué de 71 ans, cet échantillon étant celui analysé dans la figure 63. Pour le deuxième individu de 71 ans, le marquage est quantifié à 13,1% et pour l'échantillon provenant d'une femme de 105 ans, le taux est de 12,5%.

Dans le tissu osseux, sur les échantillons anciens: Sur les 4 échantillons initiaux, 3 ont pu être testés par la technique de Southern blot, les 2 individus âgés Y32 et Y20, et l'individu adulte Y31.

Dans une première expérience:

Après une amplification PCR du segment cible de 160 pb avec 35 cycles et un dépôt de 10 µl de produits PCR pour chaque puits.

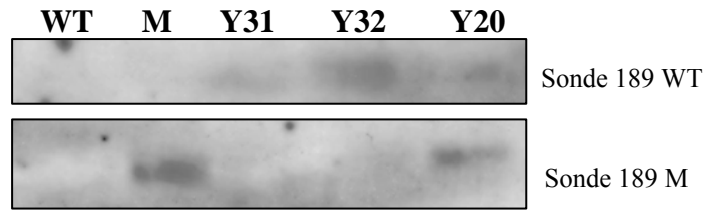


Figure 65: Détection de la forme G sur la position 189 dans un échantillon osseux ancien d'une femme âgée.

Nous constatons rapidement que dans cette première expérimentation, la quantité ADN déposée est trop faible et ne permet pas d'obtenir des résultats corrects. Au niveau des deux contrôles, afin d'avoir la même quantité d'ADN déposée, dans le but d'une quantification à venir par ImageQuant, une dilution au 1/100 a été faite. Ces contrôles ne présentent pas habituellement des problèmes de marquage et donc confirment que c'est bien la quantité ADN trop faible qui est incriminée. On peut néanmoins visualiser un marquage de la sonde M sur le contrôle M et l'échantillon osseux Y20. On distingue très superficiellement le marquage de la sonde WT sur les 3 échantillons.

Pour la deuxième expérience: Après une amplification PCR du segment cible de 160 pb avec 40 cycles et un dépôt de 24 µl de produits PCR dans chaque puits pour chaque échantillon, alors que nous avons toujours déposé 10 µl de produits PCR pour les deux contrôles mais sans faire aucune dilution préalable.

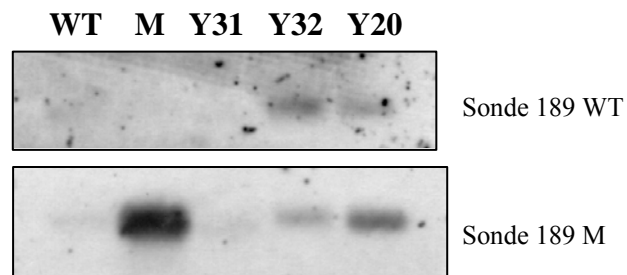


Figure 66: Détection des formes A et G sur la position 189 dans deux échantillons osseux anciens de deux femmes âgées.

Nous observons le marquage par la sonde M de l'ADN des deux échantillons osseux provenant des deux femmes âgées alors qu'il est absent sur l'individu adulte.

Le marquage de la sonde M est évalué par ImageQuant à 9,2% pour l'échantillon Y32 et à 24% pour l'échantillon Y20.

Au sujet de la sonde WT, le marquage du contrôle WT et de l'échantillon Y31 est absent. Cette absence de marquage n'est pas due à un problème d'ADN, car l'image enregistrée initialement à partir du gel sous lumière UV démontre que la quantité d'ADN est correcte et même supérieure aux deux autres échantillons. Malheureusement, lors de cette expérience, le four d'hybridation est tombé en panne dans la nuit, et la membrane est restée en partie dans le tampon à une température de 45°C. La partie immergée a été lavée de l'ADN fixé, ceci est visible par une différence de coloration sur l'image (figure 66). Mais nous pouvons constater que l'individu Y32 présente un marquage plus fort pour la sonde WT par rapport à la sonde M, et inversement pour l'individu Y20. Le marquage est donc proportionnel entre les 2 sondes.

Cette expérience complémentaire a été réalisée suite à l'hybridation incomplète de la sonde 189WT de la figure 66. La figure 66bis montre que la sonde WT s'hybride sur tous les échantillons osseux des sujets anciens. L'hybridation de la sonde M est bien spécifique de la position 189G sur la figure 66, le sujet Y31 ne présentant pas de marquage avec cette sonde M, il est détecté par la sonde WT sur cette position (figure 66bis).

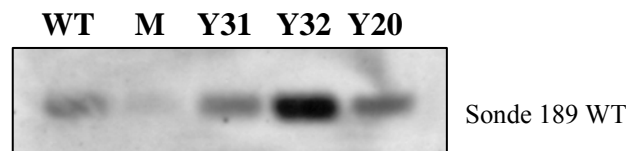


Figure 66 bis: Détection de la forme A sur la position 189 dans les trois échantillons osseux anciens.

L'intensité du marquage du sujet Y32 est le résultat d'une bonne quantité et qualité d'ADN encore disponible pour cet échantillon, les deux autres échantillons présentaient une quantité ADN initiale faible suite à la réalisation des expériences précédentes (incluant deux séquençages et des tests d'amplification et de marquage pour la technique de Southern). La quantité ADN pour le contrôle WT étant elle aussi faible lors de cette expérience.

## **8. L'analyse statistique**

Afin d'évaluer si les différences de taux de mutant entre les individus âgés de moins de 60 ans et ceux de plus de 60 ans sont significatives un test de student est réalisé (logiciel R), sur le

tissu musculaire, à partir des valeurs calculées par la méthode PNA/qPCR sur les 50 échantillons de 1 à 97 ans de la figure 55.

L'âge minimum étant de 1 an et maximum de 97 ans, l'âge moyen de 44, 59 ans. La valeur de  $t = -6,9019$  et la valeur de  $p = 9,414 \text{ e-}09$ .

### **9. La comparaison des résultats obtenus pour les trois techniques**

Au final, la comparaison des trois techniques de la détection de l'hétéroplasmie A189G nous permet d'évaluer la fiabilité de chacune et d'estimer la technique la plus adaptée aux types d'échantillons et aux mutations recherchées.

Tableau 13: Caractérisation de la position 189 entre les trois techniques sur tous les types tissulaires.

		<b>Séquençage automatique</b>		<b>Méthode PNA /qPCR</b>		<b>Southern blot</b>	
Echantillons	n	n	Hétéroplasmie A189G	n	Hétéroplasmie A189G	n	Hétéroplasmie A189G
Tissu musculaire	75	74	11	50	44	50	27
Cellules buccales	39	39	0	23	18	23	0
Os modernes	26	22	0	19	12	16	3
Os anciens	4	3	0	.	.	3	2

La méthode PNA/qPCR a permis la détection des niveaux faibles d'hétéroplasmies A189G dans les trois types tissulaires. Le séquençage automatique de l'ADN n'a pas démontré de niveaux d'hétéroplasmies inférieur à 30%. Dans les cellules buccales, l'hétéroplasmie était globalement inférieure à 10% et n'était pas identifiée par séquençage automatique ou par Southern blot. Dans le tissu musculaire et osseux, la technique de Southern blot a mis en évidence des niveaux d'hétéroplasmies  $\geq 10\%$  et la méthode de PNA/qPCR pourrait déterminer tous les niveaux d'hétéroplasmie. Pour des raisons de volumes et de concentrations finales, l'ADN des échantillons osseux anciens ne peut être analysé par cette dernière méthode.



DISCUSSION,  
CONCLUSION ET PERSPECTIVES

### **CHAPITRE 3: DISCUSSION**

Des sciences biologiques aux sciences humaines, l'étude du vieillissement est devenue un axe de recherche majeur. Cependant son évaluation peut varier suivant que l'on considère par exemple, l'âge civil d'un sujet, son âge osseux ou les agressions de son ADN par les facteurs environnementaux.

Au sein d'une identification en Médecine Légale ou de l'étude de sujets en Anthropologie, la détermination de l'âge au décès des individus matures (d'un âge supérieur à 30 ans) à partir des restes squelettiques n'est pas actuellement résolue par les méthodes ostéologiques. En effet, aucun indicateur de vieillissement (phénomène dégénératif par exemple) n'est corrélé à l'âge de façon satisfaisante. Les indicateurs disponibles tel que l'aspect morphologique de la symphyse pubienne (Brooks et Suchey 1990), l'étude de la jonction sacro-iliaque (Lovejoy 1985) ou de l'extrémité sternale de la quatrième côte (Iskan et Loth 1986a ; 1986b) sont faiblement liés à l'âge et la reconnaissance de sujets d'un âge supérieur à 60 ans est d'une fiabilité inférieure à 80%. Entre 30 et 60 ans, l'estimation de l'âge est aléatoire et les sujets qui sont inclus dans cette classe d'âge peuvent aussi comprendre des sujets plus jeunes (de 20 à 30 ans) et 20% des sujets de plus de 60 ans (Crubézy *et al.* 2002 pp 35-36).

Cette détermination est pourtant une problématique d'importance qui intéresse aussi bien la Médecine Légale que l'étude des populations du passé. Ainsi, lors d'une demande d'identification par la justice, l'une des questions majeures de ces demandes d'identification concerne l'âge. Dans le même temps, en anthropobiologie, dans le cadre de l'étude des populations du passé, la détermination de l'âge reste l'une des grandes questions non résolues.

Au sein de ce questionnement général, il a pu être montré ces dernières années que des mutations ponctuelles de l'ADNmt s'accumulent avec l'âge dans plusieurs tissus lors du vieillissement naturel des sujets. Ces études découlent des travaux de Harman (1972) démontrant l'implication des radicaux libres, générés lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire dans les mitochondries, sur l'initiation des lésions cellulaires et le processus de vieillissement. La théorie du "stress oxydatif" pose donc l'idée principale que le vieillissement est causé par l'accumulation de dommages oxydants sur diverses molécules biologiques dans la cellule à partir des radicaux libres. Notamment, les études sur le génome mitochondrial ont démontré la présence de nombreuses lésions sur les bases et les sucres, des cassures simple brin et double brin, des sites abasiques menant à des délétions ou mutations de transversion/transition sur l'ADNmt (Cadet *et al.* 1999 ; Chatgialloglu et O'Neill 2001 ;

Shibutani *et al.* 1991 ; Corral-Debrinski *et al.* 1992 ; Liu *et al.* 1997 ; 1998). Ainsi, l'accumulation des mutations de l'ADNmt durant la vie serait une cause majeure du vieillissement humain et des maladies dégénératives, de part le taux élevé de mutations de l'ADNmt, la petite taille du génome mitochondrial, la perte des mécanismes de réparation pour l'ADNmt, les caractères de ségrégation somatique des génomes mitochondriaux pendant la division cellulaire eucaryote et les lésions génétiques sous-jacentes trouvées dans des maladies mitochondriales humaines (Linnane *et al.* 1989).

Suivant cet axe de recherche moléculaire sur l'ADN mitochondrial, les dernières études démontrent l'accumulation avec l'âge de mutations au sein de différents types tissulaires (Jazin *et al.* 1996 ; Calloway *et al.* 2000 ; Michikawa *et al.* 1999 ; Murdock *et al.* 2000 ; Wang *et al.* 2001 ; Del Bo *et al.* 2002 ; 2003 ; Zhang *et al.* 2003 ; Cormio *et al.* 2005).

Dans ce contexte, la question essentielle que nous nous posons est la suivante :

Dans le cadre précis d'identification en Médecine Légale ou d'études anthropologiques, est ce que ces mutations mitochondriales liées à l'âge pourraient améliorer la performance des indicateurs ostéologiques dans une estimation de l'âge au décès ?

L'analyse de l'ADN mitochondrial, et notamment des séquences hypervariables de la région de contrôle, est très largement utilisée dans les études génétiques des populations afin d'évaluer l'histoire et les modèles de migrations, l'évolution humaine mais aussi en Médecine Légale dans les cas d'identification individuelle.

L'application de ces études génétiques est possible du fait des caractères spécifiques de l'ADNmt. En effet, de part sa transmission uniquement maternelle, l'ADNmt présent dans chacun de nous est hérité à de sa mère (Manfredi *et al.* 1997). Cet héritage maternel permet d'établir les relations de parenté entre une mère et ses enfants, entre des sujets ayant une grand-mère commune (entre cousins ou entre oncle et neveux par exemple). De plus, le taux de mutation de l'ADNmt est beaucoup plus élevé que pour l'ADN nucléaire, du fait de l'absence de molécules protectrices comme les histones, de la localisation de la molécule ADNmt à proximité de la membrane interne où la génération de radicaux libres lors du fonctionnement respiratoire de la chaîne de phosphorylation oxydative est importante, de mécanismes de réparation insuffisants. Ces caractères physiques sont probablement les causes d'une accumulation de polymorphismes importante notamment dans la région non codante de l'ADNmt (Lightowers *et al.* 1997 ; Wallace *et al.* 1997 ; Howell *et al.* 1996). Cette variabilité

de polymorphismes transmise au sein de l'ADNmt permet d'analyser les lignées maternelles dans les cas d'études de population et d'étudier ainsi les mouvements migratoires.

Les mitochondries étant réparties dans le cytoplasme cellulaire, elles subissent la ségrégation répllicative lors de la division cellulaire. Si une mutation apparaît au niveau des molécules ADNmt, la distribution aléatoire des génomes mitochondriaux lors de la division dans les cellules filles crée un mélange intracellulaire de molécules mutées et normales : l'hétéroplasmie. Cette ségrégation répllicative des génomes mitochondriaux peut avoir lieu lors des divisions méiotique ou mitotique. Ainsi, la formation des hétéroplasmies ADNmt au sein d'une cellule peut avoir un caractère transmis quand elle a lieu au cours de l'ovogenèse ou un caractère somatique au cours de la vie d'un individu. Dans les cas de certaines pathologies mitochondriales transmises, les mutations pathogéniques sont présentes sous forme d'hétéroplasmie, l'expression phénotypique de la maladie nécessitant le dépassement d'un seuil du taux d'hétéroplasmies (Hayashi *et al.* 1991 ; Chomyn 1998). Mais, ces dernières années, il a été démontré que des mutations somatiques s'accumulent avec l'âge au cours de la vie des individus dans des tissus post-mitotiques, entraînant le déclin de la fonction mitochondriale et menant aux maladies dégénératives et à la sénescence (Wallace 1995 ; Wallace 2005).

Les points principaux dans l'étude des mutations ponctuelles liées au vieillissement sont : leur caractère somatique. Elles sont donc présentes seulement dans les individus âgés sous forme d'hétéroplasmie avec des pourcentages qui diffèrent avec l'âge, les taux de mutations étant plus élevés dans la région de contrôle de l'ADNmt. Elles s'accumulent dans les tissus post-mitotiques, sur les mêmes positions identifiées dans les polymorphismes. Dans le vieillissement normal, ces mutations sont difficiles à détecter car elles sont rares et hétérogènes, la proportion de mutants ADNmt étant faible, la détection des hétéroplasmies nécessite des techniques sensibles et fiables.

Dans le cadre du vieillissement humain, ces mutations ponctuelles ont été étudiées essentiellement dans les tissus tels que le cerveau (Jazin *et al.* 1996), le tissu musculaire (Calloway *et al.* 2000 ; Murdock *et al.* 2000 ; Wang *et al.* 2001 ; Del Bo *et al.* 2002 ; 2003 ; Cormio *et al.* 2005), les fibroblastes de peau (Michikawa *et al.* 1999 ; Zhang *et al.* 2003), les leucocytes (Zhang *et al.* 2003), le tissu cardiaque et les cellules buccales (Nekhaeva *et al.* 2000).

Nous avons donc développé un travail de recherche afin d'analyser la corrélation des événements mutationnels en fonction de l'âge civil. Nous avons choisi d'étudier d'une part les cellules buccales de sujets de même lignée maternelle (prélèvements effectués avec leurs consentements) afin de vérifier le caractère somatique des mutations analysées. En effet, si les hétéroplasmies recherchées sont dépendantes de l'âge, elles seront présentes dans les individus âgés et absentes dans les individus jeunes d'une même lignée maternelle.

D'autre part, nous analysons ces mutations sur des prélèvements musculaires du psoas effectués lors d'autopsies sur des sujets dont l'âge est reconnu secondairement et sans relation de parenté. Le tissu musculaire étant très étudié, il nous permet d'obtenir un tissu de référence par rapport aux mutations recherchées, de plus, le nombre d'individus, l'âge et l'absence de parenté nous permettent d'établir la corrélation avec l'âge et de la comparer avec les autres études.

De plus nous avons obtenu sur deux sujets les deux types de prélèvement tissulaire : le muscle et les cellules buccales, afin d'évaluer la variabilité tissulaire de ces mutations au sein d'un individu.

Le troisième tissu étudié est l'os, qui est le tissu accessible en Médecine Légale et en anthropologie, et qui permet donc une étude directe de la présence de ces mutations sur ce tissu cible en fonction de l'âge. Les tissus osseux analysés ont deux provenances : des prélèvements en Médecine Légale, lors d'identification, où l'âge des individus est reconnu secondairement. Ces os ont subi un traitement spécifique pour éliminer toute trace d'autres tissus environnants afin de spécifier la présence de mutations en relation avec l'âge dans le tissu osseux. Des prélèvements osseux ont été effectués lors de fouille en Sibérie Orientale (Yakoutie) sur des squelettes dont la bonne conservation de l'ADNmt est démontrée et où les os sont totalement dépourvus de tissus environnants. L'identification dans une classe d'âge pour ces sujets a été réalisée par l'analyse d'indicateurs ostéologiques (Brooks et Suchey 1990 ; Lovejoy 1985 ; Scheuer et Black 2000).

Les hétéroplasmies étudiées dans ce travail sont : la transition A189G, elle est décrite dans le tissu musculaire de plusieurs études (Calloway *et al.* 2000 ; Wang *et al.* 2001 ; Del Bo *et al.* 2002 ; 2003 ; Cormio *et al.* 2005), et cette mutation présente des taux d'hétéroplasmies compris entre 20 et 50% sur les sujets de plus de 60 ans. L'hétéroplasmie T408A est-elle aussi décrite spécifiquement dans le muscle mais dans des taux beaucoup plus faibles, de l'ordre de 10 à 15%, sur les individus âgés et dans une fréquence plus faible (Wang *et al.* 2001 ; Del Bo *et al.* 2002 ; 2003). La transversion T414G a été décrite essentiellement dans les fibroblastes de peau d'individus d'un âge supérieur à 60 ans (Michikawa *et al.* 1999 ; Zhang *et al.* 2003)

et une seule étude démontre sa présence dans le tissu musculaire d'individus âgés (Murdock *et al.* 2000). Ces trois mutations sous forme d'hétéroplasmie sont analysées dans les trois types tissulaires selon trois techniques différentes, le séquençage automatique, le Southern blot et la technique combinant les sondes PNA (Peptid Nucleic Acid) et la PCR en Temps Réel, afin d'estimer la sensibilité, la reproductibilité et la quantification de ces méthodes sur des taux de mutations plus ou moins faibles. Nous ne perdons pas de vue la description d'autres hétéroplasmies en relation avec l'âge dans le tissu musculaire et les leucocytes telles que les mutations T72C, A73G et C150T (Calloway *et al.* 2000 ; Zhang *et al.* 2003) qui peuvent être identifiées lors du séquençage automatique.

## Les résultats

### *Les digestions enzymatiques*

Dans un premier temps de travail, des digestions enzymatiques ont été réalisées pour les positions 189 et 408 selon la technique de travail publiée par Del Bo *et al.* (2002). La technique a été faite sur les échantillons disponibles au début de ce travail, mais les résultats sont peu probants, malgré la répétition de quelques expériences, les molécules mutantes n'ont pas été détectées de façon visible par ces techniques. Le protocole est suivi à l'identique aux travaux de Del Bo *et al.* (2002), pourtant, à partir de la dizaine d'échantillons évalués pour la position 189, les fragments digérés (donc avec la mutation cible) ne peuvent être visualisés. Il est possible que le temps d'incubation avec l'enzyme de restriction soit trop long (1h30) menant à la digestion du fragment par une activité enzymatique non spécifique.

### *Les polymorphismes autour de la position 189*

Les échantillons présentant des polymorphismes sur la région d'hybridation des sondes doivent être déterminés avant toute analyse par les techniques utilisant des sondes spécifiques. En effet, la présence de ces polymorphismes sur la région d'hybridation génère des amplifications avec les sondes PNA avec des variations de Ct largement supérieures à la valeur acceptable (0,5) entre les triplicats évalués sur une même expérience. Par conséquent, les valeurs de Ct mesurées ne seront pas statistiquement exploitables pour ces échantillons.

En ce qui concerne les échantillons présentant des polymorphismes dans la région centrale des sondes PNA (par exemple pour les positions 188 et 185 ; tableau 11), les changements d'amplification avec et sans sondes sont caractéristiques. En effet quelle que soit la sonde

PNA, un mésappariement a lieu systématiquement à cause du polymorphisme central, entraînant une perte de température d'hybridation élevée des sondes PNA. L'amplification varie très peu ( $\leq 1$  Ct) avec les sondes PNA par rapport à l'amplification sans sonde.

Par contre, sur les échantillons avec un polymorphisme dans les extrémités des sondes PNA, le comportement d'hybridation de la sonde ou des amorces est variable à la température d'hybridation normalement déterminée pour les amorces (effet de compétition). Cela se traduit par des grandes variations de Ct lors des cycles de PCR en Temps Réel.

A noter que deux échantillons analysés avec des polymorphismes en position 195 présentaient aussi une hétéroplasmie en position 189 analysable par séquençage, donc dans des taux supérieurs à 30%, et âgés de 77 et 68 ans respectivement. Si nous voulions analyser de façon plus résolutive ou sensible ces échantillons et ceux non détectés par la méthode de séquençage, il nous faudrait synthétiser des sondes PNA dont la séquence correspondrait aux séquences des polymorphismes les plus répandus. Pour l'ensemble de nos échantillons (les trois types tissulaires inclus) les polymorphismes les plus répandus sont les positions 195 et 188/185.

Ces polymorphismes autour de la position 189 ont aussi des incidences sur les sondes digoxigénine. Ces sondes ont été synthétisées sur un nombre plus important de bases que les sondes PNA (19 bases *versus* 15 bases), incluant les positions de 180 à 198. Un échantillon osseux moderne caractérisé par deux polymorphismes en 195 et en 198, et donc situés sur l'extrémité des sondes, ne peut être analysé car aucune des deux types de sondes ne peuvent s'hybrider. Ainsi, 3 autres échantillons osseux modernes polymorphes sur cette région, dans des âges d'intérêt pour notre étude (entre 62 et 81 ans), ne peuvent pas être analysés avec les sondes actuellement disponibles.

L'ensemble de ces constatations démontre qu'il est nécessaire de connaître la séquence des échantillons sur les régions cibles afin d'appliquer les sondes complémentaires correspondantes et d'obtenir une analyse spécifique des mutations cibles.

#### *Valeur des polymorphismes par rapport au vieillissement*

Les polymorphismes cités ici le sont d'abord pour les raisons techniques discutées dans le paragraphe précédent. Ces polymorphismes sont des changements de base sur des positions données par rapport à la séquence de référence de Cambridge (Anderson *et al.* 1981). Au niveau individuel, ce sont des polymorphismes ADNmt transmis maternellement qui permettent de caractériser un individu pour sa relation de parenté maternelle ou pour définir un haplotype dans le cadre d'une étude de population. Les polymorphismes dans la région

185-198 sont nombreux, il s'agit d'une portion de l'ADNmt très variable, proche de l'origine primaire de synthèse du brin H. Comme démontré dans les travaux de Zhang *et al.* (2003), cette région présente aussi plusieurs points mutationnels dans le cadre du vieillissement dans plusieurs tissus. Actuellement, il n'est pas décrit ou discuté que ces polymorphismes puissent jouer un rôle ou influencer l'apparition ou l'accumulation d'hétéroplasmies liées à l'âge sur des positions adjacentes. Dans ce travail, nous pouvons constater sur deux sujets âgés de 68 et 77 ans, présentant un polymorphisme sur la position 195 (soit à 6 bases de la position 189), la détection positive de l'hétéroplasmie A189G, les taux détectés par séquençage étant évalués à environ 30% de molécules mutées. Pour les individus plus jeunes (moins de 50 ans), la caractérisation de polymorphismes n'a pas démontré une accumulation d'hétéroplasmie sur la position 189. Ces échantillons n'ayant pu être évalués que par la technique de séquençage automatique, limitant la détection à un niveau supérieur à 30%. Les deux individus jeunes (de 30 et 38 ans) présentant une hétéroplasmie en position 185 ou 189, ne sont pas polymorphes sur les positions adjacentes.

Dans le cas du polymorphisme 189G, cette position n'est pas analysable dans le cadre du vieillissement puisque nous recherchons le changement de base A→G à cette position, mais il est envisageable que pour ces individus d'autres positions (72, 73, 408 par exemple) puisse être soumis à mutation dans le cadre du vieillissement.

Ces polymorphismes transmis analysés démontrent l'identification individuelle de chaque sujet, et la non contamination entre les tissus des différents sujets. Au vu de ces résultats, ces polymorphismes transmis semblent indépendants des hétéroplasmies somatiques analysées dans le cadre du vieillissement.

### *L'hétéroplasmie A189G*

L'identification de l'hétéroplasmie A189G et la comparaison des méthodes de séquençage automatique et de PNA/qPCR nous permettent de mettre en évidence deux points. En ce qui concerne les niveaux de molécules mutantes 189G d'un taux supérieur à 30%, incluant 9 échantillons musculaires soumis aux deux techniques, le pourcentage de variants G obtenu, soit par la hauteur des pics sur l'électrophorégramme soit par le rapport des Ct G/A en qPCR, était évalué dans les mêmes taux. Cette observation confirme que la méthode d'évaluation est correcte si nous respectons certaines précautions comme les variations minimales entre les mêmes triplicats ( $\leq 0,5$  Ct) et si l'erreur moyenne du calcul du pourcentage de mutants de 1,4% est incluse.



En ce qui concerne les taux plus faibles d'hétéroplasmie, ce travail démontre la meilleure sensibilité de la méthode de PNA/qPCR. En effet, alors que 44 échantillons musculaires sont identifiés sur la position 189 avec les deux bases A et G, seulement 9 sont détectés dans les individus âgés par le séquençage automatique (sur les 50 échantillons analysés par les deux techniques).

Cette différence de sensibilité entre les techniques de séquençage et de PNA/qPCR nous a incité à utiliser une troisième méthode de détection, la technique de Southern blot, pour évaluer et confirmer les hétéroplasmies détectées par la méthode de PNA/qPCR. Le Southern blot est une technique sensible par un marquage à la digoxigénine, et confirme les résultats PNA/qPCR pour la détection dans des taux faibles d'hétéroplasmies jusqu'à 10%. En ce qui concerne les individus d'un âge supérieur à 40 ans, la technique révèle la présence de la forme 189G dans des proportions de 50 à 10 %. De plus, la quantification relative du marquage de la sonde sur les mutants par le logiciel ImageQuant confirme la proportion des taux de mutants analysés par les deux méthodes. Par exemple, les individus de 87 et 74 ans sont évalués à un pourcentage de mutants de 44% et 21% alors que l'individu de 77 ans marqué très faiblement est évalué à 1%, bien en dessous de la limite de détection de cette technique. L'estimation du pourcentage de variants G avec la méthode de PNA/qPCR sur ces mêmes individus donne une estimation de 48% pour celui de 87 ans, de 19,7% pour celui de 74 ans et enfin celui de 77 ans est estimé à 5,3%. Ceci est vrai dans les taux plus faibles où un individu de 43 ans présente un marquage par la sonde M estimé à 15,5% et à 13,2 % par la méthode PNA/qPCR.

Par contre, sur les prélèvements buccaux, la technique de Southern ne révèle pas les taux d'hétéroplasmies très bas détectés par la technique de PNA/qPCR, car les taux de variants G restent très faibles dans les cellules buccales avec un maximum de 12,6%. Comme dans les familles 2 et 4, où les deux sujets les plus âgés de 73 et 80 ans présenteraient un pourcentage de mutants de 12,6% et de 11,5% par estimation avec la méthode PNA/qPCR, ces individus présentent un marquage très faible en technique de Southern blot, estimé aux environs de 1% par le logiciel ImageQuant. Cette différence de détection semble d'une part reposer sur la limite de détection de la technique de Southern blot et d'autre part de l'erreur imputée à l'estimation du pourcentage de mutants par la technique de PNA/qPCR et/ou à la variation de l'expérimentation dans les deux techniques.

Au niveau de l'analyse des tissus osseux modernes, la technique PNA/qPCR enregistre des variations d'amplification dans les 3 individus âgés pouvant être soumis à cette technique et le calcul du pourcentage de mutants est compris entre 11,5 et 29%. Ces taux restent très faibles

et sont conformes au fait que les pics G ne peuvent pas être visibles par la technique de séquençage automatique. Certains échantillons, tel celui de 71 ans présentant une quantification à 29% par PNA/qPCR et un autre de 81 ans avec un polymorphisme ne permettant pas d'autres analyses, présentaient un petit pic G sur cette position, mais que l'on pouvait inclure dans le bruit de fond. La deuxième analyse par séquençage ne peut confirmer ou infirmer cette détection en 189, les profils restant globalement identiques. Ces résultats par PNA sont confirmés par la technique de Southern blot. En effet l'individu de 71 ans sur la première analyse montre un marquage avec la sonde M estimé à 22%, ce même individu analysé une deuxième fois présente le marquage le plus fort évalué à 25%. Ces estimations sont proches du taux calculé par PNA/qPCR de 29%. Ces taux de mutants enregistrés avec les deux techniques sont aussi proches pour les deux autres individus de 71 et 105 ans puisqu'ils sont de 15,9% et de 11,5% par PNA/qPCR et de 13,1% et 12,5% par ImageQuant respectivement. Pour les individus plus jeunes (< à 51 ans) la technique de Southern ne met en évidence aucun marquage de la sonde M, les valeurs enregistrées par PNA/qPCR étant inférieures à 8%. Cette différence entre les deux techniques est identique à celle rencontrée dans le tissu musculaire ou les cellules buccales. Nous pouvons à nouveau l'expliquer sans doute par la limite de détection du Southern blot dans des temps courts.

Si nous comparons sur la même technique de Southern, le taux de mutant 189 G dans le tissu musculaire, il semblerait que, pour une même tranche d'âge supérieure à 70 ans, les taux de mutation évalués sur le tissu osseux sont plus faibles (entre 22 et 12% sur l'os, et globalement  $\geq$  à 20% dans le muscle). Mais le nombre d'échantillons osseux reste très faible et cette première comparaison doit être confirmée ou infirmée en augmentant l'échantillonnage osseux.

Les échantillons osseux anciens n'ont été évalués que par deux techniques, essentiellement de part la nature de ces extraits : des concentrations et des volumes faibles, un ADN fragmenté. Le séquençage automatique a été réalisé sur des fragments courts de 160 pb, et ne met en évidence aucun polymorphisme, du fait d'une région amplifiée très restreinte, les 2 régions polymorphes étant situées dans les positions 146-152 et 185-192 et seulement 3 échantillons sont analysés. La technique de Southern blot démontre que celle-ci peut s'appliquer sur les échantillons osseux anciens. Malgré une concentration ADN initiale faible, l'amplification PCR avec 40 cycles permet d'obtenir une quantité correcte de segments ADN, et le nombre de cycles reste modéré, la formation d'artefact d'hétéroplasmies lors d'amplification PCR étant essentiellement démontrée avec 60 cycles (Grzybowski 2000 ; Budowle *et al.* 2002 ; Grzybowski *et al.* 2003). Ainsi en augmentant le volume de produits de la PCR lors des

dépôts dans les puits nous pouvons obtenir un quantité et une qualité d'ADN permettant l'analyse par cette technique. Ainsi nous démontrons la présence de la mutation A189G dans les deux échantillons osseux identifiés comme âgés par les méthodes ostéologiques et son absence sur l'individu adulte.

L'analyse par PNA/qPCR n'a pu être faite sur les échantillons anciens du fait de la nécessité d'un volume assez grand d'extrait ADN pour l'analyse (5 µl par puits). Techniquement, l'analyse par qPCR reste possible pour ce type d'échantillon, le segment à amplifier doit faire moins de 150 pb, l'enregistrement de l'amplification peut se faire dans des concentrations faibles de 0,1 ng/µl ( $Ct \leq 26$ ) et les conditions d'optimisation des amorces et des sondes restent identiques. Seul le volume total peut être restrictif si nous voulons que les conditions de validité de la technique soient appliquées, des triplicats pour chaque condition de qPCR, ce qui nous mène pour l'analyse de la position 189 à un volume final nécessaire de 45 µl. Généralement, à partir de 2,5 à 5g de poudre d'os, nous obtenons un volume d'extrait ADN de 40 µl.

#### *La corrélation avec l'âge de l'hétéroplasmie A189G*

L'ensemble des prélèvements tissulaires présentait une quantité ADN suffisante pour avoir une bonne amplification en PCR. Les échantillons musculaires amplifiés assez tardivement avec la méthode PNA/qPCR (les cycles d'amplification ( $Ct$ ) sans sonde étaient supérieurs à 30) ont été exclus de l'analyse car ils étaient dans des cycles d'amplifications hors de la phase linéaire du blocage de l'amplification. Ainsi les résultats en PNA/qPCR, sur les échantillons musculaires analysables, démontrent que l'augmentation du taux d'hétéroplasmie A189G n'est pas linéaire mais plutôt de type exponentiel. Le taux de mutation augmente significativement (test de Student) vers les âges avancés de 60 ans et plus, et les pourcentages de molécules mutantes sont compris majoritairement entre 20 et 50%. Seulement deux individus sur douze présentent un taux de mutant 189G inférieur à 20% et notamment un individu de 77 ans dont le pourcentage est proche de 5%. Ces résultats sont confirmés par la technique de Southern blot où la différence de marquage du niveau de mutants est nettement visible entre les individus de 50 ans et ceux de plus de 60 ans. Les mêmes sujets de 64 et 77 ans montrent un marquage plus faible avec la sonde M.

Si nous comparons ces résultats avec ceux publiés pour la même mutation 189 dans le même tissu référent, le muscle, l'accumulation de la mutation A189G montre une phase exponentielle vers les âges avancés qui est commune à l'ensemble des mutations liées au vieillissement (Kadenbach *et al.* 1995 ; Cormio *et al.* 2005). Le taux d'hétéroplasmie A189G

dans les individus âgés reste du même ordre, de 20 à 60 % dans l'étude de Michikawa *et al.* (2001) et de Cormio *et al.* (2005), et de 10 à 50% pour les travaux de Del Bo *et al.* (2002). Par contre l'âge seuil où l'augmentation exponentielle du taux de mutant est visible, semble être pour certains à 50 ans (Michikawa *et al.* 2001 ; Del Bo *et al.* 2002) alors que pour d'autres elle est démontrée après 60 ans, la différence d'accumulation de mutation significative se situant entre les groupes de 45-60 ans et de 63-92 ans (Cormio *et al.* 2005). La variabilité inter-individuelle du taux de mutation entre les sujets de plus de 50 ans semble être plus importante dans ces études (Michikawa *et al.* 2001 ; Del Bo *et al.* 2002), mais le nombre de sujets analysés dans les âges cibles est beaucoup plus important (27 et 40) par rapport à ce travail (19 par PNA/qPCR). De plus les techniques utilisées sont différentes (DGGE et allele-specific extension of primer extension ; digestion enzymatique respectivement) pouvant créer des différences dans l'estimation du pourcentage de molécules mutées surtout dans les taux faibles de mutants ( $\leq 10\%$ ). Ainsi, les pourcentages de mutants évalués par la méthode PNA/qPCR ou par Southern blot sur les sujets de plus de 60 ans dans le tissu musculaire sont dans les ordres d'estimation des études citées précédemment. La variabilité inter-individuelle pourrait être plus importante que celle estimée dans ce travail, nécessitant une augmentation du nombre d'individus analysés afin de l'évaluer plus finement. L'âge seuil proposé diffère de 50 à 60 ans, cette variation d'estimation dans le tissu musculaire est à prendre en compte, et devra être confirmée ou infirmée avec des travaux supplémentaires. Mais l'augmentation exponentielle du taux de mutants dans les âges avancés est très intéressante pour l'évaluation d'une classe d'âge (par exemple  $\geq$  à 60 ans), et pourrait être complétée par l'analyse d'autres mutations.

### *Les autres hétéroplasmies*

La technique de séquençage automatique a permis l'identification d'autres hétéroplasmies sur la région HV2 quand les pics sont supérieurs au bruit de fond. Nous identifions dans deux individus jeunes, de 30 et 38 ans, des hétéroplasmies sur les positions 185 et 189 dans le muscle. Pour ces deux individus, aucun autre tissu n'est accessible et des comparaisons familiales ne peuvent être faites. Ainsi nous ne pouvons que poser des hypothèses sur ces mutations dans ces individus jeunes, notamment pour la position 185 qui n'est pas décrite en relation avec l'âge dans le tissu musculaire. Leurs origines peuvent être héritées ou somatiques. Dans le cas d'une hétéroplasmie transmise maternellement ou dans le cas d'un événement mutationnel précoce lors du développement du zygote avant toute différenciation cellulaire, ces hétéroplasmies devraient être présentes dans tous les types tissulaires de ces

individus. Si nous sommes dans un cas de mutation somatique, l'hétéroplasmie devrait être absente ou faiblement présente dans les autres tissus. La position 189 étant largement reconnue avec l'âge, pour l'individu de 38 ans, nous pouvons être dans le cas d'une hétéroplasmie transmise ou dans un cadre exceptionnel d'accumulation avec l'âge et/ou dans un cas de pathologie musculaire ayant été non identifié lors de l'autopsie.

Par contre, les mutations identifiées en position 72 et 73 sont décrites en relation avec l'âge dans le tissu musculaire (Calloway *et al.* 2000). Ces mutations, présentes pour des individus dans des âges inclus entre 54 et 63 ans, et absentes dans les individus jeunes, nous permettent d'établir que nous sommes bien en présence de mutations somatiques, ces 4 individus âgés présentant aussi l'hétéroplasmie A189G sur le même tissu dans des taux inclus entre 10 et 45% estimés par PNA/qPCR et Southern blot.

Dans l'échantillon osseux moderne représenté par un sujet de 105 ans, l'hétéroplasmie A73G est détectée, étant totalement absente dans les autres échantillons osseux par analyse de séquençage. Il n'y a pas de description de mutations ponctuelles dans le tissu osseux avec l'âge, mais les deux autres techniques révèlent aussi la présence de la mutation A189G dans cet individu, dans un taux de 10%.

Si les mécanismes d'accumulation de ces mutations sont liés d'une part au stress oxydatif et d'autre part à des positions "hot-spots" sur l'ADNmt (Wang *et al.* 2001 ; Stoneking 2000), il est tout à fait possible que les mutations sur les mêmes positions que le tissu musculaire s'accumulent avec l'âge sur le tissu osseux. Les taux de mutations ADNmt augmentent avec l'âge, et semblent vrai pour toutes les mutations rapportées dans les tissus analysés. Par extrapolation, il semble possible de pouvoir appliquer cette règle sur le tissu osseux. De même, l'hétéroplasmie sur deux sites peut aussi se rencontrer dans un même échantillon, mais dans des taux plus faibles (Bendall *et al.* 1997 ; Wilson *et al.* 1997 ; Bidooki *et al.* 1997).

### *La variabilité tissulaire*

Une autre caractéristique de cette étude est que l'accumulation de mutations est nettement plus haute dans le muscle squelettique (20 à 50 % dans les individus les plus âgés) par rapport aux cellules buccales (maximum 12,6%) pour la position 189. Ces niveaux élevés de mutations en relation avec l'âge dans le tissu musculaire ont déjà été décrits (Wang *et al.* 2001 ; Del Bo *et al.* 2002). Cette différence pourrait être expliquée par l'activité mitotique élevée des cellules buccales. En effet, les mutations ADNmt associées au vieillissement se rencontrent plus fréquemment et s'accumulent plus rapidement dans les tissus à demande énergétique élevée et à activité mitotique lente, tel que le muscle squelettique, le cœur et le

cerveau (Linnane *et al.* 1989 ; Nagley et Wei 1998 ; Wallace 1999). Ces caractéristiques pourraient expliquer que le taux de mutation dans les cellules buccales ne montre pas un âge seuil et que la variation du pourcentage de mutation soit inexistante entre un individu de 40 ans et un autre de plus de 60 ans car l'effet du renouvellement cellulaire très rapide dans ces cellules masquerait toute accumulation de mutations. Ainsi, même à des âges avancés (nous avons 3 individus de plus de 80 ans dans notre échantillonnage buccal) le taux de mutation ne dépasserait pas 10%, le renouvellement cellulaire prenant le pas sur le processus cumulatif mutationnel.

Le fait que la mutation A189G s'accumule de manière tissu-spécifique est clairement établi à travers un double échantillonnage réalisé sur deux individus décédés (de 70 et 63 ans). Les échantillons musculaires et buccaux ont été analysés par la méthode PNA/qPCR. Pour l'individu de 70 ans, le pourcentage de molécules mutantes était de 8,9% dans les cellules buccales et de 21,2% dans le tissu musculaire. Une situation similaire était observée avec l'individu de 63 ans puisque nous avons constaté un niveau de mutant 3,5 fois plus haut dans le tissu musculaire par rapport aux cellules buccales (3,9% *versus* 14,3%). Ces résultats sont confirmés par la méthode de Southern blot où l'individu de 70 ans présente un marquage élevé en ce qui concerne le tissu musculaire par rapport aux cellules buccales. L'analyse avec le logiciel ImageQuant confirme que l'évaluation du taux de mutation dans le tissu musculaire est de 22% alors qu'il est  $\leq$  à 5% dans les cellules buccales. Pour le deuxième individu de 63 ans, la différence de mutation 189G est moins marquée par Southern blot, mais les pourcentages de variants G sont estimés à 12% dans l'échantillon musculaire et  $\leq$  à 5% dans les cellules buccales.

Cette accumulation spécifique tissulaire est aussi confirmée par séquençage dans ce même individu de 63 ans puisque l'hétéroplasmie T72C est présente dans le tissu musculaire et absente dans les cellules buccales. Cette mutation à la position 72 a déjà été décrite dans le tissu musculaire en relation avec l'âge (Calloway *et al.* 2000). Donc dans le tissu musculaire d'une même personne on constate la reconnaissance de deux hétéroplasmies T72C et A189G en relation avec l'âge et leurs absences dans les cellules buccales. Cette variabilité de fréquence de mutation entre tissus a déjà été observée dans les études sur les maladies mitochondriales (Chinnery *et al.* 1999), pouvant impliquer à nouveau le taux de renouvellement cellulaire.

### *Les positions 408 et 414*

Les résultats de détection des mutations T408A et T414G par la méthode PNA/qPCR révèlent que ces mutations sont identifiées dans des fréquences et des taux très faibles.

Pour la position 408, seulement trois échantillons musculaires dans des âges inclus entre 54 et 64 ans peuvent être reconnus dans des taux compris entre 5 et 10%. Ces taux faibles de mutation T408A dans le tissu musculaire ne sont pas surprenants car cette hétéroplasmie a été enregistrée dans les autres études à un pourcentage maximal de 12% (Wang *et al.* 2001 ; Del Bo *et al.* 2002).

La fréquence de cette mutation dans le tissu musculaire d'individus de plus de 50 ans peut s'avérer faible (3/29) la difficulté résidant dans la détermination de taux faible de mutants dans des  $\Delta Ct$  très grands. En effet d'autres échantillons musculaires présentent des variations de cycles de 1 à 3 par rapport au contrôle WT, mais nous n'avons pas pris en compte ces résultats car ils restent trop difficiles à interpréter, ne sachant si la variation enregistrée peut être due effectivement à une proportion très faible de molécules mutantes ou à un blocage de la PCR plus ou moins efficace.

Néanmoins, dans le tissu musculaire, nous pouvons constater qu'au niveau de l'individu de 64 ans, la mutation 189 est aussi déterminée dans un pourcentage de 14,3%. Pour les deux autres individus de 54 ans, pour l'un, l'hétéroplasmie 408A est la seule identifiée. Pour le deuxième, l'analyse par séquençage démontre une hétéroplasmie A73G avec un pic G représentant environ 1/3 de la surface totale des deux pics et la méthode PNA/qPCR détermine un taux de mutants 189G à 16,5%. Ces résultats démontrent à nouveau qu'un ou plusieurs points de mutation sous forme d'hétéroplasmie peuvent s'accumuler avec l'âge dans le tissu musculaire d'un sujet.

Au niveau de la position 414, l'ensemble des variations de  $\Delta Ct$  dans les individus de plus de 50 ans restent là aussi très faibles. Nous avons au départ de ce travail de thèse choisi d'évaluer cette position car elle était alors assez bien caractérisée dans les fibroblastes de peau (Michikawa *et al.* 1999 ; Del Bo *et al.* 2001) et une seule étude sur le tissu musculaire révélait sa présence sur un ensemble de 23 individus (Murdock *et al.* 2000). Depuis, des travaux semblent démontrer sa spécificité tissulaire aux fibroblastes et une détermination dans des taux très faibles sur le tissu musculaire (Del Bo *et al.* 2003 ; Cormio *et al.* 2005).

Les valeurs enregistrées sur les 3 échantillons buccaux nous interrogent sur la démonstration de la présence de cette mutation T414G, celle-ci n'étant jamais décrite dans la seule étude des cellules buccales à notre disposition (Nekhaeva *et al.* 2002).

Aucune autre technique n'a pu être mise en place pour analyser ces deux positions 408 et 414. Mais des points techniques doivent être pris en compte, d'une part la difficulté de mettre en évidence des mutations dans des taux faibles, sans doute inférieur à 10%, et d'autre part, pour la position 408, la présence d'un palindrome dans la séquence créant une structure secondaire. Mais, d'après les travaux très récents de Hancock et collègues (2005) il serait possible de confirmer ou d'infirmer ses résultats en combinant la technique de sonde PNA et de séquençage automatique. En effet, ceux-ci examinent, pour une autre position (C6371T) les effets de plusieurs concentrations de PNA lors de la première PCR de séquençage. La sonde PNA bloquant la forme WT (6371C) en premier lieu, les segments amplifiés lors de cette première PCR sont soumis à l'analyse par séquençage, le nucléotide M (6371T) étant détecté alors sur les électrophorégrammes, son pic T étant proportionnel à la concentration de la sonde PNA appliquée précédemment. C'est-à-dire que ce pic T est pré-existant dans l'échantillon et qu'il est à peine visible par séquençage sans sonde PNA, et plus on augmentera la concentration en PNA, plus il sera détectable par séquençage. Cette technique permet une détection d'un taux très faible de mutant dans les valeurs de 10% mais la quantification reste difficile à évaluer si le taux initial de l'échantillon est inconnu.

### Apport des résultats

#### *La sensibilité des techniques*

L'utilisation simultanée des trois techniques dans ce travail, en plus de la démonstration de la meilleure sensibilité de la méthode PNA/qPCR, a permis de nous révéler un point technique intéressant. Le séquençage automatique de l'ADN est une technique largement employée pour rechercher les mutations ADNmt, néanmoins il a été démontré que les niveaux faibles ( $\leq 20\%$ ) d'hétéroplasmie ADNmt ne peuvent pas être correctement détectés par cette technique (Chinnery *et al.* 2001). Dans cette étude nous avons aussi démontré que la technique de séquençage automatique de l'ADN ne permet pas une estimation quantitative d'une proportion de mutant inférieure à 30%. Cette technique utilise généralement des didésoxynucléotides à trois phosphates (ddNTPS) marqués avec différents fluorophores (Rosenthal et Charnock-Jones 1992). Le désavantage majeur de la chimie des fluorophores terminaux est la production de profil de pics avec des surfaces inégales après la réaction d'amplification, ces profils restant largement dépendant du contexte local de la séquence et des polymérases ADN utilisées (Parker *et al.* 1996). Les didésoxynucléotides marqués avec la chimie BigDye™ Terminator montrent des hauteurs de pics moins uniformes et moins de suppression de pic G (Rosenblum *et al.* 1997). Cependant, Zakeri *et al.* (1998) ont analysé la dépendance au contexte de la



variation de hauteur des pics pour améliorer l'interprétation des données. Un problème commun se rencontre quand un nucléotide G suit un nucléotide A. La taille des pics G marqués par un fluorophore est plus basse par rapport à la hauteur du pic A précédent sur le profil de séquence. Ceci est vrai aussi pour les sites de bases mixtes A/G dans les mutations hétérozygotes (Korch et Drabkin 1999). Cette variabilité de la hauteur des pics sur l'électrophorégramme réduit la précision de la détermination des bases par le logiciel et gêne la détection des mutations hétérozygotes. Dans le cas de la position 189, où le contexte local de séquence peut être GAA ou GAG, la base G marquée par le fluorophore BigDye™ Terminator est incorporée avec difficulté en comparaison de la base A liée au fluorophore BigDye™ Terminator, produisant une augmentation du pic A avec un pic G sous estimé dans cette séquence. L'ensemble de ces problèmes, les niveaux faibles d'hétéroplasmies et l'incorporation de la base G BigDye™ après ou en même temps que la base A BigDye™, pourrait expliquer les différences de détection entre le séquençage automatique et la méthode PNA/qPCR.

Une étude avait déjà démontré les difficultés de détection des hétéroplasmies selon les techniques employées (Tully *et al.* 2000). La technique très sensible de DGGE (Denaturing Gradient-Gel Electrophoresis) a mis en évidence des hétéroplasmies à des niveaux aussi bas que 1%. Avec cette technique on a pu rendre compte que la fréquence de l'hétéroplasmie mitochondriale est beaucoup plus fréquente en comparaison avec celles reportées par le séquençage ou par analyse SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), de l'ordre de 14% dans la population par détection DGGE par rapport à 1,48% et 2,53% pour les deux autres techniques. Ces hétéroplasmies peuvent donc être largement communes, à des niveaux de  $\pm 5\%$  sur de nombreuses positions.

Très récemment, Hancock *et al.* (2005) ont développé un matériel standard de référence afin d'évaluer, en analysant des taux d'hétéroplasmies différents, la sensibilité de plusieurs techniques de détection. Plus particulièrement, en faisant des évaluations inter-laboratoires, ils ont démontré que le séquençage automatique, incluant plusieurs chimies et plusieurs appareils d'analyse, ne permettait la détection d'hétéroplasmies qu'à des taux de seulement 30%. A 20% ou 10%, l'hétéroplasmie restait difficile à distinguer du bruit de fond, et était détectable seulement si la position était connue. Ces constatations correspondent aux résultats obtenus dans ce travail. De plus, il a été constaté que le séquençage du brin F (forward) produisait de meilleurs résultats que le brin R (reverse), ce que nous avons aussi remarqué au cours des analyses et que la chimie BigDye™ Terminator apportait les meilleurs résultats. Au contraire, la

technique PNA, bien qu'elle soit utilisée différemment, était capable de déterminer des taux de mutation jusqu'à 5%.

Comme établi dans ce travail, la technique de "PNA-directed PCR clamping" est une méthode très spécifique et très sensible pour identifier les changements d'un seul nucléotide dans les molécules ADN (Ørüm 2000). Les hybrides PNA-ADN sont plus stables que le double brin ADN et la cinétique d'hybridation du PNA est moins influencée par la concentration en sels. Les molécules PNA sont beaucoup plus sensibles à un mésappariement interne de paire de base avec leur complément ADN; il en résulte une perte de température de fusion importante de 10 à 18°C, ce qui permet de mettre en place la spécificité de la technique. De plus, la molécule PNA n'est pas reconnue par les polymérases et par conséquent ne peuvent être copiées ou utilisées comme des amorces. Les sondes PNA sont des molécules plus "robustes" pour les méthodes de PCR en Temps Réel par rapport à beaucoup de leurs homologues dérivés de l'ADN, telles que des sondes d'hybridation, qui sont dégradées pendant la PCR par l'activité endonucléase de la Taq polymérase (Wilhem *et al.* 2001). Cette technique combinée avec la PCR en Temps Réel démontre une quantification très sensible et une excellente reproductibilité.

Selon plusieurs travaux, la technique PNA identifie des molécules mutantes à des niveaux de 1% de la totalité des molécules par PCR directe (Murdock *et al.* 2000; Murdock et Wallace 2002), et de 0,1% par PCR suivit d'un séquençage (Hancock *et al.* 2002).

Dans les travaux discutés précédemment, la détection des molécules s'effectue à partir de 5% par PCR suivit d'un séquençage (Hancock *et al.* 2005). L'obtention de ces résultats est possible en utilisant des concentrations de sondes PNA jusqu'à 24 µM. Dans ce travail, l'optimisation a été réalisée pour une concentration de sonde de 2µM, mais nous avons effectué des tests de PCR en Temps Réel pour 4 concentrations différentes, de 1 à 3 µM, les Ct entre les différentes concentrations d'un même point ne variant que d'un seul cycle. Cette différence est visible lors de l'établissement des courbes expérimentales de pourcentage de mutants où les variations de cycles entre des points qui diffèrent de 1%, pour une concentration PNA de 2 µM, n'est en moyenne que d'un cycle. La discrimination du taux de mutants est améliorée et précisée en effectuant les ratios de Ct. Il faut reconnaître que dans les points faibles d'hétéroplasmies, la quantification, dû au blocage de la sonde, à la qualité de l'ADN, à la précision intra-test, et à l'erreur moyenne de mutants calculés, perd de sa précision. Au vu des derniers travaux, une augmentation de la concentration de la sonde PNA, par exemple à 8 ou 16 µM, permettrait une discrimination plus puissante de ces niveaux faibles d'hétéroplasmies (jusqu'à 10%).

### *L'évaluation d'autres techniques*

L'évaluation des techniques appliquées par 12 laboratoires sur le matériel de référence d'hétéroplasmies construit par Hancock et ses collègues (2005) permet non seulement de montrer les échecs d'analyse par séquençage automatique, mais aussi met en avant de nouvelles techniques d'évaluation d'hétéroplasmies comportant un système de détection sensible et une quantification en parallèle. Généralement, la quantification d'un taux d'hétéroplasmies pour la plupart des techniques est difficile dans des taux inférieurs à 10%. Deux techniques sont capables de détecter et de quantifier dans des taux de 1 à 10% aussi bien que dans les niveaux élevés les hétéroplasmies : le système Luminex 100 (Luminex corporation ; Dunbar 2006) et le procédé LigAmp (Shi *et al.* 2004). Ces deux méthodes allient le marquage d'oligonucléotides, pour l'une fixée sur des microsphères, pour l'autre par des liaisons sur la matrice ADN, et une lecture de la fluorescence par cytométrie ou en PCR en Temps Réel. Elles pourraient être intéressantes, dans le sens où elle nécessite peu de produits PCR initial et produisent des résultats sensibles et quantifiables, notamment en ce qui concerne les échantillons osseux anciens.

### *Applicabilité en Médecine Légale*

La sensibilité et la précision de la technique PNA/qPCR comparées au séquençage automatique pourrait être intéressante dans les recherches médico-légales où la détection d'hétéroplasmie n'est pas habituelle. Techniquement, l'avantage de la méthode PNA/qPCR est qu'elle nécessite peu de manipulations avant PCR et aucune post-PCR. Une seule expérience incluant des amplifications sans et avec les deux types de sondes est suffisante pour obtenir un résultat fiable et rapide du taux d'hétéroplasmie dans un échantillon tout en limitant les risques de contaminations. On peut, pour éviter l'imprécision entre différentes expériences, incorporer les deux contrôles WT et M, mais aussi incorporer systématiquement les courbes expérimentales d'échelle de variant G sur la plaque d'amplification des échantillons et obtenir ainsi une précision interne de la technique avec une marge d'erreur très réduite. Mais il est nécessaire de connaître au préalable la séquence des échantillons à cribler afin d'appliquer la sonde PNA correspondante en ce qui concerne la position 189. La méthode PNA/qPCR représente une technique rapide et flexible, elle évite les contaminations en laboratoire en réduisant le nombre de manipulations et elle permet une détection fine dans des valeurs < à 10%.

De plus, le fait que le niveau d'hétéroplasmie varie entre les différents tissus ou organes d'un même individu et qu'il est exprimé dans des valeurs très faibles pour certains, (cf. les cellules buccales *versus* le tissu musculaire) augmente les difficultés de d'interprétation. Il peut être

important alors d'utiliser une technique très sensible permettant d'obtenir une détection à des taux très faibles. En effet, l'interprétation dans les cas d'identification est parfois compliquée à cause de la présence des hétéroplasmies dans un échantillon biologique donné (les cheveux par exemple) et de son absence dans d'autres (le sang par exemple). Par conséquent, la possibilité de démontrer la présence des molécules mutantes dans deux types d'échantillons peut éliminer des éléments d'incertitude. Au contraire, dans le fait que le pourcentage de mutants semble plus élevé dans le tissu musculaire, d'autres échantillons tissulaires (comme les cellules buccales ou le sang) devraient être choisis lors d'une analyse ADNmt par séquençage automatique lors d'identification pour minimiser les incertitudes sur les interprétations.

Parce que la corrélation est clairement établie entre l'âge de l'individu étudié et le niveau de molécules mutantes à la position 189, l'âge du sujet testé doit être considéré lors des interprétations de résultats ADNmt. Comme précédemment souligné par Calloway *et al.* (2000), l'âge et l'hétéroplasmie doivent être examinés dans les cas de personne disparue quand un sujet significativement vieux est analysé comme référence pour une relation de parenté maternelle à la personne disparue. De la même façon, cette information est utile pour l'interprétation ADNmt dans le cadre d'enquête sur des restes biologiques lors de désastre incluant de nombreuses personnes.

Il est clair que l'évaluation d'une seule hétéroplasmie ne peut pas nous permettre de déterminer l'âge de l'individu analysé. Cependant, les résultats dans le tissu musculaire sur la mutation ponctuelle A189G semblent démontrer qu'un âge seuil d'environ 60 ans peut être pris en compte, où l'augmentation exponentielle du taux de mutants est effective. En effet, le test de student calculé sur les valeurs de mutant trouvées par PNA/qPCR entre les individus de moins de 60 ans et ceux de plus de 60 ans montre une différence significative entre les deux groupes d'âge. Cette différence d'accumulation entre les individus d'un âge de 50 à 60 ans par rapport aux plus de 60 ans est aussi démontrée dans les travaux de Cormio *et al.* (2005) dans les fibres musculaires dégénératives et normales. Les mutations T72C et A73G détectées dans des individus âgés de 54 à 63 ans par séquençage permettent de penser qu'un processus d'accumulation similaire peut être présent pour ces mutations, mais nécessite une détection plus sensible. De plus, le fait de détecter les hétéroplasmies sur ces deux positions (donc  $\geq$  à 30%) par rapport à l'absence de détection des positions 414 et 408 avec la méthode de séquençage automatique, démontre que dans des taux plus élevés, il serait plus intéressant de discriminer les positions 72 et 73. L'analyse croisée de ces mutations ponctuelles pouvant mener à une discrimination plus précise des deux groupes d'âges (par exemple  $<$  ou  $>$  à 60 ans).

Les délétions mitochondriales s'accumulant avec l'âge sont reconnues et von Wurmb-Schwark *et al.* (2002) ont testé leur quantification par PCR en Temps Réel. Les valeurs du taux de ces délétions restent pourtant faibles, de l'ordre de 0,1 à 1%, et nous pouvons nous poser la question sur l'intérêt d'une détermination dans des taux aussi faibles.

Il serait intéressant de pouvoir aborder des mutations pouvant être présentes dans des individus plus jeunes. Une recherche pourrait être envisageable au regard des résultats de Tengan *et al.* (2002) sur l'augmentation du nombre de mini-duplications avec l'âge. En effet, ces auteurs semblent démontrer que le nombre de mini-duplications est  $\geq$  à 3 dans des âges supérieurs à 40 ans. Mais cette approche nécessite de nouvelles mises au point et surtout d'évaluer si une technique de discrimination d'un nombre de segments dupliqués peut être appliquée sur l'ADN fragmenté présent dans des échantillons osseux actuels ou anciens.

#### *L'analyse par les marqueurs ostéologiques, les applications en Médecine Légale et en Anthropologie*

En ce qui concerne les prélèvements osseux modernes issus d'autopsies, les analyses des marqueurs ostéologiques n'ont pas pu être faites. Mais la comparaison de ces deux types d'indicateurs, la mutation 189G et les critères osseux des échantillons pourrait apporter des indications supplémentaires à une détermination de l'âge.

De plus, selon les techniques PNA/qPCR et Southern, l'absence ou la présence faible de la mutation 189G dans les individus de moins de 51 ans et la détermination d'un taux de mutant supérieur à 10% sur les 3 individus de plus de 71 ans peuvent laisser supposer une différence entre ces deux groupes comme elle peut se présenter dans le tissu musculaire. Il est clair que dans l'échantillonnage de cette étude, il manque des individus inclus entre 50 et 70 ans et donc cette hypothèse nécessite une analyse plus complète en nombre d'individus et en nombre de mutations. En effet, la recherche d'une corrélation entre les mutations (par exemple A189G et A73G pour le sujet de 105 ans) et les marqueurs ostéologiques du vieillissement normal et pathologique couramment employé en Médecine Légale, pourrait augmenter les indices de détermination de l'âge dans le cas d'identification.

En ce qui concerne les fragments osseux anciens, bien que l'analyse ne porte que sur 3 individus, la concordance entre les stades extrêmes de la symphyse pubienne et de la jonction sacro-iliaque et les phénomènes dégénératifs importants analysés sur les deux squelettes des individus Yak 32 et Yak 20 et l'accumulation de la mutation 189G est positive. De même, les caractères épiphysaires immatures de l'individu Yak 31 (un adulte) et l'absence de la mutation 189G confirme la complémentarité de ces deux types de marqueurs. Les autres

marqueurs de mutation ponctuelle identifiés dans le tissu musculaire et l'os (notamment les positions 72 et 73) peuvent être testés dans ce type d'échantillon. La séquence analysée pour la position 189 ne permettait pas l'analyse de ces positions car les segments étaient trop courts. Mais la recherche de nouvelles amorces encadrant ces positions et permettant le séquençage de cette région ainsi que l'évaluation de ces positions avec les sondes complémentaires correspondantes selon la technique de Southern blot ou les autres techniques citées précédemment (Luminex 100 system ou LigAmp) permettrait une reconnaissance correcte.

Il devient donc essentiel, dans le cadre d'une étude complète et d'une applicabilité en Anthropologie et en Médecine Légale, d'augmenter le nombre d'individus dans les deux groupes d'âges pour étayer nos résultats actuels. Les applications peuvent être très nombreuses, dans le cas d'identification individuelle en complément d'autres indices accessibles en Médecine Légale, dans les études anthropologiques d'ensemble sépulcraux, dans les cas de squelette incomplet où l'analyse ostéologique de l'âge ne peut être complètement faite, dans les cas pathologiques impliquant des phénomènes dégénératifs osseux.

Le choix de l'utilisation des sondes PNA (Peptid Nucleic Acid) a été fait car cette nouvelle technologie est très sensible permettant la discrimination des différentes molécules dans des taux très faibles (Ørüm *et al.* 1993 ; Ørüm 2000). Une telle technique reste indispensable dans l'étude des hétéroplasmies, surtout dans le cadre du vieillissement où les mutations apparaissent dans des taux faibles. Cette méthode PNA est employée dans la mise en évidence de mutations ponctuelles en relation avec l'âge (Murdock *et al.* 2000; Murdock et Wallace 2002) mais aussi dans la détection de taux très faible d'hétéroplasmie dans l'analyse de pathologies mitochondriales (Hancock *et al.* 2002). Elle reste d'actualité dans les évaluations techniques de détection sensible des fréquences faibles de mutations ADNmt (Hancock *et al.* 2005).

La PCR en Temps Réel est un très bon outil d'analyse largement utilisé dans divers domaines biologiques, dans l'évaluation quantitative de mutation ADN ou d'expression ARN pour des valeurs faibles (Higushi *et al.* 1993 ; Heid *et al.* 1996 ; Gibson *et al.* 1996). La fluorescence émise lors de la PCR, l'enregistrement des amplifications cycle par cycle procurent une lecture très fine et d'une sensibilité importante, permettant ainsi une quantification très résolutive (Wilhem *et al.* 2001).

Dans ces travaux, nous avons mis en place une technique combinant les sondes PNA et la PCR en Temps Réel. Cette méthode présente des avantages, elle nécessite peu de manipulations pré-PCR et aucune post-PCR, ce qui limite les contaminations croisées entre les échantillons. Elle allie la discrimination forte entre des molécules différentes par un seul nucléotide et l'enregistrement sensible des variations de cycles. L'expérimentation en triplicats permet d'obtenir des résultats fiables statistiquement, et reste très rapide puisqu'une demi-journée suffit pour la préparation des plaques d'analyse et la réalisation de la PCR.

Cependant, une optimisation de la technique semble nécessaire surtout dans la quantification des taux faibles de mutation. Les points à prendre en compte sont les suivants : La technique nécessite un contrôle soigneux de la concentration ADN, car la réaction de qPCR est largement sensible à la quantité de matrices. La variation, bien que très faible, mais possible du blocage de la PCR par la sonde PNA à une incidence plus importante dans les taux faibles de mutants, et nécessite absolument des expériences en duplicats ou triplicats. Les analyses ont été réalisées à une concentration finale de sonde PNA à 2  $\mu\text{M}$  ainsi que dans l'établissement des courbes de référence. Nous pouvons constater sur les courbes de pourcentages de mutants réalisées pour la position 189, que les variations de cycle entre les différents points sont faibles, surtout dans les valeurs inférieures à 10%. Il est en effet difficile, quand l'enregistrement de cycles dans un échantillon diffère seulement de 1 ou 2 par rapport au contrôle, d'évaluer si la variation est due au blocage de la sonde ou à effectivement la présence de quelques molécules mutées. De plus, la précision intra-test de chaque échantillon, bien qu'elle soit faible (inclus entre 0,06% et 1,68%), et la moyenne de l'écart type appliquée par le calcul avec la courbe polynomiale (1,4%) augmente l'imprécision. Il reste peut-être illusoire d'accéder à une quantification de taux de mutants précise dans les valeurs inférieures à 10%. L'optimisation possible serait d'augmenter, au moins entre 0 et 10%, voire 20% de mutants, la concentration de la sonde PNA, à 8 $\mu\text{M}$  ou 16 $\mu\text{M}$ , afin d'augmenter la variation du nombre de cycles entre les points et ainsi améliorer la discrimination des molécules tout en conservant les conditions de contrôle citées tout le long de ce travail. Une courbe de référence établie avec des contrôles M et WT pour ces pourcentages permettrait un nouveau calcul. Une possibilité de vérifier la présence de molécules mutées dans les niveaux faibles (mais pas la quantification) serait de soumettre ces échantillons à une PCR classique amplifiant le segment cible avec et sans sonde PNA puis de vérifier au séquençage, à partir des segments de cette première PCR, la présence ou non du nucléotide recherché, technique proposée et démontrée par l'équipe de Levin (Hancock *et al.* 2002 ; Hancock *et al.* 2005).

Le séquençage automatique en tant que seule technique de discrimination des hétéroplasmies ne peut être utilisable, la démonstration est faite dans ce travail, mais aussi actuellement dans cette dernière étude incluant plusieurs laboratoires (Hancock *et al.* 2005). Elle reste essentielle et complémentaire dans l'identification des polymorphismes de séquence.

Le Southern blot reste une technique intéressante du fait qu'elle nécessite un volume ADN initial faible quoique de concentration correcte, par rapport à la méthode PNA/qPCR. Elle est donc applicable sur les échantillons anciens et est la moins coûteuse des techniques évaluées, mais elle demande trois jours de travail avant l'obtention de résultats. Nous avons démontré que la détection était sensible, même dans des taux faibles, puisque la limite de détection testée est de 5%. A nouveau, la quantification semble alors difficile, l'estimation est faite avec une marge d'erreur de  $\pm 5\%$ , augmentant l'imprécision dans des taux faibles.

Aborder le vieillissement par l'analyse moléculaire de l'ADNmt reste un défi car de nombreux facteurs doivent être pris en compte, augmentant la complexité et les difficultés d'analyse et d'interprétation.

Les taux de mutation de l'ADNmt augmentent avec l'âge, de manière exponentielle, pour les divers types de mutations rencontrés dans les tissus analysés. Nous avons pu démontrer que parmi les mutations ponctuelles décrites dans le tissu musculaire, au moins deux se rencontrent aussi dans le tissu osseux (A189G et A73G). Il apparaît que les mêmes phénomènes de cumulation de mutation peuvent avoir lieu dans le tissu osseux, même si des variables peuvent exister (par exemple dans les différences de niveau de mutant).

Mais, dans l'objectif d'établir une corrélation entre les mutations de l'ADNmt et l'âge pour améliorer la détermination de l'âge à partir de squelettes osseux implique l'étude de plusieurs mutations. En effet, les variations inter-individuelles du taux de ces mutations pour un groupe d'âge donné, les fréquences plus ou moins importantes selon les mutations, les polymorphismes présents sur les positions cibles, obligeant l'analyse d'autres positions, nécessite l'analyse de plusieurs mutations pour obtenir des données informatives.

Il est nécessaire aussi d'accompagner ces analyses moléculaires par des études d'indicateurs ostéologiques, permettant de comparer les deux types de marqueur au niveau individuel et populationnel.

Les mutations ponctuelles de la région de contrôle ADNmt étudiées dans ce travail présentent une accumulation de type exponentielle, ce qui est vrai aussi dans le cadre des mutations ponctuelles de la région codante et des délétions mitochondriales (Kadenbach *et al.* 1995 ;



Meissner *et al.* 2000 ; von Wurmb-Schwark *et al.* 2002) et ont donc un intérêt pour l'analyse d'individus du groupe d'âge supérieur à 60 ans. Il est évident que les « âges intermédiaires » (30-60 ans) sont très importants à analyser, d'une part pour mettre en évidence une cinétique d'apparition, et d'autre part de détecter des mutations plus précoces permettant d'identifier ce groupe d'âge. En cela, les études de mini-duplications de la région de contrôle ADNmt peuvent être informatives puisque le nombre de duplications semble augmenter à partir de 40 ans (Tengan *et al.* 2002).

Le tissu référent pour cette étude était le muscle. Il serait maintenant judicieux d'aborder un nouveau tissu référent, l'os. En ce cas, deux axes d'investigation sont possibles. Le premier est de considérer des sujets d'âge connu, de travailler sur des fragments d'os secs ou dépourvus d'autres tissus par le type de protocole utilisé dans ce travail. Ces prélèvements pourraient provenir de Médecine Légale ou de collections issues de cimetières fouillés, assez récents où les prélèvements d'os seraient possibles, et dont les sujets appartiendraient à une population récente. Le second consiste à caractériser des différences entre des sujets jeunes et âgés provenant de fouilles sur des sites anciens, où l'âge ne peut être identifié mais où l'étude des indicateurs ostéologiques, la conservation des vêtements et des éléments associés aux cadavres, joints à des pratiques funéraires différentes suivant le rôle social des sujets, permettrait de différencier les classes d'âges. Lors de ces études de sites funéraires anciens associées à l'étude des modes de vie des populations ayant occupées ces territoires, le vieillissement pourrait être abordé sous l'angle de la population et de son mode de vie.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'analyse de l'hétéroplasmie A189G par la méthode de PNA/qPCR a permis une détection sensible aussi bien qu'une quantification fiable et reproductible du taux de mutant. La majorité des molécules 189G présentes dans les échantillons a pu être confirmée par la technique de Southern blot, jusqu'aux valeurs de 10% de mutant.

Cette technique PNA/qPCR nous a permis de démontrer l'absence de la transition A189G dans les cellules buccales d'individus jeunes et sa présence dans les individus plus âgés d'une même lignée familiale, menant à la conclusion que cette mutation est somatique. De plus, nous avons démontré pour la première fois que la mutation A189G s'accumule avec l'âge dans les cellules buccales à activité mitotique importante, dans des niveaux inférieurs à 13%.

Dans les tissus post-mitotiques comme le tissu musculaire, la mutation A189G s'accumule avec l'âge et atteint des niveaux élevés dans les individus de 60 ans et plus. Ces niveaux importants après 60 ans sont aussi prouvés avec la technique de Southern blot, permettant de proposer qu'il existe une différence significative du taux de cette mutation entre les individus de moins de 60 ans et ceux de plus de 60 ans.

Nos résultats ont de nombreuses implications dans l'interprétation de l'hétéroplasmie dans les cas d'identification et de recherche de parenté dans les recherches médico-légale, où l'âge, la variabilité tissulaire et la sensibilité de la technique utilisée doivent être pris en compte.

Cette première approche sur le tissu osseux a montré que la transition A189G est elle aussi présente dans ce type tissulaire et sa détection est mise en évidence par les deux techniques PNA/qPCR et Southern dans des taux semble t-il plus faibles que le tissu musculaire. L'identification de la mutation sur des individus d'âge connu, et malgré le nombre faible de l'échantillonnage, révèle que l'hétéroplasmie A189G est absente ou faiblement présente (<10%) dans les individus de moins de 50 ans, et est reconnue dans des taux supérieurs à 10% dans des âges de 70 ans et plus. Cette analyse mitochondriale offre un intérêt en Médecine Légale où l'investigation d'une corrélation possible entre ces mutations et les marqueurs ostéologiques du vieillissement normal et pathologique pourrait augmenter la performance des indicateurs dans le cas d'identification.

De plus, l'analyse de tissu osseux anciens, dont l'âge n'est pas connu mais où les marqueurs ostéologiques du vieillissement sont accessibles, donne une première indication positive de la détection de la mutation 189G dans les individus âgés et son absence dans l'individu immature. Ces premiers résultats démontrent un intérêt dans le cadre d'études anthropologiques où les indicateurs osseux de l'âge sont quelquefois absents ou incomplets.

De la même manière que l'indication en Médecine Légale, ces mutations mitochondriales peuvent être complémentaires aux marqueurs ostéologiques dans l'étude du vieillissement de populations anciennes.

D'autres mutations sous forme d'hétéroplasmie, T72C et A73G, reconnues dans le tissu musculaire et osseux sur des individus âgés, peuvent être informatives en plus de l'identification de la mutation A189G, pour une analyse plus précise de l'âge applicable dans les deux domaines de la Médecine Légale et de l'Anthropologie. Ces mutations ponctuelles de l'ADNmt présentes dans l'os, pourraient peut-être servir à déterminer, sinon l'âge du sujet, du moins la classe d'âge au décès (plus de 40 ans ou plus de 60 ans par exemple).

Ainsi, la mise en place de techniques de détection et de quantification des hétéroplasmies au sein de l'ADN mitochondrial, l'identification des mutations A189G, T72C et A73G, nous a permis de démontrer une relation avec l'âge dans le tissu musculaire et osseux de ces hétéroplasmies. Dans la perspective de ces premiers résultats annoncés, nous envisageons d'approfondir plusieurs points.

En premier lieu, les mutations ponctuelles mitochondriales sur les positions 189, 72 et 73 seront analysées par les techniques établies de PNA/qPCR et/ou de Southern et une autre technique peut être mise en place, comme les procédés LigAmp ou Luminex 100, afin d'évaluer une quantification exacte dans des taux faibles pour les échantillons présentant de l'ADN dégradé. L'étude d'autres types de mutations peuvent être envisager dans les limites de l'applicabilité des techniques.

Dans le cadre de la Médecine Légale, nous proposons de continuer les prélèvements tissulaires de muscle et d'os sur des individus dont l'âge puisse être établi secondairement, et d'augmenter ainsi le nombre d'individus, permettant une représentation de l'ensemble des groupes d'âges. Le double échantillonnage tissulaire nous permettra d'une part d'évacuer le problème d'hétéroplasmies transmises et d'autre part de suivre l'accumulation des mutations avec l'âge au sein même de l'individu et d'enregistrer les différences tissulaires. De plus, les marqueurs ostéologiques du vieillissement sur la quatrième côte seront étudiés sur ces prélèvements par analyse de tomodynamométrie et la corrélation entre les deux types d'indicateurs (osseux et mitochondriaux) pourra être évaluée.

Sur le plan de l'Anthropologie, le nombre d'échantillons osseux anciens provenant des sites de Sibérie en cours d'étude dans le cadre de la Mission Archéologique Française de la Sibérie Orientale, vont être augmentés afin de compléter les premiers résultats. Nous essaierons d'appliquer une méthode de détection et de quantification applicable sur ce type

d'échantillons. Il peut être envisageable que des ensembles familiaux ou sépulcraux puissent être accessibles à l'étude dans le but d'affiner ces premiers résultats sur des populations anciennes. La relation entre des mutations mitochondriales et les cas de vieillissement pathologique osseux seraient aussi très intéressants à examiner.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## BIBLIOGRAPHIE

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD 1994 Conversion de l'énergie : mitochondries et chloroplastes. Dans : Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Edition Médecine Flammarion, Paris. 2<sup>nd</sup> édition pp 341-401
- Ames BN. 1989 Endogenous oxidative DNA damage aging and cancer. *Free Radic.Res. Commun* 7: 121-128
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993 Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7915-7922
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. 1981 Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465
- Aruoma OI, Halliwell B, Dizdaroglu M. 1989 Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the super-oxide radical generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 264: 13024-13028
- Attardi G, Chomyn A, Montoya J, Ojala D. 1982 Identification and mapping of human mitochondrial genes. *Cytogenet Cell Genet* 32: 85-98
- Barja G, Herrero A. 2000 Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J.* 14: 312-318
- Beckman KB, Ames BN. 1997 Oxidative decay of DNA. *J. Biol.Chem.* 272: 19633-19636.
- Bendall KE, Macaulay VA, Sykes BC. 1997 Variable levels of a heteroplasmic point mutation in individual hair roots. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 1303-1308
- Berdanier CD, Everts HB. 2001 Mitochondrial DNA in aging and degenerative disease. *Mutation Research.* 475 : 169-184
- Berlett BS, Stadtman E. 1997 Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272: 20313-20316
- Berr C. 1997 100 000 nouveaux cas de démence par an. *La Recherche* 303 : 68-71
- Berrington A, Darby SC, Weiss HA, Doll R. 2001 100 years of observation on British radiologists mortality from cancer and other causes. 1897-1997. *Br. J. Radiol.* 74:507-519
- Bichat X. 1800. Recherches physiologiques sur la vie et la mort. Réédition Flammarion, Paris 1994
- Bidooki SK, Johnson MA, Chrzanowska-Lightowlers Z, Bindoff LA, Lightowlers RN. 1997 Intracellular mitochondrial triplasmcy in a patient with two heteroplasmic base changes. *Am. J. Hum. Genet.* 60:1430-1438

- Bohr VA. 2002 Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 32(9): 804 - 812
- Bohr VA, Stevnsner T, Souza-Pinto NC. 2002 Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene* 286: 127-134
- Bouzidi MF, Poyau A, Godinot C. 1998 Co-existence of high levels of a cytochrome b mutation and of tandem 200 pb duplication in the D-Loop of muscle human mitochondrial DNA. *Hum. Mol. Genet.* 7: 385-391
- Boveris A. Chance B. 1973 The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134: 707-716
- Brierley EJ, Johnson MA, Lightwolers RN, James OFW, Turnbull DM. 1998 Role of mitochondrial DNA mutations in human aging: implications from the central nervous system and muscle. *Ann. Neurol.* 43: 217-223
- Brockington M, Sweeney MG, Hammans SR, Morgan-Hughes JA, Harding AE. 1993 A tandem duplication in the D-Loop of human mitochondrial DNA is associated with deletions in mitochondrial myopathy. *Nat. Genet.* 4: 67-71
- Brooks ST, Suchey JM. 1990 Skeletal age determination based on the os pubis : a comparison of the Acsadi-Nemeskeri and Suchey-Brooks methods. *Human Evolution* 5: 227-238.
- Brown TD. Samuels DC. Michael EM. Turnbull DM. Chinnery PF. 2000 Random genetic drift determines the level of mutant mtDNA in human primary oocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 533-536
- Budowle B, Allard MW, Wilson MR. 2002 Critique of interpretation of high levels of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA hypervariable region I from hair. *Forensic Sci. Int.* 126: 30-33
- Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S. 1999 Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res.* 424:9-21
- Calloway CD, Reynolds RL, Herrin GL Jr, Anderson WW. 2000 The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age. *Am. J. Hum. Genet.* 66:1384-1397
- Cattaneo C, Smillie DM, Gelsthorpe K, Piccinini A, Gelsthorpe AR, Sokol RJ 1995 A simple method for extracting DNA from old skeletal material. *Forensic Sci. Int.* 74:167-174
- Cerami A. 1985 Hypothesis: glucose as mediator of aging. *J. Am. Ger. Soc.* 33: 626-634
- Chance B, Sies H, Boveris A. 1979 Hydroxoperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605

- Chatgialloglu C, O'Neill P. 2001 Free radicals associated with DNA damage. *Experimental Gerontology* 36: 1459-1471
- Chinnery PF, Zwijnenburg PJG, Walker M, Howell N, Taylor RW, Lightowlers RN, Bindoff L, Turnbull DM. 1999 Nonrandom tissue distribution of mutant DNA. *Am. J. Med. Gen.* 85:498-501
- Chinnery PF, Thorburn DR, Samuels DC, White SL, Dahl HHM, Turnbull DM, Lightowlers RN, Howell N. 2000 The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy : random drift, selection or both? *Trends Genet.* 16: 500-505
- Chinnery PF, Taylor GA, Howell B, Brown DT, Parsons TJ, Turnbull DM. 2001 Point mutations of the mtDNA control region in normal and neurodegenerative human brains. *Am. J. Hum. Genet.* 68 : 529-532.
- Chinnery PF. 2002 Modulating heteroplasmy. *Trends Genet.* 18(4):173-176
- Chinnery PF, Schon EA. 2003 Mitochondria. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74: 1188-1199
- Chomyn A. 1998 The myoclonic epilepsy and ragged-red fiber mutation provides new insights into human mitochondrial function and genetics. *Am J Hum Genet* 62: 745-751
- Chomyn A, Attardi G. 2003 mtDNA mutations in aging and apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 304: 519-529
- Clark JM, Beardsley GP. 1987 Functional effects of cis-thymine glycol lesions on DNA synthesis in vitro. *Biochemistry* 26: 5398-5403
- Clayton DA. 1982 Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28: 693-705
- Comfort A. 1979 The biology of senescence. 3<sup>ième</sup> édition Churchill Livingstone, Edinburg and London
- Cormio A, Millela F, Vecchiet J, Felzani G, Gadaleta MN, Cantatore P. 2005 Mitochondrial DNA mutations in RRF of healthy subjects of different age. *Neurobiology of Aging* 26:655-664
- Corral-Debrinski M, Stepien G, Shoffner JM, Lott MT, Kanter K, Wallace DC. 1991 Hypoxemia is associated with mitochondrial DNA damage and gene induction. *JAMA* 266(13): 1812-1816
- Corral-Debrinsky M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC. 1992 Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat. Genet.* 2: 324-329
- Cortopassi GA, et Arnheim N. 1990 Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Research.* 18 (23) : 6927-6933
- Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N. 1992 A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 7370-7374.



- Croteau DL, ap Rhys CM, Hudson EK, Dianov GL, Hansford RG Bohr VA. 1997 An oxidative damage-specific endonuclease from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 272: 27338-27344
- Crubézy E, Braga J, Larrouy G. 2002 Anthropobiologie. Masson, Paris
- Crubézy E. 2004 Rapport 2004 de la Mission Archéologique Française en Sibérie Orientale. Ministère des Affaires Etrangères. Direction de la coopération scientifique, universitaire et de la recherche.
- Darwin C. 1859 On the origin of species by means of natural selection. Murray J London. Traduction française Edition Barbier Maspero, Paris 1980
- Del Bo R, Comi GP, Perini MP, Strazzer S, Bresolin N, Scarlato G. 2001 Down's syndrome fibroblasts anticipate the accumulation of specific ageing-related mtDNA mutations. *Annals of Neurology* 49: 137-138
- Del Bo R, Bordoni A, Boneschi FM, Crimi M, Sciacco M, Bresolin N, Scarlato G, Comi GP. 2002 Evidence and age-related distribution of mtDNA D-loop point mutations in skeletal muscle from healthy subjects and mitochondria patients. *J. Neurol. Sci.* 202(1-2):85-91
- Del Bo R, Crimi M, Sciacco M, Malferrari G, Bordoni A, Napoli L, PELLE A, Biunno I, Moggio M, Bresolin N, Scarlato G, Comi GP. 2003 High mutational burden in the mtDNA control region from aged muscles: a single-fiber study. *Neurobiology of aging* 24: 829-838
- Dianov GL, Sleeth KM, Dianova II, Allinson SL. 2003 Repair of abasic sites in DNA. *Mutat. Res.* 531: 157-163
- Dizdaroglu M. 1992 Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat. Res.* 275: 331-342
- Dunbar SA. 2006 Applications of Luminex xMap technology for rapid, high-throughput multiplex nucleic acid detection. *Clin. Chim. Acta* 363 (1-2): 71-82
- Fayet G, Jansson D, Sternberg AR, Moslemi AR, Blondy P, Lombes A, Fardeau M, Oldfors A. 2002 Ageing muscle: clonal expansions of mitochondrial DNA point mutations and deletions cause focal impairment of mitochondrial function. *Neuromuscul. Disord.* 12: 484-493
- Fily ML, Crubézy E, Courtaud P, Keyser C, Ebrard D, Ludes B. 1998 Analyse paleogénétique des sujets de la grotte sépulcrale d'Elzarreko Karbia (Bronze ancien, Pays Basque). *C. R. Académie des Sciences* 321: 79-85
- Forster L, Forster P, Lutz-Bonengel S, Willkomm H, Brinkmann B. 2002 Natural radioactivity and human mitochondrial DNA mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(21):13950-13954
- Gavrilov LA, Gavrilova NS. 2002 Evolutionary theories of aging and longevity. *The Scientific World Journal* 2: 339-356

- Gibson UEM, Heid CA, Williams PM. 1996 A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research* 6:995-1001
- Girotti AW. 1998 Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39: 1529-1542
- Golden TR, Melov S. 2001 Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and aging. *Mechanisms of ageing and development* 122:1577-1589
- Green DR, Reed JC. 1998 Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312
- Greenberg BD, Newbold JE, Sugino A. 1983 Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene* 21: 33-49
- Grollman AP, Moriya M. 1993 Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet.* 9: 246-249
- Grzybowski T. 2000 Extremely high levels of human mitochondrial DNA heteroplasmy in single hair roots. *Electrophoresis* 21:548-553
- Grzybowski T, Malyarchuk BA, Czarny J, Miscicka-Sliwka D, Kotzbach R. 2003 High levels of mitochondrial DNA heteroplasmy in single hair roots: reanalysis and revision. *Electrophoresis* 24:1159-1165
- Halliwell B, Aruoma OI. 1991 DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281: 9-19
- Hamilton ML, Guo Z, Fuller CD, Van Remmen H, Ward WF, Austad SN, Troyer DA, Thompson I Richardson A. 2001a A reliable assessment of 8-oxo-2-deoxyguanosine levels in nuclear and mitochondrial DNA using the sodium iodide method to isolate DNA. *Nucleic Acid Research* 29 (10): 2117-2126
- Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, Yang H, Mao Guo Z, Kewitt K, Walter CA, Richardson A. 2001b Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (18): 10469-10474
- Hancock DK, Schwarz FP, Song F, Wong LJC, Levin BC. 2002 Design and use of a peptide nucleic acid for detection of the heteroplasmic low-frequency mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) mutation in human mitochondrial DNA. *Clinical Chemistry* 48 (12): 2155-2163
- Hancock DK, Tully LA, Levin BC. 2005 A standard reference material to determine the sensitivity of techniques for detecting low-frequency mutations, SNPs, and heteroplasmies in mitochondrial DNA. *Genomics* 86: 446-461
- Harman D. 1956 Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Geront.* 11: 298-300

- Harman D. 1971 Free radical theory of aging: effect of the amount and degree of unsaturation of dietary fat on mortality rate. *J. Geront.* 26: 451-457
- Harman D. 1972 The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.* 20(4): 145-147
- Harman D. 1981 The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78 (11): 7124-7128
- Hartwig M. 1994 Principles of control and selection in mammalian aging. *Gerontology* 40: 307-313
- Hashiguchi K, Bohr VA, Souza-Pinto NC. 2004 Oxidative stress and mitochondrial DNA repair: implications for NRTIs induced DNA damage. *Mitochondrion* 4: 215-222
- Hatahet Z, Purmal AA; Wallace SS. 1994 Oxidative DNA lesions as block to in vitro transcription by phage T7 RNA polymerase. *Ann. NY Acad. Sci.* 726: 346-348
- Hayakawa M, Torii K, Sugiyama S, Tanaka M, Ozawa T. 1991 Age-associated accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mitochondrial DNA of human diaphragm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 1023-1029
- Hayakawa M, Sugiyama S, Hattori K, Takasawa M, Ozawa T. 1993 Age-associated damage in mitochondrial DNA in human hearts. *Mol. Cell. Biochem.* 119: 95-103
- Hayashi JI, Ohta S, Kikuchi A, Takemitsu M, Goto Y and Nonaka I. 1991 Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10614-10618
- Hayflick L. 1965 The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37: 614-636
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996 Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6:986-994
- Herrero A, Barja G. 1999 8-oxodeoxyguanosine levels in heart and brain mitochondrial and nuclear DNA of two mammals and three birds in relation to their different rates of aging. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32: 609-615
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. 1993 Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026-1030
- Holliday R. 1995 Understanding ageing. Development and cell biology series editors: Barlows P, Bray W, Green BB, Kirk DL. Cambridge University Press
- Holt IJ, Harding AE, Morghan-Hughes JA. 1988 Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331 : 717-719.
- Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hugus JA. 1990 A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am. J. Hum. Genet.* 46 : 428-433

- Höltke HJ, Kessler C. 1990 Non-radioactive labeling of RNA transcripts in vitro with the hapten digoxigenin (DIG); hybridization and ELISA-based detection. *Nucleic Acids Research* 18(19): 5843-5851
- Höltke HJ, Ankenbauer W, Muhlegger K, Rein R, Sagner G, Seibl R, Walter T 1995 The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids – an overview. *Cell. Mol. Biol.* 41 (7): 883-905
- Howell N, Kubacka I & Mackey DA. 1996 How rapidly does the human mitochondrial genome evolve? *Am. J. Hum. Genet.* 59: 501-509.
- Huber LA, Xu QB, Jurgens G, Nock G, Buhler E, Gey KF, Schonitzer D, Traill KN, Wick G. 1991 Correlation of lymphocyte lipid composition membrane microviscosity and mitogen response in the aged. *Eur. J. Immunol.* 21: 2761-2765
- Hudson EK, Hogue BA, Souza-Pinto NC, Croteau DL, Anson RM, Bohr VA, Hansford RG 1998 Age-associated change in mitochondrial DNA damage. *Free Rad. Res.* 29: 573-579
- Huey RB. 1991 Lizard. *Exp. Gerontol.* 26: 411-439
- Ingle L, Wood TR, Banta AM 1937 A study of longevity, growth, reproduction and heart rate in *Daphnia longispina* as influenced by limitations in quantity of food. *J. Exp. Zool.* 76 (2): 325-352
- Iscan MY Loth SR 1986a Determination of age from the sternal rib in white males: a test of the phase method. *J Forensic Sci.* 31(1): 122-32
- Iscan MY Loth SR 1986b Determination of age from the sternal rib in white females: a test of the phase method. *J Forensic Sci.* 31(3): 990-9.
- Jaikrishan G, Andrews VJ, Thampi MV, Koya PK, Rajan VK, Chauhan PS. 1999 Genetic monitoring of the human population from high-level natural radiation areas of Kerala on the southwest coast of India. I prevalence of congenital malformations in newborns. *Radiat. Res.* 152: S149-S153
- Jazin EE, Cavelier L, Eriksson I, Orelund L, Gyllensten U. 1996 Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12382-12387
- Jenuth JP, Peterson AP, Fu K, Shoubridge EA. 1996 Random genetic drift in the germ line explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 14: 146-151
- Kadenbach B, Münscher C, Frank V, Müller-Höcker J, Napiwotzki J. 1995 Human aging is associated with stochastic somatic mutations of mitochondrial DNA. *Mutat. Res.* 338: 161-172

- Kang D, Nishida J, Iyama A, Nakabeppu Y, Furuichi M, Fujiwara T, Sekiguchi M, Takeshige K. 1995 Intracellular localization of 8-oxo-dGTPase in human cells, with special reference to the role of the enzyme in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 270: 14659-14665
- Keyser-Tracqui C, Crubézy E, Ludes B. 2003 Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia. *Am. J. Hum. Genet.* 73: 247-260
- Khrapko K, Bodyak N, Thilly WG, van Orsouw NJ, Zhang X, Coller HA, Perls TT, Upton M, Vijg J, Wei JY. 1999 Cell-by-cell scanning of whole mitochondrial genomes in aged human heart reveals a significant fraction of myocytes with clonally expanded deletions. *Nucleic Acids Research* 27(11):2434-2441
- Kinoshita M, Oikawa S, Hayasaka K, Sekikawa A, Nagashima T, Toyota K, Miyazawa T. 2000 Age-related increases in plasma phosphatidylcholine hydroperoxide concentrations in control subjects and patients with hyper lipidaemia. *Clin. Chem.* 46: 822-828
- Kirkwood TBL. 1977 Evolution of ageing. *Nature* 270: 301-304
- Kirkwood TBL, Holliday R. 1979 The evolution of ageing and longevity. *Proc. R. Lond. B. Biol. Sci.* 205 (1161) 521-546
- Kirkwood TBL, Cremer T. 1982 Cytogerontology since 1881- a reappraisal of August Weissman and a review of modern progress. *Hum. Genet.* 60: 101-121
- Kirkwood TBL. 1985 Comparative and evolutionary aspects of longevity. Eds Finch CE, Schneider EL: Handbook of the biology of aging. 3<sup>ième</sup> édition. Van Nostrand Reinhold, New York pp 45-66
- Kirkwood TBL. 1997 The origins of human ageing. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 352:1765-1772
- Klarsfeld A, Revah F. 2000 Biologie de la mort. Edition Odile Jacob, Paris
- Korch C, Drabkin H. 1999 Improved ADN sequencing accuracy and detection of heterozygous alleles using manganese citrate and different fluorescent dye terminators. *Genome Research* 9:588-595
- Kyger EM, Krevolin MD, Powell MJ. 1998 Detection of the hereditary hemochromatosis gene mutation by real time fluorescence polymerase chain reaction and peptid nucleic acid clamping. *Analytical biochemistry* 260:142-148
- Laganier S, Yu BP. 1993 Modulation of membrane phospholipid fatty acid composition by age and food restriction. *Gerontology* 39: 7-18
- Langping H, Chinnery PF, Durham SE, Blakely EL, Wardell TM, Borthwick GM, Taylor RW, Turnbull DM. 2002 Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30(14): e68

- Larsen NB, Rasmussen M, Rasmussen LJ. 2005 Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways ? *Mitochondrion* 5: 89-108
- Lee HC, Pang CY, Hsu HS, Wei YH. 1994 Ageing associated tandem duplications in the D-Loop of mitochondrial DNA of human muscle. *FEBS Lett.* 354: 79-83
- Lightowers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N. 1997 Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends in Genetics* 13: 450-455
- Lindahl T. 1993 Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715
- Lindahl T, Wood RD. 1999 Quality control by DNA repair. *Science* 286: 1897-1905
- Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. 1989 Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 642-645.
- Liu VWS, Zhang C, Linnane AW, Nagley P. 1997 Quantitative allele-specific PCR: Demonstration of age associated accumulation in human tissues of the A-G mutation at nucleotide 3243 in mitochondrial DNA. *Hum. Mutat.* 9:265-271
- Liu VWS, Zhang C, Nagley P. 1998 Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing. *Nucleic Acids Research* 26(5):1268-1275
- Loeb J, Northrop JH. 1917 On the influence of food and temperature on the duration of life. *J. Biol. Chem.* 32: 103-121
- Lopez-Torrez M, Gredilla R, Sanz A, Barja G. 2002 Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative damage in rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 32 (9) :882-889
- Lovejoy CO. 1985 Chronological metamorphosis of the auricular surface of the ilium : a new method for the determination of adult skeletal age at death. *Am. J. Phys. Anthropol.* 68 : 15-28
- Macaulay V, Richards M, Hickey E, Vega E, Cruciani F, Guida V, Scorrazi R, Bonn -Tamir B, Sykes B, Torroni A. 1999 The emerging tree of west eurasians mtDNAs: a synthesis of control region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 232-249
- Mac Carter R, Mac Gee JR. 1989 Transient reduction of metabolic rate by food restriction. *Am. J. Phys.* E175-E179
- Mac Carter R, Palmer J. 1992 Energy metabolism and aging: a lifelong study in Fischer 344 rats. *Am. J. Phys.* 263: E448-E452
- Mac Cay MC, Crowell MF, Maynard LA. 1935 The effect of retarded growth upon the length of life and the ultimate body size. *J. Nutr.* 10: 63-72

- Maconochie N, Roman E, Doyle P, Davies G, Smith PG, Beral U. 2001 Sex-ratio of nuclear industry employee's children. *Lancet* 357:1589-1591
- Manfredi G, Thyagarajan D, Papadopoulou LC, Pallotti F, Schon EA. 1997 The fate of human sperm-derived mtDNA in somatic cells. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 953-960.
- Marchington DR, Hartshorne GM, Barlow D, Poulton J. 1997 Homopolymeric tract heteroplasmy in mtDNA from tissues and single oocytes: Support for a genetic bottleneck. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 408-416.
- Marchington DR, Macaulay V, Hartshorne GM, Barlow D, Poulton J. 1998 Evidence from human oocytes for a genetic bottleneck in an mtDNA disease. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 769-775.
- Marty R. 1996 Gènes, environnement et vieillesse. *Reproduction Humaine et Hormones IX* : 71-80
- Masoro EJ, Yu BP, Bertrand H. 1982 Action of food restriction in delaying the aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 4239-4241
- Masoro EJ, Mac Carter R. 1991 Aging as a consequence of fuel utilization. *Aging* 3: 117-128
- May-Panloup P, Chretien MF, Malthiery Y, Reynier P. 2004 Mitochondries et reproduction. *Médecine/Sciences* 20: 779-783
- Meccoci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal MF. 1993 Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann. Neurol.* 34: 609-616
- Meccoci P, Fano G, Fulle S, MacGarvey V, Shinobu L, Polidori MC, Cherubini A, Vechhiet J, Senin V, Beal MF. 1999 Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 303-308
- Medawar PB. 1952 An unsolved problem of biology. Edition HK Lewis, London
- Medvedev ZA. 1990 An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 65 (3): 375-398
- Meirelles F, Smith LC. 1997 Mitochondrial genotype segregation in a mouse heteroplasmic lineage produced by embryonic karyoplast transplantation. *Genetics* 145: 445-451
- Meissner C, von Wurmb N, Oehmichen M. 1997 Detection of the age dependent 4977 bp deletion of mitochondrial DNA. *Int. J. Legal Med.* 110:288-291
- Meissner C, von Wurmb N, Schimansky B, Oehmichen M. 1999 Estimation of age at death based on quantitation of the 4977-pb deletion of human mitochondrial DNA in skeletal muscle. *Forensic Sci. Int.* 105: 115-124
- Meissner C, Mohamed SA, Klueter H, von Wurmb N, Oehmichen M. 2000 Quantification of mitochondrial DNA in human blood cells using an automated detection system. *Forensic Sci. Int.* 113:109-112

- Melov S, Hinerfeld D, Esposito L, Wallace DC. 1997 Multi-organ characterization of mitochondrial genomic rearrangements in ad libitum and caloric restricted mice show striking somatic mitochondrial DNA rearrangements with age. *Nucleic Acids Research* 25: 974-982
- Melov S, Coskun PE, Wallace DC. 1999 Mouse models of mitochondrial disease, oxidative stress, and senescence. *Mutat. Res.* 434: 233-247
- Merker K, Stolzing A, Grune T. 2001 Proteolysis, caloric restriction and aging. *Mech. Ageing Dev.* 122: 595-615
- Metchnikoff E. 1903 Etudes sur la nature humaine. Masson et Cie Edition, Paris
- Michikawa Y, Hofhaus G, Lerman LS, Attardi G. 1997 Comprehensive, rapid and sensitive detection of sequence variants of human mitochondrial tRNA genes. *Nucleic Acids Research* 25 (12) : 2455-2463.
- Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. 1999 Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* 286 : 774-779
- Michikawa Y, Laderman KA, Richter K, Attardi G. 2002 Role of nuclear background and in vivo environment in variable segregation behavior of the aging-dependent T414G mutation at critical control site for human fibroblast mtDNA replication. *Somat. Cell. Mol. Genet.* 25: 333-342
- Miyazawa T, Suzuki T, Fujimoto K, Kinoshita M. 1996 Age-related change of phosphatidylcholine hydroperoxide and phosphatidylethanolamine hydroperoxide levels in normal human red blood cells. *Mech. Ageing Dev.* 86: 145-150
- Münscher C, Rieger T, Müller-Höcker J, Kadenbach B. 1993 The point mutation of mitochondrial DNA characteristic for MERRF disease is found also in healthy people of different ages. *FEBS Lett.* 317: 27-30
- Murdock DG, Christacos NC, Wallace DC. 2000 The age-related accumulation of mitochondrial DNA control region mutation in muscle, but no brain, detected by a sensitive PNA-directed PCR clamping based method. *Nucleic Acids Research* 28 (21): 4350-4355
- Murdock DG, Wallace DC. 2002 PNA-mediated PCR clamping. *Methods in Molecular biology* 208:145-164. Human Press edited by Nielsen PE.
- Nagley P, Wei YH. 1998 Ageing and mammalian mitochondrial genetics. *Trends in Genetics* 14 (12): 513-517



- Nekhaeva E, Bodyak ND, Kravtsov Y, McGrath SB, Van Orsouw NJ, Pluzhnikov A, Wei JY, Vijg JY, Khrapko K. 2002 Clonally expanded mtDNA mutations are abundant in individual cells of human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(8):5521-5526
- Nielsen PE, Elghom M, Buchardt O 1994 Peptide nucleic acid (PNA), a DNA mimic with a peptide backbone. *Bioconjugate Chem.* 5:3-7
- Nomiyama T, Tanaka Y, Hattori N, Nishimaki K, Nagasaka K, Kawamori R, Ohta S. 2002 Accumulation of somatic mutation in mitochondrial DNA extracted from peripheral blood cells in diabetic patients. *Diabetologia* 45: 1577-1583.
- Oliver CA, Ahn B, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. 1987 Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* 262: 5488-5491
- Orgel LE. 1963 The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 49: 517-521
- Ørum H, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, Stanley C. 1993 Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Research* 21 (23): 5332-5336
- Ørum H. 2000 PCR clamping. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2 (1): 27-30
- Pahipa SS, Rathod H, Briceno I, Pooley J, Datta HK. 1998 Age related somatic mitochondrial DNA deletions in bone. *J. Clin. Pathol.* 51 (2) : 117-120.
- Palloti F, Chen X, Bonilla E, Schon EA. 1996 Evidence that specific mtDNA point mutations may not accumulate in skeletal muscle during normal human aging. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 591-602.
- Parker LT, Zakeri H, Deng Q, Spurgeon S, Kwok PY, Nickerson DA. 1996 AmpliTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase, FS Dye-Terminator sequencing: analysis of peak height patterns. *Biotechniques* 21: 694-9
- Patnaik BK, Mahapatro N, Jena BS. 1994 Aging in fishes. *Gerontology* 40: 113-132
- Patnaik BK. 1994 Aging in reptiles. *Gerontology* 40: 200-220
- Pearl R. 1928 The rate of aging. Edition Knopf, New York
- Pesce V, Cormio A, Fracasso F, Vecchiet J, Felzani G, Lezza AMS, Cantatore P, Gadaleta MN. 2001 Age-related mitochondrial genotypic and phenotypic alterations in human skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 1223-1233
- Piko L, Hougham AJ, Bulpitt KJ. 1988 Studies of sequence heterogeneity of mitochondrial DNA from rat and mouse tissues: evidence for an increased frequency of deletions/additions with aging. *Mechanisms of ageing and development* 43:279-293
- Pinz KG, Bogenhagen DF. 1998 Efficient repair of abasic sites in DNA by mitochondrial enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 18: 1257-1265

- Poitras E, Houde A. 2002 La PCR en temps réel: principes et applications; *Reviews in biology and biotechnology* 2(2):2-11
- Poulton J, Macaulay V, Marchington DR. 1998 Is the bottleneck cracked? *Am. J. Hum. Genet.* 62: 752-757.
- Radicella JP, Dherin C, Desmaze C, Fox MS, Boiteux S. 1997 Cloning and characterization of *hOGG1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8010-8015
- Raha S, Robinson BH. 2000 Mitochondria, oxygen free radicals, diseases and ageing. *Trends Biochem. Sci.* 25: 502-508
- Riancho JA, Zarrabeitia MT, Amado JA, Olmos JM, Gonzales-Macias J. 1994 Age-related differences in cytokine secretion. *Gerontology* 40: 8-12
- Richter C, Park JW, Ames BN. 1988 Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6465-6467
- Robert L. 1996 Les horloges biologiques. Champs, Flammarion, Paris
- Rosenblum BB, Lee LG, Spurgeon SL, Khan SH, Menchen SM, Heiner CR, Chen SM. 1997 New dye labelled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Research* 25(22):4500-4504
- Rosenthal A, Charnock-Jones DS. 1992 New protocols for DNA sequencing with dye terminators. *DNA Seq* 3:61-4.
- Rubner M. 1908 Das problem der lebensdauer und seine beziehungen zum wachstum und ernahrung. Oldenburg, Munich : 150-204
- Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC. 2004 Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 303: 223-226
- Sacher GA. 1977 Life table modification and life prolongation. Handbook of the biology of aging: Van Nostrand Reinhold. Edition Finch C, Hayflick L. pp 582-638
- Scheuer L, Black S. 2000 Developmental Juvenile Osteology. Academic Press, San Diego
- Schwartz D. 1986 Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Flammarion Médecine-Sciences, Paris
- Seeberg E, Luna L, Morland L, Eide L, Johnson B, Larsen E, Alseth I, Dantzer F, Baynton K, Aamodt R, Kristiansen KI, Rognes T, Klungland A, Bjoraas M. 2000 Base remover and strand scissors: different strategies employed in base excision and strand incision at modified base residues in DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 65: 135-142

- Servidei S. 2002 Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. *Neuromuscul. Disord.* 12: 524 - 529
- Shi C, Eshleman SH, Jones D, Fukushima N, Hua L, Parker AR, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins MG, Eshleman HR. 2004 LigAmp for sensitive detection of single nucleotide differences. *Nat. Methods* 1:141-147
- Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. 1991 Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349: 331-342
- Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. 1990 Myoclonic epilepsy and ragged-red fibers disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Lys</sup> mutation. *Cell* 61: 931-937
- Shoji M, Okada M, Ohta A, Higuchi K, Hosowaka M, Honda Y. 1998 A morphological and morphometrical study of the retina in aging SAM mice. *Senescence-Accelerated Mouse* 30: 172-179
- Sies H. 1997 Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82: 291-295
- Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR. 1991 Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10540-10543
- Sohal RS, Dubey A. 1994 Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. *Free Radical Biol. Med.* 16: 621-626
- Soong NW, Hinton DR, Cortopassi G, Arnheim N. 1992 Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain. *Nat. Genet.* 2(4): 318-323.
- Souza-Pinto NC, Croteau DL, Hudson EK, Hansford RG, Bohr VA. 1999 Age-associated increase in 8-oxodeoxyguanosine glycosylase/AP lyase activity in rat mitochondria. *Nucleic Acids Research* 27: 1935-1942
- Souza-Pinto N, Eide L, Hogue B, Thybo T, Stevnsner T, Seeberg E, Klungland A, Bohr A. 2001a Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial DNA depends on the oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial DNA of OGG1-defective mice. *Cancer Res.* 61: 5378-5381
- Souza-Pinto NC, Hogue BA, Bohr VA. 2001b DNA repair and aging in mouse liver: 8-oxodG glycosylase activity increase in mitochondrial but not in nuclear extracts. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 916-923
- Stadtman ER. 1992 Protein oxidation and aging. *Science* 257: 1220-1224
- Starke-Reed PE, Oliver CN. 1989 Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 275: 559-567

- Steenken S. 1989 Purine bases, nucleosides and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and electrons and OH adducts. *Chem. Rev.* 89: 503-520
- Stierum RH, Croteau DL, Bohr VA. 1999 Purification and characterization of a mitochondrial thymine glycol endonuclease from rat liver. *J. Biol. Chem.* 274: 7128-7136
- Stoneking M. 2000 Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. *Am. J. Hum. Genet.* 67:1029-1030
- Strehler B. 1962 Time, Cells and Aging. 2<sup>nd</sup> édition Acad. Press, San Diego, Londres 1977
- Strehler B. 1986 Genetic instability as the primary cause of human aging. *Exp. Gerontol.* 21: 283-319
- Susin SS, Lorenzo HK, Zamzani N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. 1999 Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446
- Takao M, Zhang QM, Yonei S, Yasui A. 1999 Differential subcellular localization of human MutY homolog (hMYH) and the functional activity of adenine: 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Nucleic Acid Research* 27: 3638-3644
- Takeda K, Takahashi S, Onishi A, Hanada H, Imai H. 2000 Replicative advantage and tissue specific segregation of RR mitochondrial DNA between C57BL/6 and RR heteroplasmic mice. *Genetics* 155: 777-783
- Tengan CH, Ferreira-Barros C, Cardeal M, Fireman MAT, Oliveira ASB, Kiyomoto BH, Gabbai AA. 2002 Frequency of duplications in the D-Loop in patients with mitochondrial DNA deletions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1588:65-70
- Thayer RE, Wittcock R, Parr R, Zullo S, Birch-Machin MA. 2003 A maternal line study investigating the 4977 bp mitochondrial DNA deletion. *Experimental Gerontology* 38:567-571
- Thoman ML, Weigle WO. 1989 The cellular and subcellular bases of immunosenescence. *Adv. Immunol.* 46: 221-261
- Tomkinson AE, Bonk RT, Linn S. 1988 Mitochondrial endonuclease activities specific for apurinic/aprimidic sites in DNA from mouse cells. *J. Biol. Chem.* 263: 12532-12537
- Tsuzuki T, Nomiyama H, Setoyama C, Maeda S, Shimada K. 1983 Presence of mitochondrial-DNA-like sequences in the human nuclear DNA. *Gene* 25: 223-229

- Tully G, Bär W, Brinkmann B, Carracedo A, Gill P, Morling N, Parson W, Schneider P. 2001 Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Sci. Int.* 124: 83-91
- Tully LA, Parsons TJ, Steighner RJ, Holland MM, Marino MA, Prenger VL. 2000 A sensitive Denaturing Gradient-Gel Electrophoresis assay reveals a high frequency in hypervariable region 1 of the Human mtDNA control region. *Am. J. Hum. Genet.* 67:432-43.
- Veron J. 2002 Les mathématiques de la population, de Lambert à Lotka. *Math. Sci. Hum.* 159: 43-56
- Vijg J, Dolle ME, Martus HJ, Boerrigter ME. 1997 Transgenic mouse models for studying mutations in vivo: applications in aging research. *Mech. Ageing Dev.* 99: 257-271
- Wagner JR, Hu C, Ames BN. 1992 Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3380-3384
- Wallace DC. 1982 Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiol. Rev.* 46: 208-240.
- Wallace DC, Ye JH, Neckelmann SN, Singh G, Webster KA, Greenberg BD. 1987 Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Current Genet.* 12: 81-90
- Wallace DC, Shoffner JM, Watts RL, Juncos JL, Torroni A. 1992 Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 32: 113-114.
- Wallace DC. 1992 Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 256: 628-632
- Wallace DC. 1993 Mitochondrial diseases: genotype versus phenotype. *Trends in Genetics* 9: 128-133.
- Wallace DC. 1994a Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91:8739-8746
- Wallace DC. 1994b Mitochondrial DNA mutations in diseases of energy metabolism. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26: 241-250.
- Wallace DC, Lott MT, Shoffner JM, Ballinger S. 1994 Mitochondrial DNA mutations in epilepsy and neurological disease. *Epilepsia* 35 S1: S43-S50
- Wallace DC. 1995 Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8739-8746.
- Wallace DC. 1997 Mitochondrial DNA mutations and bioenergetic defects in aging and degenerative diseases. In: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL (eds) *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*. Butterworth-Heinemann, Boston pp 237-269.

- Wallace DC, Brown MD, Lott MT. 1997 Mitochondrial genetics. In: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Emery AEH (eds) Emory and Rimoin's Principles and practice of medical genetics. Churchill Livingstone, London pp 277-332.
- Wallace DC. 1999 Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1488
- Wallace DC. 2005 The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: on the road to therapeutics and performance enhancement. *Gene* 354: 169-180
- Wallace SS. 1998 Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiat. Res.* 150:S60-S79
- Wang E, Wong A, Cortopassi G. 1997 The rate of mitochondrial mutagenesis is faster in mice than in humans. *Mutat. Res.* 377: 157-166
- Wang Y, Michikawa Y, Mallidis C, Bai Y, Woodhouse L, Yarasheski KE, Miller CA, Askanas V, Engel WK, Bhasin S, Attardi G. 2001 Muscle-specific mutations with aging in critical human mtDNA control sites for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (7) : 4022-4027
- Ward JF. 1988 DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Vol 35: 95-125
- Wei YH, Pang CY, You BJ, Lee HC. 1996 Tandem duplications and large scale deletions of mitochondrial DNA are early molecular events of human aging process. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 789: 82 – 101
- Wei YH, Lee HC. 2002 Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp. Biol. Med.* 227 : 671-682
- Weismann A. 1892 1881 : La durée de la vie et 1883 : La vie et la mort. Traduction française dans: Essais sur l'hérédité et la sélection naturelle. C Reinwald et Cie. libraires-éditeurs, Paris
- Wilhem J, Pingoud A. 2003 Real-Time polymerase chain reaction. *Chem. Bio. Chem.* 4: 1120-1128
- Williams GC. 1957 Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11: 398-411
- Wilson MR, Polansky D, Replogle J, Di Zinno JA, Budowle B. 1997 A family exhibiting heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region reveals both somatic mosaicism and pronounced segregation of mitotypes. *Hum. Genet.* 100:167-171
- Wilson SH, Kunkel TA. 2000 Passing the baton excision repair. *Nat. Struct. Biol.* 7: 176-178
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP 1997 Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22:130-138
- von Wurmb N, Oehmichen M, Meissner C. 1998 Demonstration of the 4977 bp deletion in human mitochondrial DNA from intravital and postmortem blood. *Mutation research* 422:247-254

- von Wurmb-Schwark N, Higuchi R, Fenech AP, Elfstroem C, Meisner C, Oehmichen M, Cortopassi GA. 2002 Quantification of human mitochondrial DNA in a real time PCR. *Forensic Sci. Int.* 126:34-39
- Yen TC, Pang CY, Hsieh RH, Su CH, King KL, Wei YH. 1992 Age-dependent 6kb deletion in human liver mitochondrial DNA. *Biochem. Int.* 26: 457-468
- Zakeri H, Amparo G, Chen SM, Spurgeon S, Kwok PY. 1998 Peak height pattern in dichloro-rhodamine and energy transfer dye terminator sequencing. *Biotechniques* 25:406-414
- Zeviani M, Servidei S, Gellera C, Bertini E, DiMauro S, DiDonato S. 1989 An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-Loop region. *Nature* 339: 309-311
- Zhang B, Baumer A, Maxwell RJ, Linnane AW, Nagley P. 1992 Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individuals. *FEBS Lett.* 297: 34-38
- Zhang B, Sayer S, Hammans SR, Adio S, Hinks LJ, Smythe PJ, Groot D, Cooper C, Day INM. 2003 A study of mitochondrial DNA mutations in peripheral lymphocytes in a aging cohort. *Biochemical Society Transactions* 31(2) :444-446
- Zhang C, Linnane AW, Nagley P. 1993 Occurrence of a particular base substitution (3243 A to G) in mitochondrial DNA of tissues of ageing humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 195(2): 1104-1110.
- Zhang J, Asin-Cayuela J, Fish J, Michikawa Y, Bonafé M, Olivieri F, Passarino G, De Benedictis G, Franceschi C, Attardi G. 2003 Strikingly higher frequency in centenarians and twins of mtDNA mutation causing remodeling of replication origin in leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(3): 116-1121
- von Zglinicki T, Marzabadi MR, Roomans GM. 1991 Water and ion distributions in myocytes cultured under oxidative stress mimic changes found in the process of aging. *Mech. Ageing. Dev.* 58: 49-60

# ANNEXES



### Annexe 1 : liste des prélèvements biologiques analysés

Le premier chiffre identifie l'âge, x ou y le sexe féminin ou masculin, le deuxième chiffre correspond au nombre d'individus représentés dans le même âge.

#### tissu musculaire

code/âge	classes	n		n		n		
1Y	<20	5	40x	41-50	16	70y	>70	9
13y			41y1			71x		
14y			42y1			74x		
16x			42y2			77y1		
19y			42x			77y2		
			43x			77x		
21y1	21-30	12	43y			79y		
21y2			44x1			87x		
21y3			44x2			97x		
22x			45x					
22y			45y				total	75
23y1			47y					
23y2			48y1	Pas ADN				
25x			48y2					
25y			48y3					
26y			49y					
27y								
29x			50y1	51-60	10			
			50y2					
30x	31-40	18	51y					
30y			52x					
31y1			52y					
31y2			54y1					
32y			54y2					
33y			56y					
34y			58y					
35y			59x					
36x								
36y1			62y	61-70	5			
36y2			63x					
37y1			64y					
37y2			68x1					
37x			68x2					
38y1								
38y2								
39x1								
39x2								

### Annexe 1 : liste des prélèvements biologiques analysés

C : cellules buccales. Les traits gris séparent les individus n'appartenant pas à la même lignée maternelle.

Un double prélèvement musculaire et buccal sur : 70y et c70y ; 63x et c63x.

#### cellules buccales

code/age	famille	n	code/age	famille	n
c35x	1	5	c90x	6	4
c37x			c62x		
c60x			c41x		
c4x			c7x		
c85x					
			c80x2		1
c30x		2			
c52x			c35x2	7	2
			c68x		
c21x	2	3			
c49x			c63x		1
c73x					
			c31y		1
c60x2		1			
			c41y		1
c77x		1			
			c58y		1
c79x	3	3			
c49x			c35x3	8	2
c15x			c63x2		
c80x	4	3	c74x	9	2
c51x			c41x		
c27x					
			c50y	10	2
c70y		1	c72x		
c44x	5	2	c64x		1
c69x					
			<b>total</b>		<b>39</b>

## Annexe 1 : liste des prélèvements biologiques analysés

O : os ; YAK : Yakoutes.

### tissu osseux

os modernes

os anciens

code/âge	n	code	nom	
O 21Y	4	YAK32 (âgé)	SRT 2	
O 22X		YAK20 (âgé)	no 11	
O 23 Y		YAK31 (adulte)	AE 2	
O 26X		YAK22 (grand enfant)	12	pas ADN
O 31X	14	<b>total</b>		<b>4</b>
O 32Y				
O 33X				
O 34Y				
O 35Y				
O 37X				
O 38Y				
O 39Y				
O 41Y				
O 44Y				
O 46Y				
O 48Y				
O 48Y2				
O 51Y				
O 60Y	8			
O 62Y				
O 71X1				
O 71X2				
O 71X3				
O 81Y				
O 105X				
O X2	pas ADN			
<b>total</b>	<b>26</b>			

## **Annexe 2 : protocole pour l'obtention de clones M et WT pour chaque mutation**

Les segments sont amplifiés par PCR avec les amorces correspondantes.

Dans un volume réactionnel final de 50 µl sont additionnés 2 µl d'ADNmt, 0.6 µl de chaque amorce (40 µM), 1 µl de dNTP (10 mM), 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 5 µl de tampon 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4) 500mM KCl) et 0.2 µl de Taq DNA Polymerase ( 5U/µl).

Les cycles de PCR, après recherche des conditions optimales dans les températures d'hybridation par rapport au T<sub>m</sub> des amorces, sont établis :

Une étape initiale de dénaturation de 1 minute à 94°C suivit de 35 cycles incluant une étape dénaturation de 15 secondes à 94°C, une étape d'hybridation de 30 secondes à 55°C pour la position 189 et à 50°C pour les positions 408 et 414, une étape d'élongation de 45 secondes à 72°C et se termine par une élongation finale de 2 minutes à 72°C.

Une migration sur gel d'agarose Low Melting Point à 0.7% permet l'excision des bandes de produits de PCR sur le gel.

L'extraction de l'ADN à partir du gel se fait avec le Kit QIAquick gel extraction (QIAGEN).

Pour 100 mg d'agarose, ajouter 300 µl de tampon QG et incuber 10 min à 50°C (si la couleur vire à l' orange ou violet : ajouter 5 µl d'Acétate de Sodium 3M pH 5).

Ajouter 100 µl d'Isopropanol à 100%.

Transférer dans la colonne QIAquick et centrifuger 12000 g pendant 1 minute.

Laver la colonne avec 750 µl de tampon PE

Centrifuger à 12000 g pendant 1 minute. S'assurer que la colonne est bien sèche.

Placer la colonne sur un eppendorf propre et éluer l'ADN avec 50 µl de tampon EB ou H<sub>2</sub>O.

Centrifuger à 12000g pendant 1 minute.

Le culot est repris dans 50 µl H<sub>2</sub>O ultra-pure.

Le pGEM-T Easy Vector System ( Promega) est utilisé pour la ligation des produits de PCR dans le vecteur.

Pour optimiser l'insertion nous calculons la quantité appropriée de produits de PCR (insert) à inclure dans la réaction de ligation suivant un ratio de 3 inserts / 1 vecteur avec la formule :

$$\frac{\text{ng de vecteur} \times \text{kb en taille de l'insert}}{\text{kb en taille du vecteur}} \times 3/1 = \text{ng d'insert}$$

Le segment de 97 pb nécessitera l'addition de 4,85 ng de produits de PCR et celui de 140 pb, 7 ng.

Le vecteur pGEM-T Easy est linéarisé par digestion avec Eco RV, la réaction de ligation s'effectue dans un volume final de 10 µl contenant 5 µl de tampon de ligation (60 mM Tris-

HCl, pH 7.8, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM DTT ; 2 mM ATP, 10% PEG), 1 µl de pGEM-T Easy (50 ng), 1 µl de T4 DNA Ligase (3 U/µl) et 3 µl de produits de PCR.

La réaction est mélangée par pipetage et incubée à 4°C pendant 16 heures.

Pendant l'incubation nous préparons les milieux de culture liquide et solide pour les bactéries qui seront transformées : Le milieu LB liquide contient 10g/l de NaCl, 5 g/l de Yeast Extract et 10 g/l de Bactotryptone. Il est ensuite stérilisé.

Les boîtes de culture où seront déposées les bactéries contiendront 50 ml de LB et Agar (15 g/l) et 50 µl d'Ampicilline (50 mg/ml) qui est un antibiotique permettant la sélection des bactéries recombinantes. Le bacto-Agar purifié est préparé spécialement pour l'utilisation de milieu de culture biologique par un processus dans lequel les matières non-essentiels, les portions pigmentées et les sels sont réduits au minimum.

Toutes les manipulations avec les milieux se feront autour d'un bec benzène afin de maintenir un champ stérile.

Les bactéries compétentes DH 5α sont transformées avec les produits de ligation suivant ce protocole : Les cellules compétentes sont diluées au 1/10 avec 0,1 M de CaCl<sub>2</sub> froid.

10 µl de produits de ligation sont déposés dans un eppendorf et chauffés 2 minutes à 70°C puis placés sur la glace rapidement pour stopper toute activité enzymatique de la T4 DNA Ligase. Ajouter 50 µl de cellules compétentes diluées précédemment et mélanger doucement.

Incuber 30 minutes dans la glace puis incuber 2 minutes à 37°C.

Incuber dans la glace le temps d'étaler la totalité de l'échantillon (55 µl) sur la boîte de culture (LB Agar et Ampicilline) à l'aide d'une pipette pasteur.

Placer les boîtes pendant 16 heures dans une étuve à 37°C.

Le lendemain, les colonies sur boîte sont sélectionnées et prélevées. Nous faisons une vérification des clones positifs, c'est à dire contenant le vecteur et le fragment d'intérêt, par un criblage par PCR avec les amorces spécifiques ayant servi à cloner les séquences :

Chaque colonie prélevée est remise en culture dans 2 ml de milieu LB et Ampicilline (50 mg/ml) pendant 3 heures dans une étuve à 37°C et continuellement agitée.

Un aliquot de 500 µl est ajouté à 500 µl de glycérol 100% et stocké à -20°C.

Un eppendorf contenant 1 ml de milieu est stocké à -20°C en vue d'un séquençage ultérieur.

Enfin, 500 µl est centrifugé à 6500 rpm pendant 1 minute.

Le surnageant est ôté et le culot de bactéries est suspendu dans 50 µl d'eau ultra-pure, vortexé et mis à bouillir 10 minutes.

Centrifuger à 6500 rpm pendant 1 minute et prélever 20 µl pour la PCR. Préparation des échantillons pour les PCR : 20 µl d'ADN ; 1 µl de dNTPs ; 5 µl de tampon 10X ; 1,5 µl de

MgCl<sub>2</sub> (50 mM) ; 0,6 µl d'amorces chacune ( suivant les clones construits, utiliser les amorces correspondantes). Les cycles d'amplification sont identiques.

Les produits de PCR sont soumis à une électrophorèse dans un gel d'agarose à 2% et visualisé sous lumière UV. Les bandes présentes les plus intenses permettent de sélectionner les clones qui seront soumis au séquençage pour une vérification de correspondance à la séquence attendue.

Avec le millilitre de milieu bactérien préalablement stocké de chaque clone M ou WT choisi, une Maxi-Prep est effectué à l'aide du Kit QIAfilter Plasmid Maxi Protocol (Qiagen) afin d'extraire l'ADN suivant ce protocole :

1 ml de culture sont ajoutés dans 50 ml de LB + Ampicilline dans une étuve à 37°C pendant 16 heures.

Le milieu est centrifugé à 6000 g pendant 15 minutes à 4°C. Jeter le surnageant.

Suspendre le culot dans 10 ml de P<sub>1</sub> (tampon de resuspension + Rnase A).

Ajouter 10 ml de P<sub>2</sub> (tampon de lyse), mélanger doucement par inversion des tubes 5 minutes.

Rajouter 10 ml P<sub>3</sub> (tampon de neutralisation), mélanger immédiatement et doucement.

Mettre directement sur la cartouche, 10 minutes.

Equilibrer les Tips avec 10 ml de tampon QBT (tampon d'équilibration) et laisser couler par gravité.

Déposer le lysat sur les Tips avec la cartouche et le piston, laisser couler par gravité.

Rincer 2 fois avec 30 ml de tampon QC (tampon de lavage).

Eluer l'ADN dans des tubes Corex stériles avec 15 ml de tampon QF (tampon d'élution).

Rajouter 10,5 ml d'Isopropanol 100 %, mélanger.

Centrifuger à 15000 g pendant 30 minutes à 4°C.

Jeter le surnageant.

Le culot d'ADN est lavé à l'éthanol à 70 %, dans 2 ml.

Centrifuger 15000 g pendant 10 minutes.

Jeter l'éthanol, le culot d'ADN est repris dans un volume de 50 µl, l'ADN génomique de la bactérie a été éliminé, il ne reste que celui du vecteur contenant l'ADN d'intérêt. Les vecteurs peuvent être soumis au séquençage : les amorces utilisées par le service de séquençage correspondent à deux séquences encadrant l'insert présentes initialement sur le vecteur pGEM-T Easy et appelées T7 et SP6.







HVII			1 1 1 1	1 1 1 1 1	1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3			
MUSCLE			7 7 4 5 5 5	8 8 8 8 9	9 9 0 0 2 3 4 5 5 5 6 7 8 9 9 0 0 1 1 2 2 5			
début			2 3 6 0 1 2	2 5 8 9 5	8 9 0 4 8 9 7 0 2 7 3 1 0 5 7 9 9 0 5 0 4 7	Fin		
échantillon	date PCR	séquence	T A T C C T	C G A A T	C T A T G T G T T A A C C C A	1 2 T 1 T C A	séquence	
54y2	08.07.05	67	G			G	C C	391
56y	10.04/07.05	60			C	G	C C	316
58y	10,05/07.05	53	C			G	C C	531
59x	10.06/07.05	54	Y			G	C	531
62y	10,02,04	48	Y		R	G	C	406
63x	12,06,03	34	Y				C	379
64y	10.04/07.05	42			T C	G	C	518
68x	24,06,03	33	G			G	C C	402
68x2*	11,10,04	134			C	G	C C	541
70y	16.06.03	37	G			G	G C C	399
71x	10.04/07.05	69	G			G	C A T C	524
74x	11,10,04	134				G	C	541
77y1	11,10,04	141				G	C	530
77y2*	10.04/07.05	94				G	C	530
77x	16,06,03	51	G			G	A T C C	416
79y	10,02,04	50	G			G	C C	402
87x	08.07.05	80			T	G	C C	431
97x	11,10,04	134				G	C C C	316

L'échantillon 13y est utilisé comme contrôle WT pour les 3 positions 189, 408 et 414 ; L'échantillon 44x1 comme contrôle M pour la position 189. Les échantillons avec un astérisque\*, sont polymorphes sur la région d'hybridation des sondes, entre les positions **182** et **195** pour la sonde PNA, 182 et 198 pour la sonde digoxigénine. Les cases grisées avec une lettre soulignent ces polymorphismes autour de la région 189.

Les autres cases grisées avec un R : une hétéroplasmie incluant les deux nucléotides A et G ; Y : une hétéroplasmie incluant les deux nucléotides C et T.

HVII			1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3			
buccal			7 7 4 5 5 5	8 8 8 8 8 9	0 0 1 2 6 6 8 9 9 0 0 1 1 2 2			
échantillon	date PCR	début séquence	2 3 6 0 1 2	2 4 5 8 9 5	0 4 5 8 2 3 0 3 5 9 9 0 5 0 3	Fin séquence		
			T A T C C T	C G G A A T	A T A G C A C T C	1 2 T 1 T T		
c35x	13.05.03	63	C			G	C	387
c37x	13.05.03	50	C			G	C	350
c60x	13.05.03	57	C			G	C	361
c4x	13.05.03	61	C			G	C	386
c85x	13.05.03	85	C			G	C	386
c30x*	13.05.03	68	G C		G	T G	C C	385
c52x*	13.05.03	64	G C		G	T G	C C	381
c21x	13.05.03	65				G	C C C	388
c49x	04.06.03	33				G	C C C	405
c73x	04.06.03	33				G	C C C	432
c60x2*	20.05.03	33	G	A G	A G	T	C	401
c77x	20.05.03	34	G T		A G	C	C	408
c79x*	20.05.03	34	G	A G	A G	T	C	401
c49x*	20.05.03	46	G	A G	A G	T	C	407
c15x*	20.05.03	39	G	A G	A G	T	C	406
c80x	20.05.03	33				G	C	401
c51x	20.05.03	33				G	C	401
c27x	20.05.03	33				G	C	401
c70y	04.06.03	34	G		G G	C	C	401
c44x*	04.06.03	32	G	A G	A G	T C	C	402
c69x*	04.06.03	33	G	A G	A G	T C	C	394
c90x*	04.06.03	10	G			G	C C	402
c62x*	04.06.03	33	G			G	C C	403
c41x*	12.06.03	33	G			G	C C	404
c7x*	12.06.03	33	G			G	C C	404

HVII buccal échantillon	date PCR	début séquence	1 1 1 1	1 1 1 1 1 1	2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3	Fin séquence	
			7 7 4 5 5 5	8 8 8 8 8 9	0 0 1 2 6 6 8 9 9 0 0 1 1 2 2		
			2 3 6 0 1 2	2 4 5 8 9 5	0 4 5 8 2 3 0 3 5 9 9 0 5 0 3		
			T A T C C T	C G G A A T	A T A G C A C T C 1 2 T 1 T T		
c80x2	12.06.03	50			G	C	404
c35x2	12.06.03	40	G C		G	C	401
c68x	12.06.03	50	G C		G	C	404
c63x	12.06.03	50				C	404
c31y	12.06.03	50	G		G	C C	402
c41y	12.06.03	33			G	C	388
c58y*	12.06.03	46	G		G	C C C	402
c35x3*	12.06.03	33	G	T A	A	T C	401
c63x2*	12.06.03	34	G	T A	A	T C	401
c74x	12.06.03	33			G C	C	401
c41x	12.06.03	34			G C	C	398
c50y	12.06.03	33			G	C	401
c72x	24.06.03	33			G	C	401
c64x	24.06.03	33	G C		G	C	401

HVII OS Modernes échantillons	date PCR	début séquence	1 1 1			1 1 1 1				1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3												Fin séquence					
			6 4	7 2	7 3	4 6	5 0	5 2	8 5	8 9	9 4	9 5	9 8	9 9	0 0	0 4	1 7	2 8	2 9	2 3	2 5		3 9	3 9	3 5		
			T	T	A	T	C	T	G	A	C	T	C	T	A	T	T	G	del	A	C	1	2	1			
c theves		50				<b>C</b>														<b>G</b>					<b>C</b>	356	
b martinez		38																		<b>G</b>					<b>C</b>	388	
n telmon		53							<b>G</b>											<b>G</b>					<b>C</b>	315	
O 21Y	20.09.05	8																								229	
O 22X	20.09/18.10/26.10	74			G										C											197	
O 23 Y	27.06.05	39			G	C														G					C	429	
O 26X	20.09.05	61																								349	
O 31X *	20.09/18.10/26.10	56			G		T					<b>C</b>														219	
O 32Y	20.09.05	46																								232	
O 33X	20.09/18.10	20			G																					271	
O 34Y	08.07.05	82																		G					C	351	
O 35Y*	08.07/18.10/26.10	65					C	T				<b>C</b>	<b>T</b>							G					C	173	
O 37X	08.07.05	94																		G		C			C	326	
O 38Y	20.09/18.10	8																								104	
O 39Y	20.09.05	50					C																			221	
O 41Y	pas ADN																										
O 44Y	20.09/18.10/26.10	64			G									C												219	
O 46Y	pas ADN																										
O 48Y	08.07.05	85																		G					C	325	
O 48Y2	20.09.05	58	T																							215	
O 51Y	08.07.05	84																		G					C	342	
O 60Y	04.06.03	48			G	C														G		C			C	402	
O 62Y (oy2) *	20.09.05	64		C								<b>T</b>														220	

HVII				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3		
OS Modernes échantillons	date PCR	début séquence	6	7	7	4	5	5	8	8	9	9	9	9	0	0	1	2	4	6	9	0	0	1
			4	2	3	6	0	2	5	9	4	5	8	9	0	4	7	8	9	3	5	9	9	5
			T	T	A	T	C	T	G	A	C	T	C	T	A	T	T	G	del	A	C	,	,	,
O 71X (a)	08.07/18.10/26.10	46			G													C	A	G	T	C	C	385
O 71X (b)	20.09.05	66																						215
O 71X3 *	20.09.05	46			G				A					C					A					240
O 81Y *	20.09./18.10/26.10	53			G		T					C												219
O 105X	20.09/18.10/26.10	66			R																			214
O X2	pas ADN																							

OS Anciens																								
YAK32 (âgé)	18.10/26.10	76																						200
YAK20 (âgé)	18.10/26.10	86																						248
YAK31	20.09/18.10/26.10	77																						202
YAK22	pas ADN																							
13Y (muscle)	10.02.04	contrôle WT			G															G			C	
44X (muscle)	10.02.04	contrôle M			G				G					G						G		C	C	



HVIII			3	3	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5
MUSCLE			7	7	4	5	6	7	8	8	9	1	2	2	7	7
			2	3	4	6	2	7	2	9	7	3	2	3	3	3
échantillon	date PCR	début séquence	T	A	A	C	C	T	T	T	C	G	A	C	.	.
																Fin séquence
13y	10.02.04	398														616
14y	9.11.04	133														531
16x	9.11.04	134														531
19y	11.10.04	134														530
21y1	26.10.04-1	139														538
21y2	26.10.04-2	141														531
21y3	17.02.05	141														541
22x	26.10.04-1	139														532
22y1	26.10.04-1	140														528
23y1	26.10.04-1	140														538
25x	26.10.04-1	140														534
25y	26.10.04-1	141														499
26y	9.11.04	134														531
27y	26.10.04-2	139														437
29x	24.06.03	391														615
30y	17.02.05	142														522
30x	26.10.04-1	139														538
31y1	26.10.04-1	141														528
32y	9.11.04	133														512
33y	20.10.04	141														431
34y1	20.10.04	140														431
35y	10.02.04	398														609
36x	26.10.04-2	140														541
36y1	26.10.04-1	139														537
36y2	16.11.04	142														532
37x	26.10.04-2	141														541
37y1	26.10.04-2	140														463
37y2	9.11.04/26.10.04-1	139														531
38Y1	26.10.04-1	140														534
38y2	10.02.04	398														609
39x1	26.10.04-2	141														532
39x2	26.10.04-2	140														531
41y1	20.10.04	141														431
42x	20.10.04	137														431
42y1	10.02.04	398														602
43x	15.10.04	136														530
43y	15.10.04	137														530
44x1	10.02.04	398														614
44x2	10.02.04	398														614
45y	15.10.04	137														530
45x	20.10.04	141														431
47y	15.10.04	134														530

HVIII			3	3	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	Fin séquence
MUSCLE			7	7	4	5	6	7	8	8	9	1	2	2	7	7	
échantillon	date PCR	début séquence	2	3	4	6	2	7	2	9	7	3	2	3	3	3	
			T	A	A	C	C	T	T	T	C	G	A	C	1	2	
48y2	15.10.04	141															526
48y3	16.11.04	143															531
49y	15.10.04	141															530
50y1	15.10.04	141															530
52x	15.10.04	134															530
54y1	9.11.04	133															529
58y	16.11.04	142															531
59x	9.11.04	133															531
62y	10.02.04	398															614
63x	12.06.03	389															516
64y	11.10.04	134															518
68x	24.06.03	391															615
68x2	11.10.04	134															541
70y	13.06.03	412														T	600
71x	11.10.04	134							T						C		524
74x	11.10.04	134						T									541
77x	13.06.03	397							T						C	C	612
77y1	11.10.04	141													C		530
77y2	11.10.04	134															530
79Y	10.02.04	397															614
87x	17.02.05	141															431

OS				
O 60y	04.06.03	389		D D 616

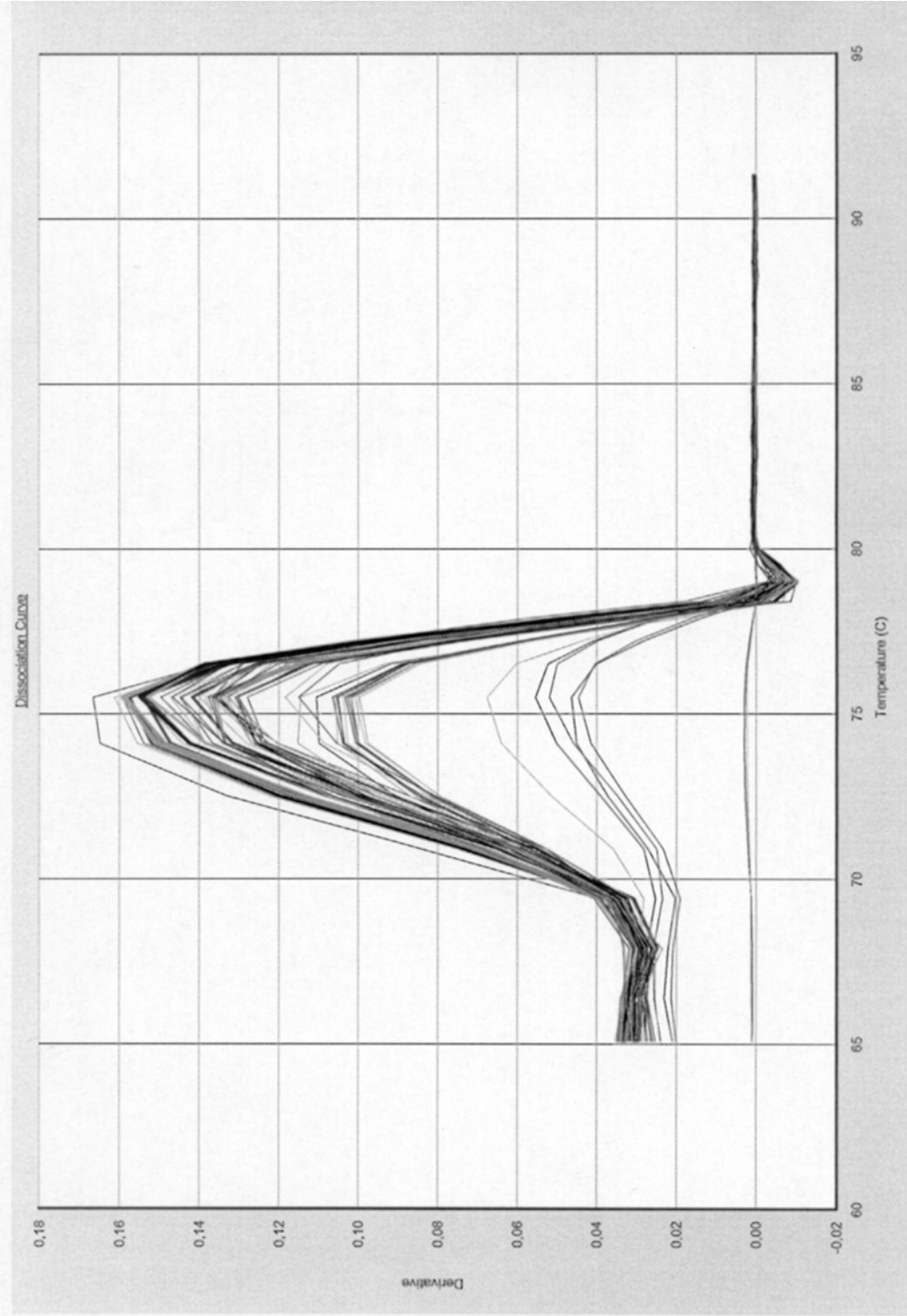


HVIII			4	4	4	4	5	5	5	5	5	Fin séquence
BUCCAL			6	8	8	9	1	2	2	7	7	
			2	2	9	7	3	2	3	3	3	
échantillon	date PCR	début séquence	C	T	T	C	G	A	C	.	.	
			1	2							1	2
c35x	13.05.03	438										530
c37x	13.05.03	391										617
c60x	13.05.03	395										614
c4x	13.05.03	388										615
c85x	13.05.03	391										617
c30x	13.05.03	398										600
c52x	13.05.03	412										595
c21x	13.05.03	398										606
c49x	04.06.03	409										608
c73x	04.06.03	398										614
c60x2	20.05.03	399	T		C			D	D			600
c77x	20.05.03	398										608
c79x	20.05.03	419	T		C							614
c49x	20.05.03	397	T		C							616
c15x	20.05.03	400	T		C							620
c80x	20.05.03	396										616
c51x	20.05.03	398										595
c27x	20.05.03	393										616
c44x	04.06.03	389	T		C			D	D			617
c69x	04.06.03	399	T		C			D	D			615
c90x	04.06.03	408										613
c62x	04.06.03	398										616
c41x	12.06.03	386										618
c7x	12.06.03	399										614
c80x2	12.06.03	397										617
c35x2	12.06.03	371										614
c68x	12.06.03	389										614
C63x	13.06.03	397										615
c35x3	12.06.03	395										613
c63x2	13.06.03	399	T		C							618
c74x	13.06.03	391										600
c41x	24.06.03	400										614
c72x	24.06.03	391										609
c64x	24.06.03	393								C	C	616
c70y	24.06.03	391				T						614
c31y	12.06.03	399										608
c41y	12.06.03	412										617
c58y	12.06.03	398										614
c50y	24.06.03	393										614

D : délétion

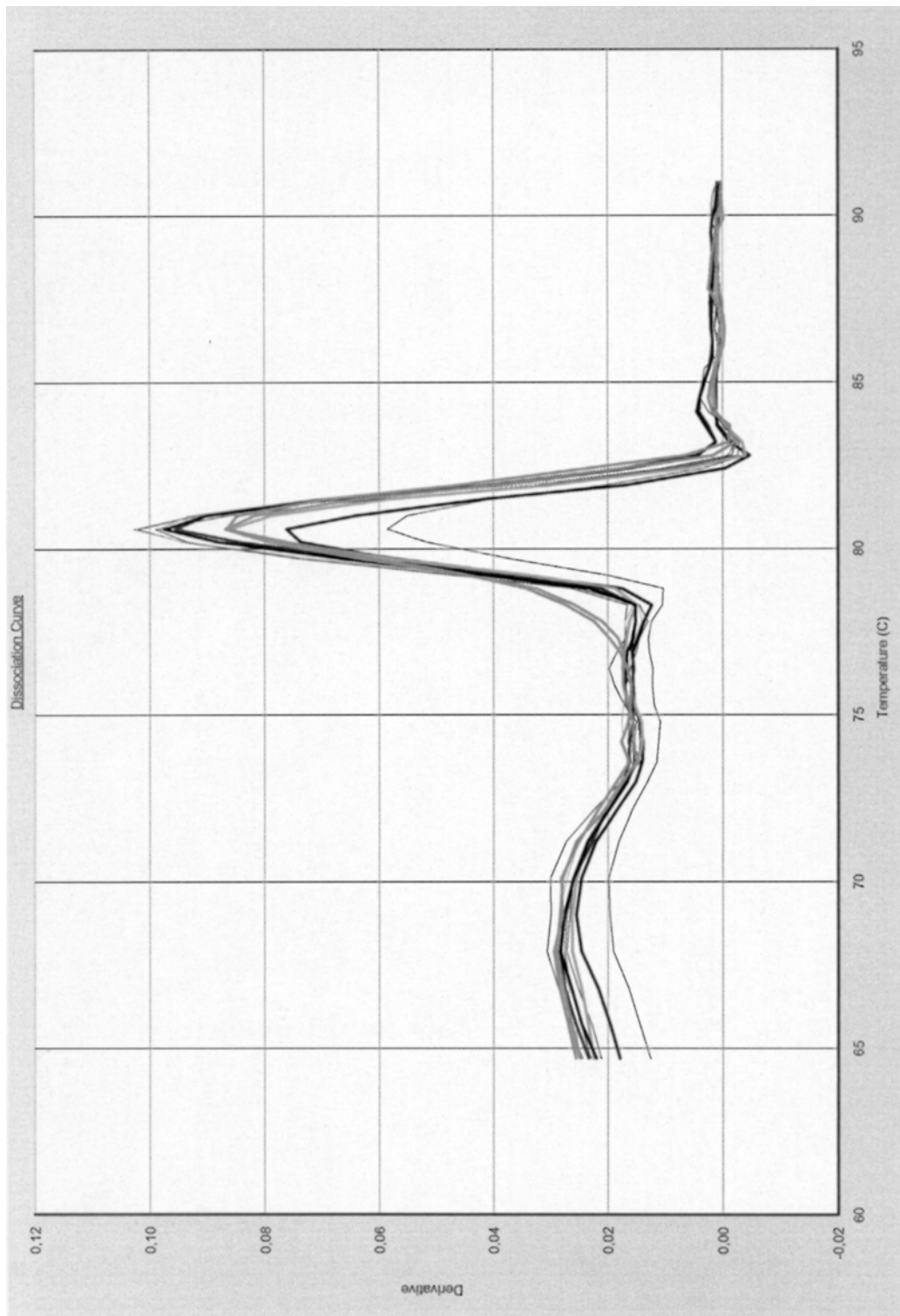
**Annexe 4 : Les courbes de dissociation**

Le Tm du segment d'amplification pour la position 189 est de 75°C.



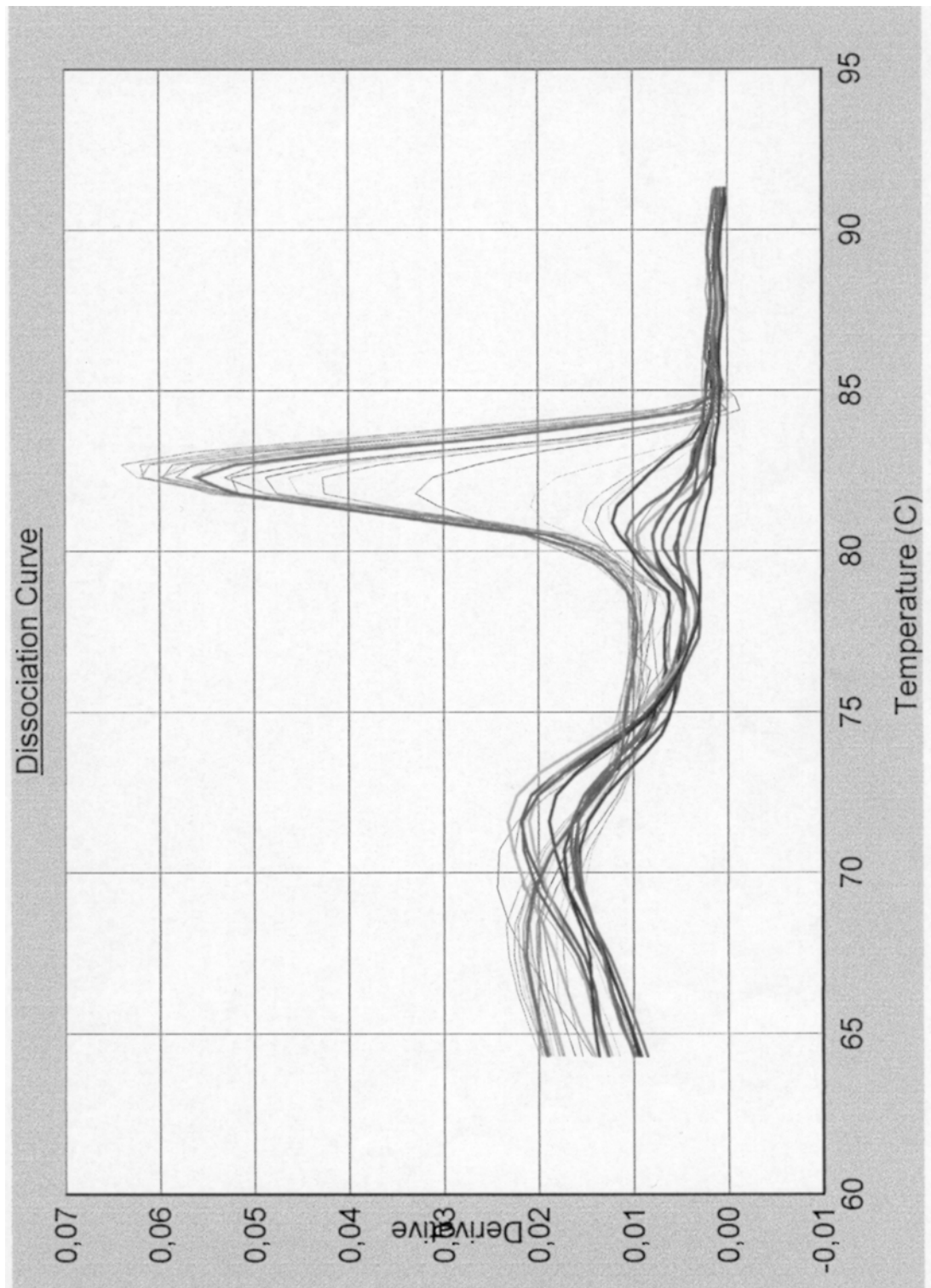
#### Annexe 4 : Les courbes de dissociation

Le Tm du segment d'amplification pour la position 408 est de 81°C.



#### Annexe 4 : Les courbes de dissociation

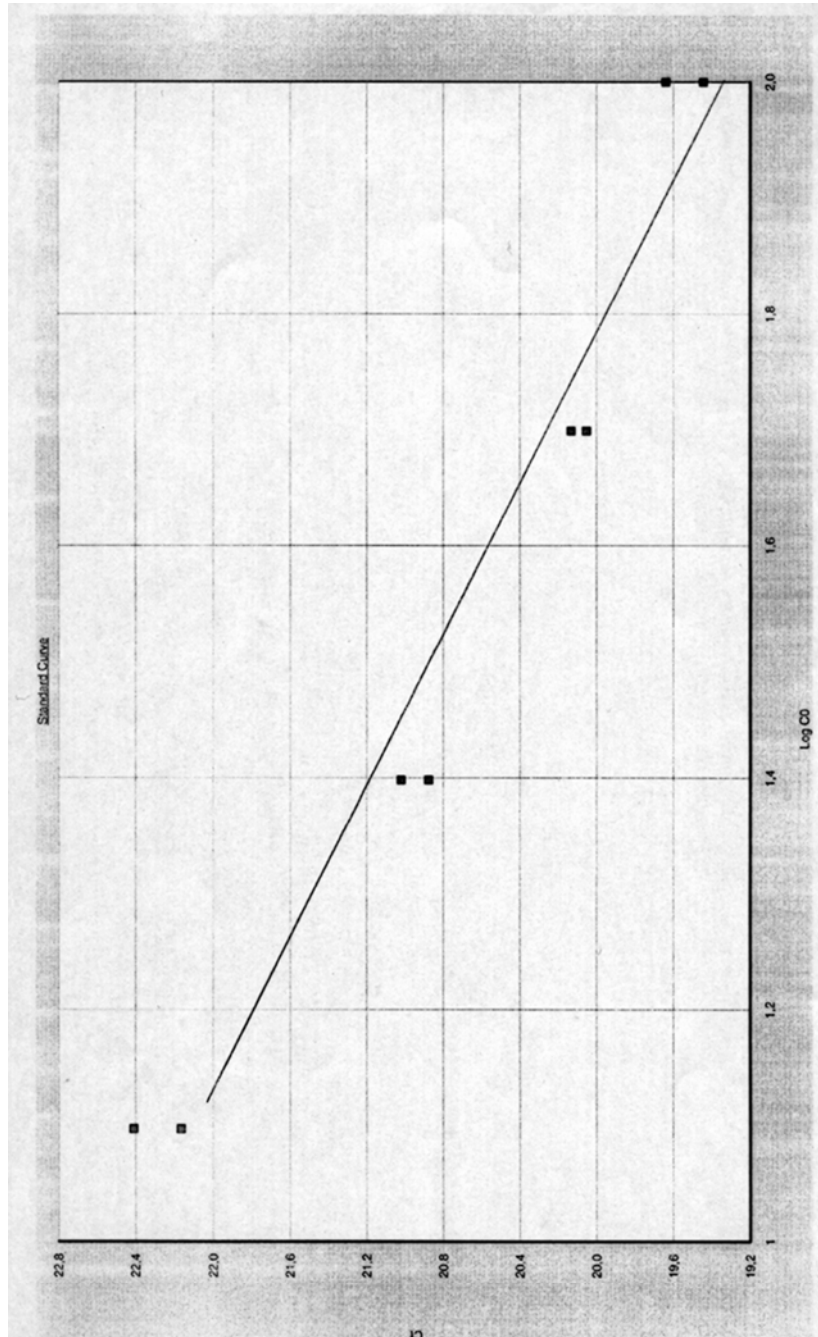
Le  $T_m$  du segment d'amplification pour la position 414 est de 83°C.



### Annexe 5 : L'efficacité des amorces

La pente de la droite est de -3,02 pour une concentration finale de 300 nM sur le segment 189.

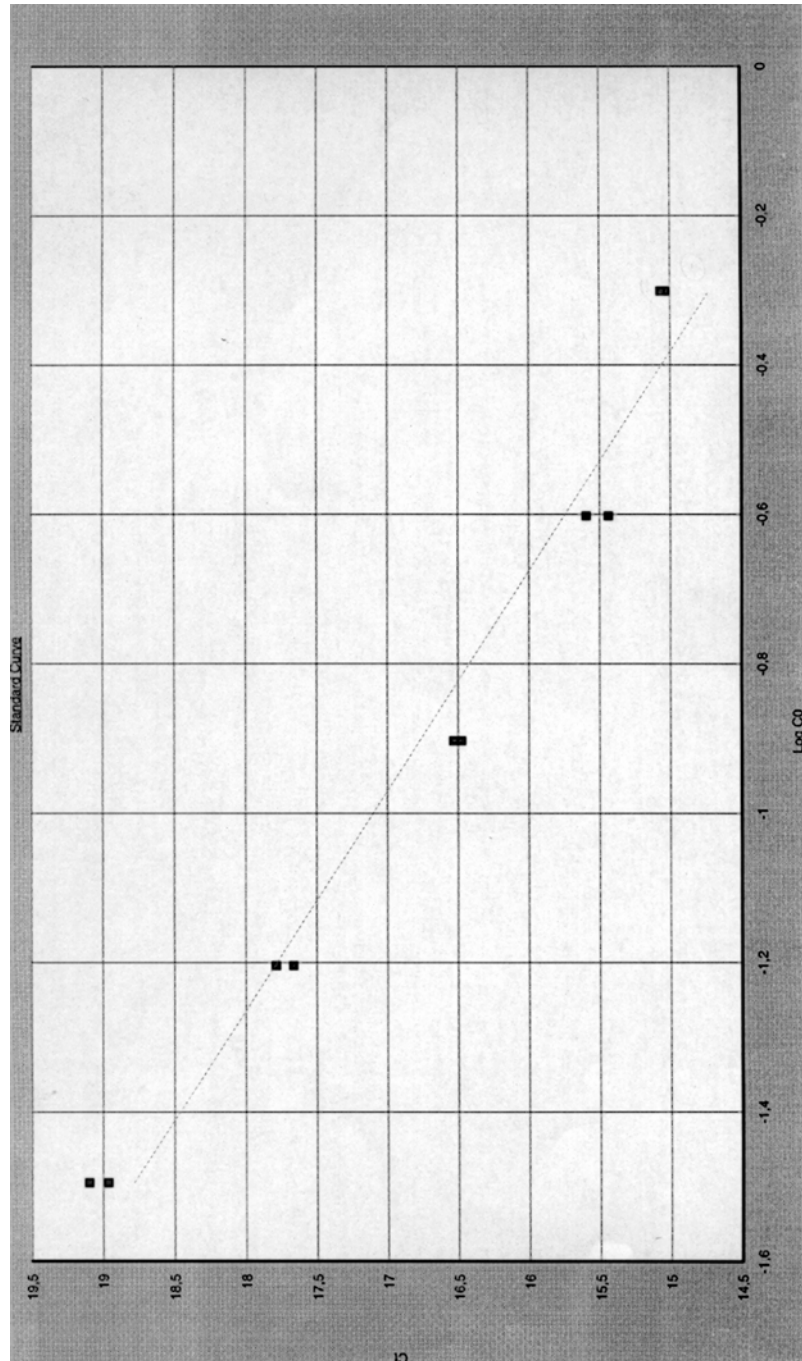
$$E = (10^{-(1/-3,02)} - 1) \times 100 = 114 \%$$



### Annexe 5 : L'efficacité des amorces

La pente de la droite est de -3,39 pour une concentration finale de 300 nM sur le segment 408.

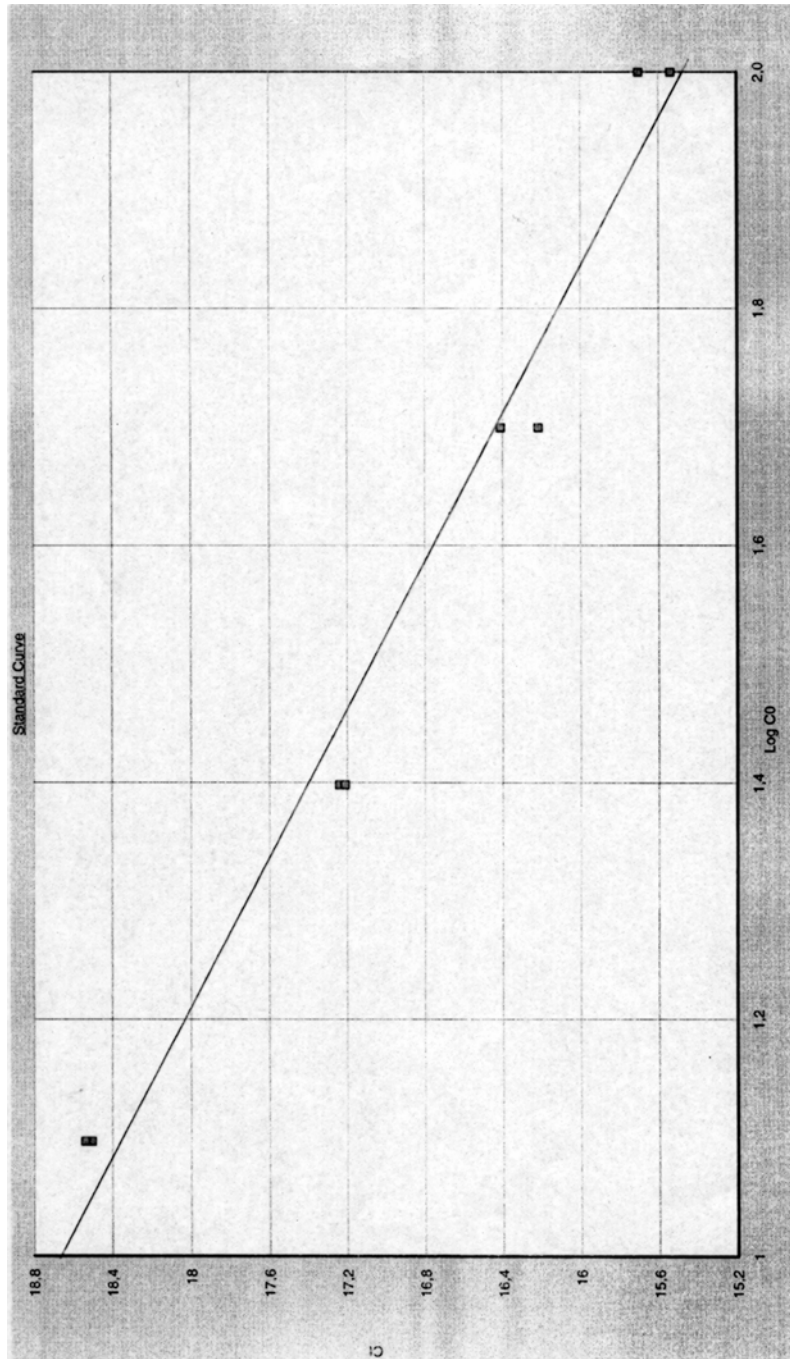
$$E = (10^{-(1/-3,39)} - 1) \times 100 = 97 \%$$



### Annexe 5 : L'efficacité des amorces

La pente de la droite est de -3,19 pour une concentration finale de 300 nM sur le segment 414.

$$E = (10^{-(1/-3,19)} - 1) \times 100 = 105 \%$$



**Annexe 6 : Article dans *Journal of Forensic Sciences***

Accepté le 2 Janvier 2006.

**Detection and Quantification of the Age-Related Point Mutation A189G in the Human Mitochondrial DNA**

*Catherine Thèves,<sup>1,3</sup>; Christine Keyser-Tracqui,<sup>2</sup> Ph.D.; Eric Crubézy,<sup>3</sup> M.D., Ph.D.; Jean-Pierre Salles,<sup>1</sup> M.D., Ph.D.; Bertrand Ludes,<sup>2,3</sup> M.D., Ph.D.; and Norbert Telmon,<sup>3</sup> M.D., Ph.D.*

<sup>1</sup> INSERM, U563 Bat C, Purpan University Hospital, Place du Dr Baylac, 31059 Toulouse, France.

<sup>2</sup> Molecular Anthropology Laboratory, Department of Forensic Medicine, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France.

<sup>3</sup> Anthropobiologie UMR 8555, 39 allées Jules Guesde, 31000 Toulouse, France.

Correspondence to:

Catherine Thèves INSERM, U563 Bat C, Purpan University Hospital, Place du Dr Baylac, 31059 Toulouse, France.

E-mail : [Catherine.Theves@toulouse.inserm.fr](mailto:Catherine.Theves@toulouse.inserm.fr)

Fax: +33-561779401

Short running header: age-related point mutation and human mitochondrial DNA



Catherine Thèves,<sup>1,2</sup> Ph.D.; Christine Keyser-Tracqui,<sup>3</sup> Ph.D.; Eric Crubézy,<sup>2</sup> M.D., Ph.D.; Jean-Pierre Salles,<sup>1</sup> M.D., Ph.D.; Bertrand Ludes,<sup>2,3</sup> M.D., Ph.D.; and Norbert Telmon,<sup>2</sup> M.D., Ph.D.

## Detection and Quantification of the Age-Related Point Mutation A189G in the Human Mitochondrial DNA

**ABSTRACT:** Mutation analysis in the mitochondrial DNA (mtDNA) control region is widely used in population genetic studies as well as in forensic medicine. Among the difficulties linked to the mtDNA analysis, one can find the detection of heteroplasmy, which can be inherited or somatic. Recently, age-related point mutation A189G was described in mtDNA and shown to accumulate with age in muscles. We carried out the detection of this 189 heteroplasmic point mutation using three technologies: automated DNA sequencing, Southern blot hybridization using a digoxigenin-labeled oligonucleotide probe, and peptide nucleic acid (PNA)/real-time PCR combined method on different biological samples. Our results give additional information on the increase in mutation frequency with age in muscle tissue and revealed that the PNA/real-time PCR is a largely more sensitive method than DNA sequencing for heteroplasmy detection. These investigations could be of interest in the detection and interpretation of mtDNA heteroplasmy in anthropological and forensic studies.

**KEYWORDS:** forensic science, mitochondrial DNA, heteroplasmy, age-related mutation, detection methods

The mitochondrial DNA (mtDNA) control region is a hyper-variable sequence widely used in population genetic studies to investigate human evolution, history, and patterns of migration as well as in forensic medicine for individual identification. Among the difficulties linked to mtDNA analysis is the detection of heteroplasmy (the presence of two or more mtDNA types in one individual), which can be inherited or somatic, and sometimes difficult to interpret. In recent years, a number of reports have suggested that during individual natural aging, heteroplasmic point mutations accumulate in the control region of mtDNA of some tissue types (1–4). This accumulation of mutations is thought to be due to the oxidation of DNA bases by free radicals, generated especially during cellular energy production by the mitochondrion (5,6). Among the reported heteroplasmic point mutations, one can find the A to G transition at position 189 (A189G), which has been detected at significant levels in skeletal muscles from aged individuals by several authors (3,4). According to them, the A189G mutation accumulates with age in both healthy subjects and patients with mitochondrial diseases. However, because the level of heteroplasmy is lower in nonpathological cases, the mutation detection is technically difficult and requires a sensitive method (7–9). Moreover, the ratio of mutant (189G) to wild type (189A) has been reported as varying between different tissues from the same individual, which complicates the detection of low proportions of mutant mtDNA (9,10).

In the present study, we searched for the presence of the A189G heteroplasmic mutation in two tissue types, muscle samples and buccal cells, with the following aims: (i) to determine whether the

A189G mutation was really age-related; (ii) to test its presence in buccal cells; (iii) to evaluate the most efficient method for detecting low levels of heteroplasmy; and finally (iv) to assess the possible implications of the A189G heteroplasmy in anthropological and forensic studies.

In order to prove the increase in mutant mtDNA molecules with age, buccal cells were collected from 37 individuals ranging from 4 to 85 years of age and belonging to 10 different maternal lineages. If the A189G mutation accumulates in an age-dependent manner, then it should be present in older subjects but not in younger ones of the same family. We also analyzed muscle samples gathered from 69 subjects 1–97 years of age. These samples were analyzed by means of three technologies: automated DNA sequencing, Southern blot hybridization using a digoxigenin-labeled oligonucleotide probe (11), and peptide nucleic acid (PNA) and quantitative real time PCR (qPCR) together (12,13).

Automated DNA sequencing is a technology widely and routinely used in research and forensic laboratories for population genetic studies or individual identification (14). Southern blot analysis was performed using two probes (with the A or G base at position 189) labeled by a molecule of digoxigenin in 5'. The digoxigenin label can be detected with enzyme-linked immunoassays for antidigoxigenin protein conjugates, and visualized through a chemiluminescent reaction (11). The PNA/qPCR combined method is a less used methodology. The PNA molecule is a DNA mimic, in which the negatively charged sugar-phosphate DNA backbone is replaced by an achiral, neutral polyamide backbone formed by repetitive units of *N*-(2-aminoethyl) glycine (15). The PNA-directed PCR clamping technique has been developed to detect single base-pair mutations (12,16). As shown in Fig. 1, the PNA probe hybridizes perfectly to a target region and prevents PCR primer binding, whereas single base-pair mismatches containing PNA exhibit minimal primer binding inhibition. PNA-directed PCR clamping was used in combination with the real-time PCR (17). The amplification process is monitored in real time by fluorescent dye SYBR Green incorporation and allows a relative

<sup>1</sup>INSERM, U563 Bat C, Purpan University Hospital, Place du Dr Baylac, 31059 Toulouse, France.

<sup>2</sup>Anthropobiologie UMR 8555, 39 allées Jules Guesde, 31000 Toulouse, France.

<sup>3</sup>Molecular Anthropology Laboratory, Department of Forensic Medicine, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France.

Received 28 July 2005; and in revised form 30 Dec. 2005; accepted 2 Jan. 2006; published 14 June 2006.

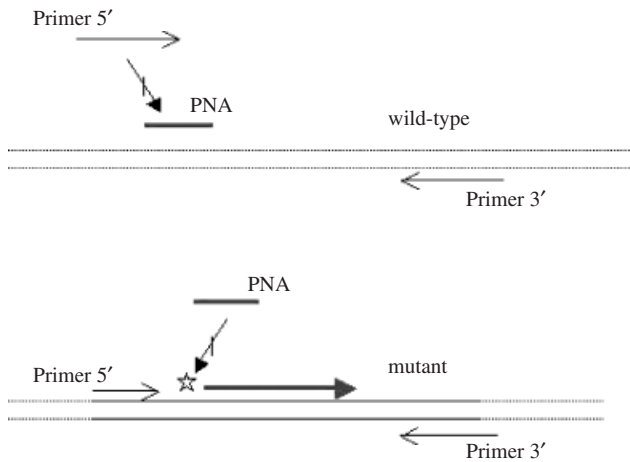


FIG. 1—Peptide nucleic acid (PNA)-directed PCR clamping methodology. The arrows show the PCR primers. The bars represent PNA. The asterisks represent mutations. Under appropriate cycling conditions, the PNA will bind to the wild-type, but not to the mutant template, blocking annealing of the upstream primer, and allowing amplification of only the mutant molecules.

quantification of heteroplasmy (13). Unlike other double-strand DNA-selective dyes, SYBR Green is excitable by visible wavelength and provides excellent sensitivity. This method of mutation detection does not require post-PCR manipulations, reducing assay time and the probability of laboratory contaminations.

## Materials and Methods

### Samples and DNA Extraction

Buccal cell samples were collected by a cytobrush on 37 individuals (4–85 years old) who gave their informed consent. Each one of the 10 maternal lineages included two to four members. Buccal samples were incubated for 2 h at 50°C in 400  $\mu$ L extraction buffer (EDTA 5 mM, SDS 2%, Tris HCl 10 mM (pH 7.5), sodium acetate 0.3 M), and 0.2 mg proteinase K. A phenol/chloroform/isooamyl alcohol (25/24/1) extraction was carried out on the supernatant. The aqueous phase was purified with the Cleanmix™ Kit (Talent, Trieste, Italy). After purification, DNA was eluted into sterile water.

Muscle samples (psoas) were collected during forensic autopsies from 69 unrelated individuals ranging from 1 to 97 years in age. Individuals died accidentally and were exempt from any specific disease macroscopically detectable. Approximately 1 cm<sup>3</sup> of muscle fragments were incubated in 3 mL extraction buffer (EDTA 10 mM, NaCl 50 mM, SDS 2%, Tris HCl 10 mM (pH 7.5), and 0.2 mg proteinase K) at 58°C overnight. Total DNA was extracted according to the saturated sodium acetate precipitation method (18). An extraction reagent blank negative control accompanied all muscle and buccal sample extractions throughout the entire analysis.

### Sequencing Analysis

PCR amplification was performed using 1  $\mu$ L total DNA in a 50  $\mu$ L reaction volume containing MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, BSA 0.2 mg/mL, 0.2 mM of dNTPs, primers 200 nM, 1  $\times$  buffer, and 0.5 U of Taq HotGoldstar DNA polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium). The primer sequences are listed in Table 1. Amplification was carried out in a T3 Thermocycler (Biometra, Biolabo Scientific Instruments, Archamps, France). After a 10 min preincubation step at 95°C, PCR amplification was performed by direct PCR

TABLE 1—Sequences of the primers and probes used in this study.

	Sequence (5'–3') by Anderson et al. (20)
Sequencing primer: L29 strand	GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C
Sequencing primer: H408 strand	CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC A
PNA probe (189 position: A)	CAG GCG AAC ATA CTT
PNA probe (189 position: G)	CAG GCG AGC ATA CTT
Real-time PCR primer: L166 strand	CCT ACG TTC AAT ATT ACA GGC GA
Real-time PCR primer: H253 strand	GTG GAA AGT GGC TGT GCA G
Southern digoxigenin probe (189 position: A)	TAC AGG CGA ACA TAC TTA C
Southern digoxigenin probe (189 position: G)	TAC AGG CGA GCA TAC TTA C
Southern PCR primer: L111 strand	ACC CTA TGT CGC AGT ATC TGT C
Southern PCR primer: H253 strand	GTG GAA AGT GGC TGT GCA G

PNA, peptide nucleic acid.

(35 cycles) using the following conditions: 95°C denaturation for 45 sec, annealing at 53°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, followed by a 7 min final extension at 72°C. PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose low melting (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Purification of amplicon products was carried out on Microcon<sup>®</sup> PCR columns (Millipore, St. Quentin-en-Yvelines, France). Sequencing reactions were performed using the BigDye™ Terminator kit (Applied Biosystems, Courtabeuf, France). The products were purified using the protocol recommended by the manufacturer and submitted to capillary electrophoresis on an ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). The results were analyzed using the Sequencing Analysis 3.7 Software (PE Applied Biosystems). Negative PCR controls accompanied samples and their extraction reagent blank negative controls throughout the sequencing process.

### PNA Method and Real-Time PCR

PNA sequences and complementary primers for the point mutation A189G are given in Table 1. PNA probes were purchased from Eurogentec. For PNA clamping reactions, PCR reactions contained: SYBR<sup>®</sup> Green Jump Start™ Taq Ready Mix™ (Sigma-Aldrich), 5  $\mu$ L of DNA lysate, 300 nM of each primer, and 2  $\mu$ M PNA probe or H<sub>2</sub>O in 26  $\mu$ L of final volume. The reaction mixture was subjected to a uracil–DNA glycosidase digestion step of 50°C for 2 min (the complex dissociates and the polymerase becomes fully active), followed by 95°C for 10 min and PCR cycling in the ABI Prism<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Real-time PCR was run in 40 cycles: denaturation (30 sec at 94°C), PNA hybridization (30 sec at 69°C), primer annealing (30 sec at 60°C), and extension (30 sec at 72°C).

The cycle threshold ( $C_t$ ) value is defined by the cycle at which SYBR<sup>®</sup> Green fluorescence increases significantly above the background as a result of specific amplification.  $C_t$  values were calculated by extrapolation to the  $x$  axis of the linear portion of the exponential growth phase. The reported  $C_t$  is the cycle number adjoining the  $x$  intercept (19).

Preliminary optimization and validation of the PNA/qPCR combined method were carried out on two muscle DNA extracts. These samples (controls) were previously sequenced and identified as A (wild-type = WT) or G (mutant = M) at position 189.

Linearity of template amplification relative to copy number was demonstrated. PCR efficiency ( $E$ ) was calculated according to the equation:  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$  and showed a PCR efficiency of 1.14. A dissociation protocol (Applied Biosystems) was performed, in order to identify the amplicon according to its melting temperature. Then, a melting curve analysis confirmed the amplification of a single product with a specific melting temperature of 75°C.

#### Relative Quantification

A scale of G variant from 0 to 100 obtained by mixing in equimolar proportions DNA from M and WT controls established an experimental reference curve. In a first run, 11 points (in the following percentages: 0%, 10%, 20%, ..., 90%, and 100%) were evaluated and amplification was repeated three times for each condition: without a PNA probe, with a PNA G probe, or with a PNA A probe (Table 1). Average amplification cycles were established for each point and an intra-assay precision test was calculated (19). A second run was conducted including extra points situated between 0% and 20% and between 80% and 100% of the G variant. Then, the points common to each run enabled us to calculate an interassay precision test (19).

Once this experimental curve was established ( $x = \text{mutant } \%$ ;  $y = G/A C_t$  ratio), the Statistica v5.1 computer software (StatSoft, Tulsa, OK) calculated the percentage of mutants by its inverse relationship ( $x = G/A C_t$  ratio;  $y = \text{mutant } \%$ ).

For each sample on the same run, an amplification triplicate was conducted for each PCR condition (without PNA probe, with PNA G probe, or with PNA A probe). The  $C_t$  obtained ( $C_t A$  for PNA A probe and  $C_t G$  for PNA G probe) was used to calculate the level of variant G or A present in the sample's mtDNA. A blank amplification as well as two M and WT controls were systematically included for each run.

#### Southern Blot

A 2- $\mu$ L DNA was amplified by using primers the listed in Table 1. PCR conditions were performed using a DNA thermal cycler (Perkin Elmer 2400) in a 26- $\mu$ L reaction volume containing  $MgCl_2$  1.5 mM, dNTPs 200 nM, 400 nM of each primer, buffer  $1 \times$ , and 1 U of Taq polymerase (Promega, Madison, WI). PCR steps were determined with an initial denaturation step at 94°C for 1 min, followed by 35 cycles including a denaturation step for 15 sec at 94°C, a hybridization step for 30 sec at 57°C, an extension step for 45 sec at 72°C, and a final extension step for 2 min at 72°C.

Southern blot was performed using standard techniques. PCR products were blotted onto membranes (immobilon<sup>TM</sup> NY+, Millipore, Bedford, MA) and hybridized with 5'-digoxigenin-labeled probes (Eurogentec) (Table 1). Detection of the digoxigenin-labeled hybridized probes was performed using the DIG Luminescent Detection Kit as described by the manufacturer (Roche Applied, Penzberg, Germany). Detection of 5'-digoxigenin probes was performed by exposure to an X-ray film and analyzed using ImageQuant software v1.1 (Molecular Dynamics).

## Results

#### Automated DNA Sequencing

All samples were initially analyzed by automated DNA sequencing. The region studied at position 189 is highly polymorphic, for example at sites 182 or 195. The probes (for the PNA or Southern blot techniques) were synthesized on 15 or 20 bases ac-

TABLE 2—Polymorphism characterization in the hybridization region of PNA probes.

	1	1	1	1	1	1
Cambridge	8	8	8	8	8	9
Sequence by	2	4	5	8	9	5
Anderson et al. (20)	C	G	G	A	A	T
Muscle samples	7	.	.	.	.	C
	1	.	.	.	G	C
	1	T	.	.	.	.
	2	.	.	A	G	.
	1	.	.	A	.	.
	1	T	.	C	.	C
Buccal samples	6	.	.	.	G	.
	1	.	.	.	.	C
	2	T	A	.	.	.
	6	.	.	A	G	.

PNA, peptide nucleic acid.

ording to the Cambridge Sequence (20) with a variation of bases A and G at position 189 (Table 1). It is necessary to know the samples' sequences underlying the probe in order to select the samples with the complementary *Cambridge Sequence*.

Of the 69 muscle samples studied, 13 were polymorphic between positions 182 and 195 and could not be analyzed by the PNA/qPCR or Southern blot methods. Their sequences were not complementary to those of the probes. Among the 13 polymorphic samples (Table 2), nine were situated at the extremity of the probe (195 or 182) and four in a more central position (185 or 188). Among all samples analyzed by sequencing, 11 (belonging to individuals of 38–97 years of age) had an A/G heteroplasmy at position 189 (Table 3). Among the 11 heteroplasmies detected, two individuals aged 68 and 77 years old also had a polymorphism at position 195, and could not be analyzed by the different methods using probes.

The 37 buccal samples from individuals of 4–85 years of age were also analyzed by automated DNA sequencing. For six of them (belonging to two families of different maternal lineage), we were able to identify G at position 189 (Table 2); this transition was considered transmitted as it was found in all members of the family. Other polymorphisms were revealed by this sequencing method (Table 2) and located either at the end or in the central part of the probe's hybridization region. Collection of buccal samples was carried out by family grouping; polymorphism detection excluded several families (representing a total of 14 individuals) from the PNA/qPCR or Southern Blot analysis. No A189G heteroplasmy was detected in any of the 37 buccal samples with sequencing (Table 3).

In order to determine the threshold of the automated DNA sequencing method, the experimental variant G scale was tested by this technique. A sequencing pattern G peak at position 189 was detectable for minimum 30% of G variants.

#### PNA/qPCR Tests

To test the linearity of the probe's PCR clamping according to the DNA concentration, serial dilutions were performed between 100 and 0.001 ng from total DNA of WT and M controls. Differences in  $C_t$  ( $\Delta C_t$ ) between amplification with or without PNA were constant for total DNA concentrations between 100 and 0.1 ng. Initial amplification of each sample without probe had to be included between 16 and 26  $C_t$ . If the DNA concentration or quality was low, the samples could not be analyzed because they were outside the linearity of the probe's PCR clamping. For this

TABLE 3—Characterization of position 189 between three technologies on muscle tissues and buccal cells.

Samples	n	Automated Sequencing		PNA/qPCR Method		Southern Blot	
		n	A189G Heteroplasmy	n	A189G Heteroplasmy	n	A189G Heteroplasmy
Muscle tissues	69	69	11	50	44	50	27
Buccal cells	37	37	0	23	18	23	0

The PNA/qPCR method allowed detection of low levels of the A189G heteroplasmy in two cell types. The automated DNA sequencing did not detect the heteroplasmy level inferior to 30%. In buccal cells, heteroplasmy was globally inferior to 10% and was not detected by automated sequencing or by Southern blot. In muscle samples, Southern blot detected heteroplasmy level superior to 10% and the PNA/qPCR method could determine all levels of heteroplasmy.

PNA, peptide nucleic acid; qPCR, quantitative real-time PCR.

reason, five muscle samples were excluded from the PNA/qPCR analysis.

To test the efficiency of the PCR clamping according to the percentage of mutants present in total mtDNA, we produced variant G ratios from WT and M controls. We tested both PNA probes during qPCR amplifications (Fig. 2a and b). Each graph demonstrated that the curves between the proportion of mutants

and the PCR clamping were exponential and had inverse relationships. The  $C_t$  values included between 0% and 80% of G variant for the PNA G probe (Fig. 2a) and between 20% and 100% for the PNA A probe (Fig. 2b) varied only slightly. The differences between the  $C_t$  values with and without the PNA probe ( $\Delta C_t$ ) were noticeable only between 80% and 100% of mutants for the PNA G probe (Fig. 2a) and between 0% and 20% for the PNA A probe (Fig. 2b). Finally, the use of only one probe would only have enabled us to analyze levels of mutants  $\leq$  or  $\geq$  80% of variant G for the PNA G probe and levels of mutants  $\leq$  or  $\geq$  20% of variant G for the PNA A probe. However, in order to obtain opposite and complementary  $C_t$  values between both PNA probes, the level of G variant had to be located between 0% and 20% or 80 and 100%. From the  $C_t$  ratio G/A, we established a variant G reference curve, to estimate the level of mutation in a more precise manner. Figure 2c demonstrates that the G/A  $C_t$  values led to a better resolution of the mutant levels between 20% and 80%.

#### Intra-assay and Interassay Precision Tests

Amplification triplicates were conducted on the same run and for each different condition (without a PNA probe and with a PNA G or A probe) to test the precision of the variant G curve. As suggested by the manufacturer (Applied Biosystems), a value  $\leq 0.5 C_t$  was considered to be acceptable between triplicates of the same experimental condition in a same run. Also, the intra-assay precision test values on WT and M controls in each of the three PCR conditions were situated between 0.1% and 0.5% (19). The test's precision on two runs for two different days, representing two triplicates for each control condition, was also measured. The interassay precision test was situated between 1.5% and 4.4% for the three PCR conditions (19).

The experimental reference curve of the controls' G/A values (Fig. 2c) was reversed in order to obtain an estimated level of mutants in an unknown sample. We have excluded 0% and 100% points in this inverse relationship and their corresponding G/A

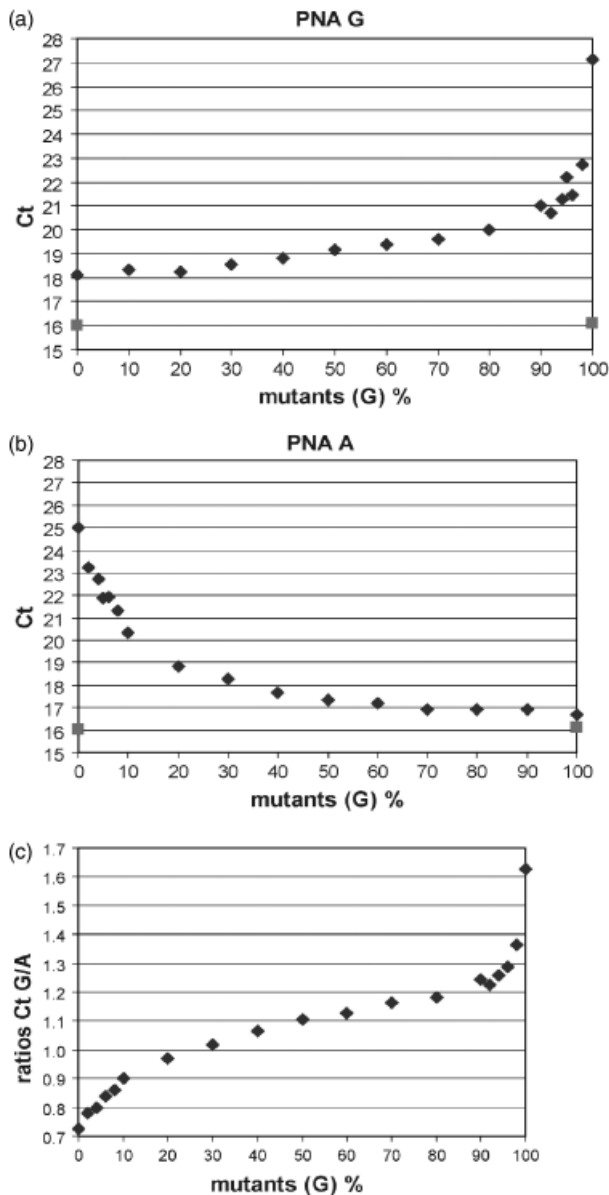


FIG. 2—(a) Amplification depending on the percentage of mutants (189G variant) with the PNA G probe. Estimation of the percentage of mutants given by the  $C_t$  difference between the amplifications with or without a PNA G probe ( $C_t$ , G) was noticeable in values  $< 80\%$ , or  $> 80\%$  of G variant. (b) Amplification depending on the percentage of mutants (189G variant) with a PNA A probe. Estimation of the percentage of mutants given by the  $C_t$  difference between the amplifications with or without a PNA A probe ( $C_t$ , A) was noticeable in values  $< 20\%$ , or  $> 20\%$  of G variant. (c) The  $C_t$  value ratio of PNA G probes on PNA A probes depending on the percentage of mutants (189G variant.) The  $C_t$  value ratio of PNA G probe on PNA A probe led to a better resolution of the G variant level in the 20% to 80% interval.  $\blacklozenge$ , G mutant cycle threshold ( $C_t$ ) values with peptide nucleic acid (PNA) probe;  $\blacksquare$ , wild-type (WT) and mutant (M) controls'  $C_t$  values without PNA probe.

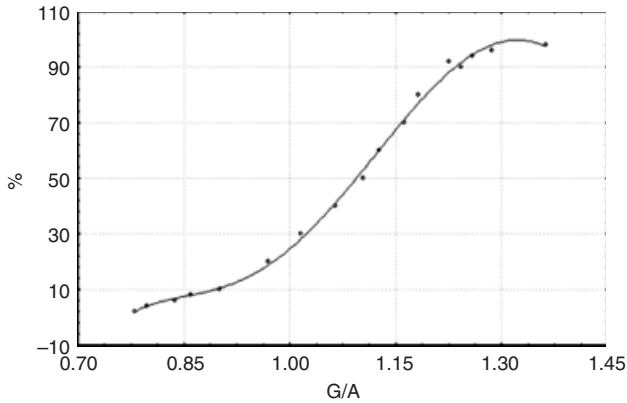


FIG. 3—Percentage of 189G mutants estimated by the G/A cycle threshold ( $C_t$ ) values ratio.  $X = G/A C_t$  values ratio;  $Y = 189 G$  mutant percentage. From Fig. 2c and the analysis by Statistica 5.1 software, the inverse polynomial function was established ( $y = -2737.2 + 11,918x - 19,242.5x^2 + 13,574.1x^3 - 3486.6x^4$ ). It calculated the level of mutants present in a sample by its G/A  $C_t$  ratio.

$C_t$  ratios (0.7 for 0% and 1.6 for 100%) because they lacked complementary information. Statistica v5.1 software calculated a polynomial function (Fig. 3) from measured G/A  $C_t$  ratios, and the values of mutant levels were obtained with a 1.4% average standard deviation (SD) (minimum SD: 0.02%, maximum SD:

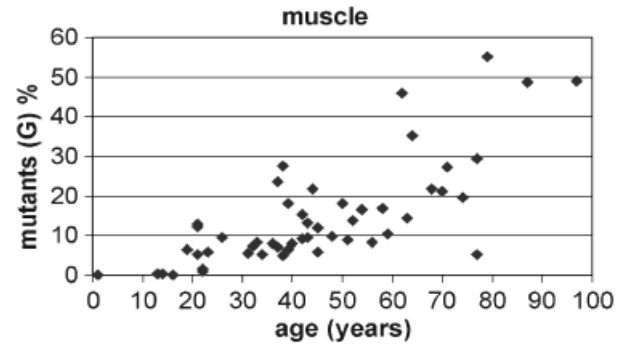


FIG. 5—Accumulation in muscle samples of the A189G heteroplasmy with age. The level of 189G mutants was determined by the G/A cycle threshold ( $C_t$ ) ratio within the peptide nucleic acid (PNA)/real-time PCR run. After 50 years of age, the levels are generally  $\geq 10\%$  (15/19); for those 60 years old or more, the levels are closer to 20% and over (10/12). The individuals 40 years old or less, except a few individuals (5/23), have levels of mutations  $\leq 10\%$ .

4.1%). The function was then applied to the  $C_t$  G/A ratios of the samples.

PNA/qPCR Samples

In order to be statistically representative, a minimum variation of  $\leq 0.5 C_t$  was considered to be acceptable for all amplification triplicates of a given condition. The intra-assay precision test carried out on both tissue types was between 0.06% and 1.68% (19). Samples presenting unstable amplification in a run were either reanalyzed or excluded.

Among the 23 buccal samples analyzed by the PNA/qPCR method, 18 presented a level of heteroplasmy at position 189 superior to 5%, the maximum being 12.6% (Fig. 4a). These heteroplasms were especially noticeable in three of four members (4, 37, 60, and 85 years old) of the same maternal lineage (Fig. 4b; family 1). While the heteroplasmic mutation was detected in the three adults (at levels of 8–9.5%), it was not observed for the child. Similarly, the heteroplasmic mutation was detected in the older members (73 and 80 years old at levels of 12.6% and 11.5%, respectively) in families 2 and 4, and more slightly observed in the younger members (at levels of 1.5–8.9%) (Fig. 4b). From these family observations, even though the level of mutation was low, we noticed that the A189G transition in its heteroplasmic form was a somatic mutation because it was less or not observed in young individuals. Considering all the individuals (Fig. 4a), heteroplasmy levels were low and there did not seem to be an accumulation threshold age for this specific mutation.

The 50 muscle samples from individuals of 1 to 97 years old were analyzed by the PNA/qPCR method. Figure 5 represents the accumulation of the 189G mutation according to the subject's age. The levels of heteroplasmy were higher in the muscle tissues compared with the buccal samples. In fact, for individuals 60 years old or more, the level of mutants was  $\geq 20\%$  for 10 out of 12 individuals (against 12.6% for buccal cells). In contrast, for individuals less than 40 years old, the percentage of mutants was low:  $\leq 10\%$  for 18 of the 23 individuals analyzed. The PNA/qPCR method also detected the 189G polymorphisms identified in the six buccal samples by sequencing (Table 2). As expected, the G/A  $C_t$  values were similar to the control M (i.e.,  $\geq 1.6$ ).

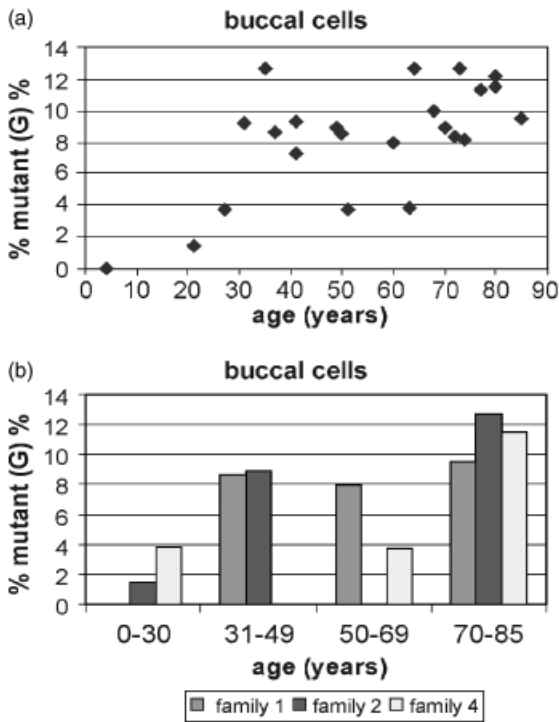


FIG. 4—(a) Accumulation in buccal cells of the A189G heteroplasmy level with age ( $n = 23$ ). The level of 189G mutants was determined by the G/A cycle threshold ( $C_t$ ) ratio within the peptide nucleic acid (PNA)/real-time PCR run. None of the G/A  $C_t$  ratios measured surpassed 0.92, thus giving a maximum percentage estimation of G variants of 12.6%. (b) A189G heteroplasmy in buccal cells of individuals belonging to the same maternal lineage (from three different families). Mutation 189G in levels inferior to 12.6% was detected in subjects of the same family by PNA/qPCR. Mutation was absent or weakly present in the younger individuals compared with the older ones of the same family.

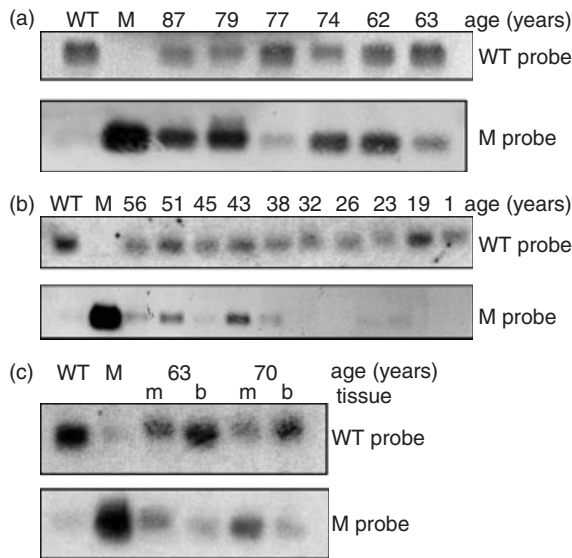


FIG. 6—(a) Detection of the heteroplasmy A and G in position 189 in muscle samples of individuals more than 60 years of age. The M probe (189G) showed clear evidence of 189G variants on muscle tissues of individuals more than 60 years of age. The percentage of mutations is of 20% or more in all individuals except for a 77-year-old individual whose level was low ( $\leq 5\%$ ). (b) Detection of the heteroplasmy A and G in position 189 in muscle samples of individuals less than 60 years of age. The M probe (189G) showed levels of 189G mutants  $\geq 10\%$ . These levels were found in most of the individuals more than 50 years of age (5/7). For those 40 years old or less, the percentage of mutation was  $\leq 10\%$  (18/23) and was barely detected or undetected by Southern blot. (c) Detection of the heteroplasmy A and G in position 189 in double sampling (muscle tissue and buccal cells) from two individuals. The M probe (189G) revealed the tissue variability of the 189G heteroplasmy. In the muscle tissue, evaluation of the percentage of mutants by ImageQuant software was 12% for the 63-year-old individual and 20% for the 70-year-old. Detection of the 189G heteroplasmy in buccal cells was very weak and relative quantification estimated the percentage of G mutants to be  $\leq 5\%$ . Southern blot. WT, wild-type control; M, mutant control; the samples were classified by age; m, muscle tissue; b, buccal cells.

### Southern Blot

All buccal and muscle samples with the complementary Cambridge Sequence to the probe's hybridization region were analyzed by Southern blot. The detection of the 189G heteroplasmy form in muscle tissues was important in individuals more than 60 years old (Fig. 6a). The labeling's relative quantification was performed by the ImageQuant software and the percentage of mutants detected in the samples was calculated compared with M control (an equal quantity of control or samples DNA was deposited). Concerning the individuals below 60 years old (Fig. 6b), with a lower percentage of G variants, detection was lesser but present up to 40 years of age. Individuals less than 40 years old (with a few exceptions) were lightly or not labeled. The method's detection limit of the percentage of G variant seemed to be 10%. In the 50 muscle samples analyzed by the Southern blot method, detection of the 189G heteroplasmy form was demonstrated in 27 individuals in levels close to 10% and quantified by the ImageQuant software (Table 3). In contrast, detection of mutant molecules was almost impossible in buccal cells and did not allow sample discrimination.

Moreover, we obtained from two deceased individuals, 63 and 70 years old, both types of tissue samples and as shown in Fig. 6c, the 189G heteroplasmy was clearly detected in the muscle tissues of each one of them (with a percentage of 12% and 22%, respectively) and was slightly present in buccal cells ( $\leq 5\%$ ).

### Discussion

In order to minimize possible contaminations, which can be disastrous in the research of heteroplasmy, negative controls were performed at each of our method's steps (extraction, PCR, sequencing, real-time PCR). Our laboratory followed the working conditions suggested by the EDNAP group in order to prevent any possible contamination (21). Pre- and post-PCR areas were separated and all disposables were treated by UV cross-linking. Concerning the sequencing method, samples were analyzed on both their DNA strands to confirm heteroplasmy. They were analyzed only when both bases appeared visible above the background and on both strands. A positive control as well as the laboratory personnel's sequence were determined in order to test the absence of sample contamination. Our DNA samples were of good quality and their amount was sufficient for a good PCR amplification. This is why the number of PCR cycles was limited to 35 for the initial PCR amplification of the specific strand before its analysis by sequencing. Concerning the three detection methods, all PCRs were conducted with a number of cycles between 35 and 40. Indeed, when the amount of DNA is low, the number of cycles needs to be increased, for example in hair mtDNA analysis, and heteroplasmy artifacts should occur (22). The five muscle samples whose amplification occurred late by the PNA/qPCR method ( $C_t$  without probe was over 30) were excluded from our study because they were not situated within the linearity of the PCR clamping. Consequently, the levels of heteroplasmy found on our healthy muscle samples were similar to those published previously (4). We also excluded from our studies individuals whose autopsies revealed any mitochondrial or neurodegenerative pathologies. The muscle samples all came from the psoas, a muscle with low energetic needs on working or living conditions. Among the individuals chosen for the buccal samples, none presented pathologies linked with oxidative stress.

Analysis by sequencing of PNA probes hybridization region polymorphism enabled us to evaluate the effects of these polymorphisms on the PNA/qPCR method. The PNA probe's sequence mismatch leads to instability and an important loss in the probe's hybridization temperature. Loss in hybridization temperature is more or less important depending on the mismatched base and its location in the probe's sequence (16).

If the mismatch is central, the instability is the greatest and the hybridization temperature can increase up to  $15^\circ\text{C}$ . We decided to locate the nucleotides A and G at position 189 in the center of the probe so that an eventual mismatch could lead to a significant temperature loss. However, when the mismatch occurs near the probe's extremities, temperature loss is less significant (around  $7^\circ\text{C}$  or  $8^\circ\text{C}$ ) and primer or PNA hybridization can take place in various proportions independently of the base at position 189. This kind of probe or primer hybridization can be observed in polymorphic samples near the extremities of the PNA probes and can lead to important  $C_t$  variations during real-time PCR cycles. Such polymorphic samples presented higher  $C_t$  variations than the accepted value ( $0.5 C_t$ ) between triplicates of the same run. Consequently, we could not take into consideration the polymorphic samples'  $C_t$  values. Concerning the samples containing central polymorphisms (e.g., positions 185 or 188), the amplification result was different. Whatever the PNA probe, the mismatch occurred systematically because of the central polymorphism leading to a significant loss in hybridization temperature. With or without a PNA probe, the amplification varied slightly ( $\leq 1 C_t$ ).

It is interesting to notice that two polymorphic samples in the position 195 had a heteroplasmy in position 189 detectable by sequencing, in rates higher than 30%, and were from individuals 77 and 68 years old. In order to analyze them completely, and samples where heteroplasmy was not detected by the sequencing method, we would need to synthesize PNA probes whose sequence would correspond to the most common polymorphisms. Among all our samples (muscle and buccal), 195 and 188/185 positions are the most polymorphic sites.

Comparison of automated sequencing and PNA/qPCR methods demonstrated two facts. Where the levels of 189G mutant molecules were >30%, including nine muscle samples submitted to both techniques, the percentage of G variants obtained, either by the peak heights on the sequencing pattern or by the qPCR's  $C_i$  G/A ratio, was the same. This observation revealed that our evaluation method was correct if certain precautions like minimal variations between same-sample triplicates ( $\leq 0.5 C_i$ ) were respected and if a standard deviation of 1.4% was included. Concerning the lower levels of heteroplasmy, our study demonstrated that the PNA/qPCR method was more sensitive. In fact, 44 muscle samples were identified as heteroplasmic in position 189, when only nine were detected in the older individuals by automated sequencing (Table 3).

This sensitive difference between sequencing and PNA/qPCR methods incited us to use a third detection method, the Southern blot, in order to evaluate and confirm the previously detected heteroplasmy by the PNA/qPCR method. The Southern blot method confirmed the PNA/qPCR results in detecting levels of heteroplasmy as low as 10%. As shown in Fig. 6a and b, among individuals of 40 years old or more, this technique detected the 189G form of heteroplasmy in proportions of 50–10%. Moreover, the relative quantification of the labeling by the probe on mutants using ImageQuant software confirmed the proportion of mutant levels analyzed through both methods. For example, in Fig. 6a, individuals 87 and 74 years old had an estimated percentage of mutants, respectively, of 44% and 21%, whereas the 77-year-old individual's labeling was estimated at 1% (considerably under this technique's level of detection). The estimated percentage of G variants with the PNA/qPCR method on these same individuals was 48% for the 87-year-old, 19.7% for the 74-year-old, and 5.3% for the 77-year-old. This was also true for lower levels as shown in Fig. 6b where the 43-year-old individual presented a Southern blot labeling of 15.5% with the M probe and of 13.2% with the PNA/qPCR method.

However, concerning the buccal samples, the Southern blot technique did not reveal the really low heteroplasmy levels detected by the PNA/qPCR technique, because the variant G rates remained very low in buccal cells with a maximum of 12.6%. As shown in families 2 and 4 (Fig. 4b), the 73- and 80-year-old individuals represented an estimated 12.6% and 11.5% of mutants with the PNA/qPCR method, these individuals showed a very weak labeling with the Southern blot technique, estimated  $\leq 5\%$  by the ImageQuant software. The difference in detection can be explained by the detection limits of the Southern blot technique, but also by an estimated percentage of errors of the PNA/qPCR technique and/or experimental differences.

Our study exerts another important fact: the accumulation of mutations is higher in skeletal muscle (20–50% in the older individuals) than in buccal cells (12.6% maximum) (Figs. 4a and 5). These high mutation levels in muscle tissue have been described previously (3,4). This difference could be explained by the important mitotic activity in buccal cells. mtDNA mutations, associated with aging, are frequently found to accumulate themselves

rapidly in tissues with high energetic needs and slow mitotic activity, like skeletal muscle, heart, and brain (6,23,24). This could explain why the mutation level in buccal cells did not have an accumulation threshold age (Fig. 4a) and why the variation in mutation percentage between a 40-year-old individual and a 60-year-old one cannot be found, because the rapid cell turn-over could conceal the mutation accumulation. Therefore, even in advanced ages (three individuals were over 80 years old among the buccal samples), the mutation level did not exceed 10%, cellular turn-over overcoming the cumulating mutational process.

The fact that the A189G mutation accumulates itself in a tissue-specific manner is clearly established by double sampling on two individuals (of 70 and 63 years old). For both, we collected muscle and buccal samples and analyzed them by the PNA/qPCR method. Concerning the 70 year old, the percentage of mutant molecules was 8.9% in buccal cells and 21.2% in muscle tissue. A similar situation was observed for the 63-year-old as the level of mutant was 3.5 times higher in muscle tissues than in buccal cells (3.9% vs. 14.3%). These results were confirmed by the Southern blot method (Fig. 6c) where the 70-year-old individual presented a higher labeling level in muscle tissue than in buccal cells. This was also confirmed by ImageQuant software; the level of mutation in muscle tissue was 22% compared with buccal cells where it was  $\leq 5\%$ . The variation in the mutation frequency between different tissues has been previously established in mitochondrial pathologies (10), implying once again the cellular turn-over.

The simultaneous use of three technologies in our work, besides demonstrating better sensitivity of the PNA/qPCR method, revealed an interesting technical point. Automated DNA sequencing is a widely used technique to detect mtDNA mutations; nevertheless, it has been demonstrated by serial dilution experiments that low levels ( $\leq 20\%$ ) of mtDNA heteroplasmy could not be reliably detected by this technique (25). In this study, we also showed that automated DNA sequencing did not allow a quantitative estimation of the proportion of A189G mutations <30%. This technique usually uses dye-labeled terminators, which are dideoxynucleotide triphosphates (ddNTPS) labeled with different fluorophores (26). A major drawback of the dye-terminator chemistry is the highly uneven peak pattern produced after the amplification reaction, the latter being largely dependent on the local sequence context and the DNA polymerase used (27). Dideoxynucleotides labeled with BigDye™ Terminator show more uniform peak heights and less G suppressions (14). However, Zakeri et al. (28) have analyzed the context dependency of peak height variations to improve data interpretations. A common problem occurs when a G follows an A. The size of dye-labeled G peaks was lower than the height of the preceding A peak in the sequencing pattern. This was true for sites of mixed A/G bases in heterozygous mutations (29). This variability in peak height reduced the base-calling accuracy of software and hindered heterozygous mutation detection. In the case of the 189 position, where the local sequence was either GAA or GAG, the G BigDye™ Terminator was incorporated with difficulties in comparison with the A BigDye™ Terminator, giving rise to an A peak with an underlying G peak in this sequence. These problems, low levels of heteroplasmy and G BigDye™ incorporation after or with A BigDye™, could explain detection differences between automated sequencing and the PNA/qPCR method as well as the differences in detection levels of 20% for Chinnery et al. (25) and of 30% in our study.

An early study already demonstrated difficulties in detecting heteroplasmy according to the different techniques used (30). The sensitive denaturing gradient-gel electrophoresis (DGGE)

revealed heteroplasmy detection at levels as low as 1%. This way, the mtDNA heteroplasmy frequency was more common in comparison with those reported by sequencing analysis. Very recently, Hancock et al. (31) evaluated the sensitivity of other detection techniques. Particularly, the automated DNA sequencing, including several chemistries and genetic analyzers, allowed detection at 30% levels. At 20% or 10%, the heteroplasmy was difficult to distinguish from the baseline noise, and was detectable only if the position was known. In contrast, the PNA technique was able to detect the mutation at the 5% level.

As seen in our work, the PNA-directed PCR clamping technique is a very specific and highly sensitive method to identify single nucleotide changes in DNA molecules (12). According to Murdock's team, it allowed the detection of mutant molecules at a level of 1% of total molecules by direct PCR (2,32). Individual nucleotide bases are attached to each peptide unit to provide a molecular design that enables PNA to hybridize to complementary nucleic acid targets according to the Watson and Crick base-pairing rules (33). PNA-DNA hybrids are more stable than DNA-DNA hybrids and PNA hybridization kinetics is less influenced by sodium concentration. PNAs are more sensitive to internal base-pair mismatch with their DNA complement; this can result in a 10 to 18°C lower melting temperature. Moreover, PNA is not recognized by polymerases and therefore cannot be copied or used as a primer. PNA probes are more robust detector molecules for real-time PCR methods than many of their DNA-derived counterparts, such as the hybridization probes, which are degraded during PCR by the endonuclease activity of Taq DNA polymerase (34). This technique, combined with real-time PCR, allowed a very sensitive quantification and an excellent reproducibility.

The PNA/qPCR sensitivity and accuracy compared with that of automated DNA sequencing could be interesting in forensic investigations where detection of heteroplasmy is not unusual. Technically, the advantage of the PNA/qPCR method is that it requires very few pre-PCR manipulations and no post-PCR. One run including amplifications without and with both probes is enough to obtain fast and reliable results on the level of heteroplasmy in a sample with minimum contamination possibilities. In order to limit the lack of precision, we can incorporate both WT and M controls into the run but also the experimental scale of G variant on the samples amplification run, adding internal precision to the method with a limited margin of error. It is nonetheless necessary to know ahead of time the studied samples' sequences in order to apply the corresponding PNA probe for the 189 position. Other age-related heteroplasmies have been described at positions 414 and 408 (1,2,4); their investigation could benefit from this technique and their hybridization region is less polymorphic sites requiring only two PNA probes. The PNA/qPCR method is rapid and flexible, avoids laboratory contaminations by limiting the number of manipulations, and enables a fine detection in levels  $\leq 10\%$ .

Moreover, the fact that the level of heteroplasmy varies in the different tissues of an individual, and that it can be expressed at very low levels in some (i.e., buccal cells vs. muscle tissue) increases interpretation difficulties. This is where a very sensitive method can be used to obtain very low levels of detection. Interpretation in forensic cases can sometimes be complicated because of the presence of heteroplasmies in the given sample (e.g., hair) and of its absence in others (e.g., blood). Consequently, demonstrating the presence of mutant molecules in two different samples can help eliminate uncertainties. In contrast, if the number of mutants is higher in the muscle samples, other tissue samples should be preferred (like buccal cells or blood) for automated

mtDNA sequencing in forensic cases to minimize interpretation uncertainties.

Because a correlation was clearly established between the age of the studied individual and the level of mutant molecules at position 189, the age of the subject tested should be considered when interpreting mtDNA typing results. As previously underlined by Calloway et al. (9), age and heteroplasmy should be considered in missing person cases when a significantly older individual is used as a reference for a missing younger maternal relative. In the same way, this information is useful for interpretation of mtDNA case-works including mass disaster biological remains.

It is obvious, as shown in Fig. 5, that evaluating only one heteroplasmic mutation point cannot help determine the analyzed individual's age and this was not the aim of this study. Nonetheless, we could suggest evaluating several heteroplasmic mutation points and/or mitochondrial deletions. In fact, mitochondrial deletions accumulate with age, and were quantified using real-time PCR by von Wurmb-Schwark et al. (35). Counter-crossing the values of several heteroplasmic mutation points or deletions could help recognize these age-related mutations in relation to human aging. We should also investigate a possible link between these mutations and osteologic markers of normal and pathological aging widely used in forensic medicine, increasing label performances in identification cases.

## Conclusion

The analysis of heteroplasmic A189G mutation by the PNA/qPCR method permitted a sensitive detection as well as reliable and reproducible quantification of mutant level. This technique allowed us to demonstrate the absence of the A189G transition in buccal cells in young individuals and its presence in older individuals from the same maternal lineage, concluding that it is a somatic mutation. Moreover, we demonstrated for the first time the accumulation with age of the A189G mutation in mitotic buccal cells in levels lower than 13%. In postmitotic muscle tissues, mutation accumulation was age-related and reached very high levels in individuals 60 years of age or older. Our results could have many implications in heteroplasmy interpretation in forensic caseworks but also in anthropological studies, for example in the investigations of great names of history.

## Acknowledgments

We are grateful to Pr. D. Rouge and B. Martinez (Service de Médecine Légale de Rangueil, Toulouse) for the access to muscle tissue materials.

We would like to thank S. Romac (Laboratoire d'Anthropologie Moléculaire, Strasbourg) for technical help, C. Cariven and N. Malet (INSERM U563, Toulouse) for technical advices, and S. Laurencin for helpful English writing.

Grant Sponsor: ACI "Espaces et Territoires: le Complexe Spatial Altaï-Baïkal. Plaque tournante des flux géniques en Haute Asie de la période protohistorique à l'époque moderne"

## References

1. Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* 1999;286:774-9.
2. Murdock DG, Christacos NC, Wallace DC. The age-related accumulation of mitochondrial DNA control region mutation in muscle, but no brain, detected by a sensitive PNA-directed PCR clamping based method. *Nucleic Acids Res* 2000;28(21):4350-5.



3. Wang Y, Michikawa Y, Mallidis C, Bai Y, Woodhouse L, Yarasheski KE, et al. Muscle-specific mutations accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(7):4022–7.
4. Del Bo R, Bordini A, Boneschi FM, Crimi M, Sciacco M, Bresolin N, et al. Evidence and age-related distribution of mtDNA D-loop point mutations in skeletal muscle from healthy subjects and mitochondria patients. *J Neurol Sci* 2002;202(1–2):85–91.
5. Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 1972;20(4):145–7.
6. Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1989;1:642–5.
7. Jazin EE, Cavelier L, Eriksson I, Orelund L, Gyllensten U. Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12382–7.
8. Wilson MR, Polansky D, Replogle J, Di Zinno JA, Budowle B. A family exhibiting heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region reveals both somatic mosaicism and pronounced segregation of mitotypes. *Hum Genet* 1997;100:167–71.
9. Calloway CD, Reynolds RL, Herrin GL Jr, Anderson WW. The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age. *Am J Hum Genet* 2000;66:1384–97.
10. Chinnery PF, Zwijnenburg PJG, Walker M, Howell N, Taylor RW, Lightowlers RN, et al. Nonrandom tissue distribution of mutant DNA. *Am J Med Gen* 1999;85:498–501.
11. Holtke HJ, Ankenbauer W, Muhlegger K, Rein R, Sagner G, Seibl R, et al. The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids – an overview. *Cell Mol Biol* 1995;41(7):883–905.
12. Ørum H. PCR clamping. *Curr Issues Mol Biol* 2000;2(1):27–30.
13. Kyger EM, Krevolin MD, Powell MJ. Detection of the hereditary hemochromatosis gene mutation by Real-Time fluorescence polymerase chain reaction and peptide nucleic acid clamping. *Anal Biochem* 1998;260:142–8.
14. Rosenblum BB, Lee LG, Spurgeon LG, Khan SH, Menchen SM, Heiner CR, et al. New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res* 1997;25(22):4500–4.
15. Nielsen PE, Elghom M, Buchardt O. Peptide nucleic acid (PNA), a DNA mimic with a peptide backbone. *Bioconjugate Chem* 1994;5:3–7.
16. Ørum H, Nielsen PE, Elghom M, Berg RH, Buchardt O, Stanley C. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res* 1993;21(23):5332–6.
17. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22:130–8.
18. Cattaneo C, Smillie DM, Gelsthorpe K, Piccinini A, Gelsthorpe AR, Sokol RJ. A simple method for extracting DNA from old skeletal material. *Forensic Sci Int* 1995;74:167–74.
19. Gibson UEM, Heid CA, Williams MP. A novel method for Real Time Quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;6:995–1001.
20. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:457–65.
21. Tully G, Bar W, Brinkmann B, Carracedo A, Gill P, Morling N, et al. Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclatures and interpretation of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Sci Int* 2001;124:83–91.
22. Budowle B, Allard MW, Wilson MR. Critique of interpretation of high levels of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA hypervariable region I from hair. *Forensic Sci Int* 2002;126:30–3.
23. Nagley P, Wei YH. Ageing and mammalian mitochondrial genetics. *Trends Genet* 1998;14(12):513–7.
24. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999;283:1482–8.
25. Chinnery PF, Taylor GA, Howell N, Brown DT, Parsons TJ, Turnbull DM. Point Mutations of the mtDNA control region in normal and neurodegenerative human brains. *Am J Hum Genet* 2001;68:529–32.
26. Rosenthal A, Charnock-Jones DS. New protocols for DNA sequencing with dye terminators. *DNA Seq* 1992;3:61–4.
27. Parker LT, Zakeri H, Deng Q, Spurgeon S, Kwok PY, Nickerson DA. AmpliTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase, FS Dye-Terminator sequencing: analysis of peak height patterns. *Biotechniques* 1996;21:694–9.
28. Zakeri H, Amparo G, Chen SM, Spurgeon S, Kwok PY. Peak height pattern in dichloro-rhodamine and energy transfer dye terminator sequencing. *Biotechniques* 1998;25(3):406–14.
29. Korch C, Drabkin H. Improved DNA sequencing accuracy and detection of heterozygous alleles using manganese citrate and different fluorescent dye terminators. *Genome Res* 1999;9:588–95.
30. Tully LA, Parsons TJ, Steighner RJ, Holland MM, Marino MA, Prenger VL. A sensitive denaturing gradient-gel electrophoresis assay reveals a high frequency in hypervariable region 1 of the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet* 2000;67:432–43.
31. Hancock DK, Tully LA, Levin BC. A standard reference material to determine the sensitivity of techniques for detecting low-frequency mutations, SNPs, and heteroplasmies in mitochondrial DNA. *Genomics* 2005;86:446–61.
32. Murdock DG, Wallace DC. PNA-mediated PCR clamping. In: Nielsen PE, editor. *Methods in molecular biology*, Vol 208: peptide nucleic acids: methods and protocols. Totowa NJ: Humana Press Inc, 2003: 145–64.
33. Elghom M, Buchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA, et al. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson–Crick hydrogen bonding rules. *Nature* 1993;365:556–68.
34. Wilhem J, Pingoud A, Hahn M. Comparison between Taq DNA polymerase and its Stoffel fragment for quantitative real-time PCR with hybridisation probes. *Biotechniques* 2001;30:1052–62.
35. Von Wurmb-Schwark N, Higuchi R, Fenech AP, Elfstroem C, Meissner C, Oehmichen M, et al. Quantification of human mitochondrial DNA in a real time PCR. *Forensic Sci Int* 2002;126:34–9.

Additional information and reprint requests:  
 Catherine Thèves, Ph.D.  
 INSERM  
 U563 Bat C  
 Purpan University Hospital  
 Place du Dr Baylac  
 31059 Toulouse  
 France  
 E-mail: Catherine.Theves@toulouse.inserm.fr

## RESUME

Ces dernières années, de nombreux travaux ont démontré la présence de mutations mitochondriales en relation avec l'âge dans divers types tissulaires. Le sujet de notre travail consiste à démontrer de manière fiable et spécifique la détection de telles mutations, d'établir leurs relations avec l'âge, et de déterminer si elles peuvent présenter un intérêt en Médecine Légale ou en Anthropologie afin d'augmenter les indices de détermination de l'âge.

Dans un premier temps, sur le tissu musculaire et les cellules buccales, nous avons mis au point une technique combinant la technologie PNA (Peptid Nucleic Acid) et la PCR en Temps Réel (qPCR), démontrant une détection sensible et une quantification des taux de mutation de l'hétéroplasmie A189G, et la relation avec l'âge dans le tissu musculaire. Ces résultats ont démontré la meilleure sensibilité de la technique PNA/qPCR par rapport à la technique de séquençage automatique pour la détection d'hétéroplasmie et ont pu être confirmés par la technique de Southern blot.

Dans un deuxième temps, nous avons travaillé à partir de tissu osseux provenant d'une part d'individus d'âge connu dans le cadre d'identification en Médecine Légale et d'autre part de squelettes de Sibérie Orientale identifiés par l'analyse de marqueurs ostéologiques du vieillissement. Nous avons démontré l'accumulation de l'hétéroplasmie A189G dans les individus âgés de plus de 70 ans pour ceux dont l'âge est connu, et dans les individus âgés identifiés comme tel par les indicateurs ostéologiques.

Le séquençage automatique nous a permis d'identifier deux autres hétéroplasmies (T72C et A73G) présentes dans des individus âgés de plus de 50 ans dans le tissu musculaire et osseux, hétéroplasmies déjà décrites dans la littérature.

L'ensemble de ces résultats peut présenter un intérêt dans la détection et l'interprétation de l'hétéroplasmie de l'ADN mitochondrial dans les études médico-légale et anthropologique.

---

## ABSTRACT

In recent years, numbers of reports have suggested that during individual natural aging, heteroplasmic point mutations accumulate in the control region of mitochondrial DNA (mtDNA) of some tissue types. In the present study, we searched to evaluate the most efficient method for detecting low levels of heteroplasmy, determine whether these mutations were really age-related and assess the possible implications of heteroplasmies in anthropological and forensic studies.

In first time, in two tissue types, muscle samples and buccal cells, we carried out the sensitive detection and quantification of point mutation A189G with peptid nucleic acid (PNA) and Real Time PCR (qPCR) together. Our results give additional information on the increase in mutation frequency with age in muscle tissue and revealed that the PNA/Real Time PCR is a largely more sensitive method than DNA sequencing for heteroplasmy detection, confirmed by Southern blot.

In second time, we worked on bone tissues, on the one hand, from individuals where age was known in forensic identification, on the other hand, from ancient skeletons of the Eastern Siberia, where age determination was done using bone indicators. We showed the A189G heteroplasmy accumulation on individuals of 70 years old or more, when age is known, and on identified old individuals by bone indicators.

The automatic sequencing revealed two other heteroplasmies (T72C and A73G) on individuals of 50 years old or more, in muscle and bone tissues, heteroplasmies already described in literature.

These investigations could be of interest in the detection and interpretation of mtDNA heteroplasmy in anthropological and forensic studies.