



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE SAAD DAHLAB BLIDA 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire
Laboratoire de Biotechnologies Environnement et Santé

MEMOIRE PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU MASTER

Filière : **Sciences de la Nature et de la Vie**
Spécialité: **Génétique**

THEME

**Contribution à la mise au point d'un protocole
d'analyse des régions HV1 et HV2 de l'ADN
mitochondrial humain appliqué dans le domaine
criminalistique**

Réalisé par : LOUMACHI Djamila & KHOUAS Lamia

Soutenu devant le Jury composé de :

M ^r MOHAMED SAID R.	Maître de conférences/B	Université Blida 1	Président
M ^{me} AISSANI R.	Maître de conférences/B	Université Blida 1	Examinatrice
M ^{me} KEBBAS S.	Maître de conférences/B	Université Blida 1	Promotrice
M ^r BECHAR M.	Ingénieur	Principal/Expert	Police
Scientifique	Co-promoteur		



Travail réalisé au Département d'Identification Génétique du laboratoire de Police Scientifique d'Alger

juillet 2018

REMERCIEMENTS

*Nos remerciements les plus distingués vont à **M^{me} KEBBAS S**, Maître de Conférences B, pour avoir bien voulu dirigé ce mémoire, pour ses judicieux conseils, sa patience, ses encouragements et sa disponibilité qui nous ont été d'une aide inestimable.*

Nous souhaiterions que chacun des membres de ce jury soit assuré de toute notre gratitude. C'est avec un grand honneur de soumettre notre projet de fin d'étude à votre regard scientifique.

*Nos remerciements s'adressent en premier lieu à **M^r MOHAMED SAID R**. Maître de Conférences B et chef d'option du Master Génétique, d'avoir accepté de nous intégrer au sein de son option et de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.*

*Nous remercions également **M^{me} AISSANI R**. Maître de Conférences B, d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail, ainsi que pour son enseignement de qualité et les connaissances qu'elle nous a transmises.*

*Nos plus vifs remerciements vont à **M^{me}** la Doyenne de la Faculté SNV, **P^r BENRIMA A**. et à la Chef de Département de Biologie et Physiologie Cellulaire **M^{me} SAADI L**., pour nous avoir donné l'occasion de nous inscrire en master.*

*Au terme de ce Master qui a été accompli au Département de Biologie Légale du Laboratoire Central de Police Scientifique et Technique, nous adressons nos sincères remerciements à **M^r FERRAGH A**. Contrôleur de police et directeur de la police judiciaire, à **M^r ZEKRI M**. Contrôleur de police et sous directeur de la police scientifique et technique, à **M^r BRAHITI H**. Commissaire principal de police et chef de service du laboratoire de la police et à **M^{me} BELKHIRAT S**. Commissaire principal de police et responsable du Département d'Identification Génétique du laboratoire de la police scientifique pour nous avoir permis de le réaliser dans les meilleures conditions.*

*Ce mémoire n'aurait pas pu avoir lieu sans un encadrement de très grande qualité, celui de **M^r BECHAR M**. Chef de section ADNmt au département de l'identification génétique, pour avoir encadré ce sujet et pour son appui scientifique et sa disponibilité durant la préparation de notre projet, ainsi que ses remarques constructives et la qualité des discussions qui ont ponctué ce travail.*

*Un remerciement sincèrement particulier est adressé à **M^r BENAKMOUM T**., **M^r HEBA K**., **M^{me} BELABAS S**., **M^{me} ZEGROUR S**. pour leur aide, soutien et leur écoute.*

*Enfin, nous adressons nos remerciements à tous les collègues du Département d'Identification Génétique du Laboratoire qui nous ont toujours soutenu et encouragé au cours de l'année, particulièrement à **Sonia, Sihem, Madja, Wassila, Nawel, Kenza, Assia, et Nouria** ainsi qu'à nos amies **Feriel et Amina**.*

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

La mémoire de mon père

Ma chère mère

Mon cher mari, mes enfants Ahmed, Lyna et Hana

Mes chers frères et sœurs

Mes chères amies Nadia et Lamia

Djamila

Dédicaces

Je dédie ce travail à:

La mémoire de mon père

Ma chère mère qui ne cesse de prier pour moi

Mon cher mari, mes enfants Sarah et Manil

Ma famille et ma belle famille

Mes chères amies Saliha, Baya, Abba, tata Lynda et tata Wafia

Lamia

Résumé

L'Analyse du polymorphisme de l'ADN mitochondrial humain (**ADNmt**) est devenue un outil utile d'identification dans le domaine forensique et la recherche de l'origine matrilinéaire, en particulier lorsque les échantillons sont dégradés ou en absence d'ADN nucléaire.

Afin de contribuer à la mise au point, au niveau du laboratoire de Police Scientifique d'Alger, d'un protocole pour le séquençage des deux régions hypervariables **HV1** et **HV2** de la région de contrôle **D-Loop** de l'ADNmt, nous nous sommes intéressés dans notre étude à trois types de prélèvements, le premier riche en ADN nucléaire (prélèvements buccaux et sanguins), le second faible en ADN nucléaire (restes musculaires) et le troisième dépourvu d'ADN nucléaire (prélèvements capillaires dépourvus de bulbes) .

Nous avons pu extraire l'ADN à partir de divers échantillons provenant de ces trois types de prélèvements, de le quantifier et enfin de l'amplifier et de le séquencer selon deux stratégies, utilisant six paires d'amorces permettant le séquençage des deux brins d'ADN sens et anti-sens des deux régions hypervariables **HV1** et **HV2** à chaque fois, ce qui permet de confirmer les résultats des mitotypes pour chaque échantillon.

La mise au point de cette technique dans les conditions du laboratoire de police scientifique d'Alger a été effectuée en ajustant les paramètres de l'amplification et du séquençage selon les quantités d'ADN nucléaire détectées. Grâce à ce protocole nous sommes parvenus à déterminer les mitotypes pour les deux premiers types d'échantillons et d'en déduire le lien maternel. Le résultat pour le troisième type d'échantillon était partiel mais encourageant pour un premier essai d'extraction d'ADNmt à partir des prélèvements capillaires dépourvus de bulbes.

Mots clés : ADNmt ; HV1-HV2 ; D-Loop ; Séquençage ; Mitotypes.

Abstract

The analysis of human mitochondrial DNA (mtDNA) polymorphism is a useful identification tool in the forensic domain and the search for matrilineal origin, especially when samples are degraded or there is no nuclear DNA.

In order to contribute to the development, at the Scientific Police laboratory of Algiers, of a protocol for the sequencing of the two hypervariable regions HV1 and HV2 of the D-Loop control region of the mtDNA, we have interested in our study to three types of samples, the first rich in nuclear DNA (oral and blood samples), the second low in nuclear DNA (muscle remains) and the third devoid of nuclear DNA (capillary samples devoid of bulbs).

We were able to extract the DNA from various samples from these three types of samples, to quantify it and finally to amplify and sequence it according to two strategies, using six pairs of primers allowing the sequencing of the two strands of Sense and antisense DNA of the two hypervariable regions HV1 and HV2 each time, which makes it possible to confirm the results of the mitotypes for each sample.

The optimization of this technique in the conditions of the scientific police laboratory of Algiers was performed by adjusting the amplification and sequencing parameters according to the amounts detected of nuclear DNA. This protocol, able us to determine the mitotypes for the first two types of samples and to deduced the maternal link. The result for the third type of sample was partial but promising for a first attempt to extract DNA from capillary samples without bulbs.

Key words: mtDN; HV1; HV2; D-Loop; Sequencing; Mitotypes.

المخلص

أصبح تحليل الحمض النووي الريبوزي المنقوص الأكسجين الميتوكوندري أو الدنا الميتوكوندري للإنسان (mtDNA) أداة تعرّف مفيدة في المجال الجنائي والبحث عن الأصل عن طريق الأمومة وخاصة عندما تكون العينات منحلّة أو لا يوجد الدنا النووي (ADNn) .

من أجل المساهمة في تطوير مختبر الشرطة العلمية بالجزائر قمنا بضبط بروتوكول لتحليل الدنا الميتوكوندري بتحديد التسلسل للمنطقتين شديدة التغيير **HV1** و **HV2** المتواجدتين في منطقة التحكم المسماة **D-Loop** ، للدنا الميتوكوندري لقد اهتمنا في دراستنا بثلاثة أنواع من العينات، الأولى غنية بالدنا النووي (عينات الفم والدم) ، والثانية فقيرة الدنا النووي (بقايا العضلات) والثالث خالية من الدنا النووي (العينات الشعرية الخالية من الجذور).

تمكنا من استخراج الحمض النووي من مختلف هذه العينات الثلاثة ، وتحديد كميته ، وتضخيمه باستخدام ستة أزواج من الدنا التمهيدي وفقا لإستراتيجيتين. تم إجراء تحسين هذه التقنية تحت ظروف المختبر من خلال ضبط معاملات التضخيم و تحديد تسلسل الحمض النووي وفقاً لكميات الدنا النووي التي تم الكشف عنها. بفضل هذا البروتوكول ، تمكنا من تحديد أنماط الميتوتيب (mitotypes) بالنسبة للحالة الأولى و الثانية واستنتاج علاقة الأمومة . كانت النتيجة بالنسبة للحالة الثالثة جزئية ولكنها مشجعة كمحاولة أولية لاستخراج الحمض النووي من عينات الشعر الخالية من الجذور.

الكلمات المفتاحية: الدنا الميتوكوندري-**D-Loop-HV2-HV1**- تحديد تسلسل الحمض النووي- أنماط

الميتوتيب.

Glossaire

Amorce : ADN simple brin, également appelée oligonucléotide, utilisé comme molécule «starter» ou « primer » pour la PCR.

ddNTP : Didésoxyribonucléotide, nucléotide dont les groupements 2'OH et 3'OH du ribose sont absents, utilisés dans différentes méthodes de séquençage de l'ADN.

D-Loop : région régulatrice ou de contrôle de l'ADNmt

Electrophorèse capillaire : Technique utilisée pour la séparation des acides nucléiques à l'aide de capillaires à base de silice. Elle est fondée sur le déplacement d'ions avec des vitesses de migration différentes selon leur taille sous l'effet d'un champ électrique.

Fluorochrome : Substance chimique capable d'émettre de la lumière fluorescente après excitation.

Hétéroplasmie : mélanges de plus d'un type d'ADNmt chez un individu.

Locus : un segment défini sur un codage chromosomique d'un gène, ou décrire un segment polymorphe, par exemple une séquence STR.

Marqueur génétique : un gène ou région chromosomique utilisée pour l'identification.

Amplicon : C'est un fragment d'ADN amplifié par PCR.

Pb : c'est la plus petite unité pour décrire la longueur d'une molécule ou d'un fragment d'ADN qui comprend deux bases complémentaires

PCR: réaction d'amplification en chaîne, méthode permettant le ciblage et l'amplification de courts segments d'ADN par l'utilisation de deux amorces flanquant la séquence d'intérêt ainsi que l'enzyme ADN polymérase.

SNP : polymorphisme mononucléotidique , cest un Polymorphisme de la séquence d'ADN défini par deux bases alternatives à une position donnée.

Sciences forensiques : Ensemble des principes scientifiques et des techniques appliqués à l'investigation criminelle, pour prouver l'existence d'un crime et aider la justice à déterminer l'identité de l'auteur.

Liste des abréviations

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ADNmt: Acide DésoxyriboNucléique mitochondrial

ADNn: Acide DésoxyriboNucléique nucléaire

Brin (AS): Brin anti sens

Brin (S): Brin sens

ddNTP : didésoxyNucléotide Ttri-Phosphate

D-Loop : Displacement **Loop** (Boucle de déplacement de l'ADNmt)

dNTP: désoxyNucléotide Ttri-Phosphate

EDNAP : European **DNA Profiling** : groupe Européen de Profilage de l'ADN

EMPOP : European DNA Profiling Group (EDNAP) : mtDNA **P**opulation Database (Base de données d'ADN mitochondrial du groupe EDNAP)

HV1: région Hypervariable 1

HV2: région Hypervariable 2

HV3: région Hypervariable 3

ISFG : International Society for **F**orensic **G**enetics (Société internationale de génétique forensique)

IUPAC: International Union of **P**ure and **A**ppplied **C**hemistry (Autorité reconnue pour le développement de règles à adopter pour la nomenclature, les symboles et la terminologie des éléments chimiques et de leurs dérivés)

Kb : Kilo paires de base = 1000 pb

OH : Origine de réplication du brin lourd

OL : Origine de réplication du brin léger

pb : paire de base

PCR: Polymerase Chain **R**eaction

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

STR: Short Tandem Repeat

Taq Polymerase: DNA-Polymerase de *Thermophilus aquaticus*

VR1: Région Variable 1

VR2: Région Variable 2

Liste des tableaux

Tableau I : Quelques différences fondamentales entre l'ADNmt et l'ADNn	3
Tableau II : Liste des symboles utilisés pour dénoter la présence d'hétéroplasmie dans l'ADNmt	18
Tableau III : Quelques échantillons biologiques utilisés dans les analyses de l'ADNmt	25
Tableau IV : Sources des échantillons qui ont fait l'objet de l'analyse d'ADNmt	28
Tableau V : Liste des amorces et leurs séquences selon la 1 ^{ère} stratégie	33
Tableau VI : Liste des amorces et leurs séquences selon la 2 ^{ème} stratégie	34
Tableau VII : Paramètres du Run ajustés selon la quantité d'ADN n	43
Tableau VIII : Résultats de la quantification d'ADNn dans les extractums des échantillons analysés	44
Tableau IX : Résultats du séquençage de HV1 selon les deux stratégies concernant le premier cas	51
Tableau X : Résultats du séquençage de la région HV2 selon les deux stratégies concernant le premier cas	55
Tableau XI : Résultats du séquençage de la région HV1 selon les deux stratégies concernant le deuxième cas	59
Tableau XII : Résultats du séquençage de la région HV2 selon les deux stratégies concernant le deuxième cas	60
Tableau XIII : Résultats du séquençage de la région HV1 selon les deux stratégies concernant le troisième cas	63

Liste des figures

Figure 1 : Organisation du génome humain	2
Figure 2 : fraction du génome nucléaire occupé par les gènes	4
Figure 3 : Composition des séquences répétitives du génome humain	5
Figure 4 : Structure mitochondriale	6
Figure 5 : Séquence de Référence de Cambridge original CRS et révisée rCRS	8
Figure 6 : Organisation de l'ADNmt humain	9
Figure 7 : Schéma représentatif de la Région de contrôle « D-Loop »	10
Figure 8 : Carte transcriptionnelle simplifiée du génome mitochondrial humain	11
Figure 9 : Cycle de réplication simplifié de l'ADNmt	12
Figure 10 : Transmission de l'information génétique.....	13
Figure 11 : Ségrégation mitotique et hétéroplasmie	15
Figure 12 : Exemples d'hétéroplasmie de séquence ou ponctuelle	16
Figure 13 : Exemple d'hétéroplasmie de taille	17
Figure 14 : Exemples de mutation de l'ADN mitochondrial et leurs nomenclatures selon les recommandations d'IUPAC et IFSG	18
Figure 15 : Distribution simplifiée de différents haplogroupes de l'ADNmt	19
Figure 16 : Distribution des haplogroupes mitochondriaux dans le monde	20
Figure 17 : Analyses de la séquence d'ADNmt de la famille du Tsar Nicholas II Montrant l'hétéroplasmie de séquence (Ivanov et al., 1996)	24
Figure 18 : Diagramme représentant les étapes d'analyse de l'ADNmt	27
Figure 19 : Représentation schématique de la 1^{ère} stratégie de séquençage des deux régions hypervariables HV1 et HV2 de la D-Loop de l'ADNmt.....	34
Figure 20 : Représentation schématique de la 2^{ème} stratégie de séquençage des deux régions hypervariables HV1 et HV2 de la D-Loop de l'ADNmt.....	34
Figure 21 : Schéma représentatif de la PCR multiplex pour HV1 et HV2	36
Figure 22 : Représentation schématique des molécules de ddNTPs didéoxynucléotides interrupteurs.....	38
Figure 23 : Représentation schématique du principe de la technique de séquençage d'ADN	39
Figure 24 : Schéma représentatif de la PCR monoplex pour HV1 et HV2	40
Figure 25 : Photographie du séquenceur « ABI Prism 3100 AVANT » Genetic Analyser d'Applied Biosystems.....	42
Figure 26 : Représentation schématique illustrant les principales étapes de fonctionnement du séquenceur lors d'un Run	43

Figure 27: Spectre des données brutes affiché par le logiciel « DATA Collection » pendant le séquençage du brin sens de HV1	46
Figure 28: Allure des électrophorègrammes pour une lecture sens (a) et une lecture anti-sens(b).....	47
Figure 29: Résultats de QV obtenus après traitement des données brutes du séquençage analysés avec les logiciels Sequencing (a) et SeqScap (b)	48
Figure 30: Verification de l'alignement des amorces d'un échantillon selon les deux stratégies	48
Figure 31: Exemple d'un rassemblement d'une paire d'amorces par le logiciel SeqScap qui permet l'alignement des deux séquences sens (S) et anti-sens (AS)	49
Figure 32: Résultats des mutations détectées au niveau de la région HV1(a) et HV2(b) du témoin positif « 9947A » présenté par l'interface du logiciel SeqScap	50
Figure 33:Présentation des données brutes d'un témoin négatif analysés avec le logiciel DATA Collection (a) et après traitement avec le logiciel SeqScap (b)	50
Figure 34 : Présentation des mutations détectées au niveau de la région HV1 de l'ADNmt : (a) de la mère présumée et (b) de la fille X, selon les deux stratégies	52
Figure 35 : Présentation des électrophorègrammes des mutations détectées au niveau de la région HV1 de l'ADNmt de la mère présumée et de la fille X (premier cas)	53
Figure 36 : Présentation des mutations détectées au niveau de la région HV2 de l'ADNmt (a) de la mère présumée et (b) de la fille X	54
Figure 37 : Présentation des électrophorègrammes des mutations détectées au niveau la région HV2 de l'ADNmt de la mère présumée et de la fille X.....	56
Figure 38 : Présentation des mutations détectées au niveau de la région HV1 de l'ADNmt extrait à partir de (a) prélèvement buccal de la mère présumée et (b) du prélèvement de restes cadavériques	58
Figure 39 : Représentation des mutations détectées au niveau la région HV2 de l'ADNmt (a) de la mère présumée (b) du cadavre X	61
Figure 40 : Présentation d'exemples d'électrophorègrammes des mutations détectées au niveau de la région HV2 de l'ADNmt de la mère présumée et du cadavre X.....	62
Figure 41 : Représentation des mutations détectées au niveau de la région HV1 de l'ADNmt (a) de la mère (b) de la fille	64
Figure 42 :Présentation d'un exemple de mutation détectée sur HV1 (troisième cas).	65
Figure 43: présentation des données brutes du résultat du séquençage de la région HV2 de l'ADNmt de la mère et la fille , analysés avec Data Collection (a) et les résultat de non assignement après traitement avec le SeqScap (b)	66
Figure 44 : Résultat de la recherche de l'haplogroupe du cadavre X présenté par l'interface de la base de données	67
Figure 45 : Diagramme illustrant les des deux points critiques de l'analyse d'ADNmt et les recommandations préconisées	70

Sommaire

Glossaire	viii
Liste des abréviations	ix
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
I. INTRODUCTION.....	1
II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	2
II.1 Organisation du génome humain	2
II.2 Le génome nucléaire	3
II.2.1 Distribution et typologie des gènes.....	4
II.2.2 ADN Intergénique	4
II.2.3 Séquences uniques	4
II.2.4 Répartition séquences répétées	5
II.2.5 Séquences en tandem (ADN hautement répétitif)	5
II.3 Mitochondrie et génome mitochondrial.....	6
II.3.1 Description et fonctions de la mitochondrie	6
II.3.2 Génome mitochondrial	7
II.3.3 Particularités génétiques de l'ADNmt	10
II.4 ADNmt et Polymorphisme génétique.....	14
II.4.1 L'ADNmt et l'hétéroplasmie	15
II.4.2 Les recommandations sur l'analyse de l'ADNmt et la nomenclature	17
II.5 Evolution du génome mitochondrial et notion d'haplotypes et d'haplogroupes	18
II.6 Applications de l'ADNmt	21
II.7 L'intérêt de l'ADNmt en sciences criminalistiques.....	21
II.8 Données bibliographiques sur l'analyse de l'ADNmt en Algérie	22
II.9 Cas d'utilisation de l'ADNmt à des fins d'identification génétique.....	23
II.10 Cas historiques de l'utilisation de l'analyse de l'ADNmt	23
II.11 Echantillons biologiques utilisés dans l'analyse de l'ADNmt	25
III. MATERIEL ET METHODES	26
III.1 Les précautions et les conditions d'analyses	28
III.2 Mise en tube des prélèvements biologiques	28
III.3 Extraction d'ADN	28
III.3.1 Protocole d'extraction pour les prélèvements sanguins et buccaux par le Kit d'AdemTech	28

III.3.2	Protocole d'extraction organique pour le prélèvement de restes musculaires	29
III.3.3	Protocole d'extraction organique pour les prélèvements capillaires	30
III.3.4	Quantification de l'ADN par PCR en temps réel	31
III.3.5	Procédure d'amplification et séquençage suivie pour l'analyse de ADN mt	33
IV.	RÉSULTATS ET DISCUSSION	44
IV.1	Résultats de la quantification	44
IV.2	Résultats de l'électrophorèse sur gel d'Agarose (minigel)	44
IV.3	Résultats du séquençage	45
IV.4	Validation des résultats	45
IV.5	Résultats du séquençage de HV1 et HV2 de la région D-Loop de l'ADN mt	51
IV.5.1	Premier cas : recherche de lien de maternité entre une mère présumée et une fille X	51
IV.5.2	Résultats du séquençage de la région HV1 de ADN mt	51
IV.5.3	Deuxième cas : recherche de lien de maternité entre une mère présumée et un cadavre X	58
IV.5.4	Troisième (cas Témoin): confirmation du lien de maternité entre une mère et sa fille	63
IV.6	Exemple de recherche bioinformatique de l'appartenance d'un haplotype à un haplogroupe	66
IV.7	Discussion générale	68
V.	Conclusion et perspectives	71
	Références bibliographiques	72
	Annexes 84	

I. INTRODUCTION

Les techniques de profils génétiques ou génotypage mettent en évidence les régions polymorphes du génome des individus. Elles permettent d'une part d'identifier les individus avec certitude et d'autre part d'établir les relations de parenté intrafamiliales (Butler, 2011).

Les méthodes appliquées aujourd'hui en routine sont complémentaires. L'analyse de microsatellites (Short Tandem Repeats, STR) présents au niveau du génome nucléaire, permet d'obtenir des résultats fiables, reproductibles et applicables à de nombreux types d'échantillons. Elle permet également l'étude de mélanges d'ADN de plusieurs individus et possède un pouvoir de discrimination très élevé. Cependant, certains échantillons très dégradés ou ne contenant pas d'ADN nucléaire ne peuvent pas se prêter au génotypage (Pham-Hoaia et al., 2017).

Pour associer les caractéristiques complémentaires de ces méthodes de génotypage, il s'avère nécessaire de développer la technique de séquençage de l'ADN mitochondrial. Du fait de l'existence d'un très grand nombre de copies de cet ADN par cellule et sa préservation à l'intérieur de mitochondries, son séquençage peut être réalisé sur des échantillons très dégradés. C'est une méthode moins discriminante que l'analyse des STR mais qui permet d'identifier une lignée maternelle et vient parfois consolider un résultat de génotypage par STR partiel (Butler et Hill, 2012).

Notre présente étude a été réalisée au niveau du département d'identification génétique du Laboratoire de la Police Scientifique d'Alger (LPS). L'objectif a été de contribuer à la mise au point d'un protocole d'identification génétique par séquençage des deux régions hypervariables HV1 et HV2 de l'ADN mitochondrial (ADNmt), caractéristique de la filiation matrilinéaire et de montrer ainsi, l'intérêt de cette technique pour l'identification génétique chez l'homme et de pouvoir l'appliquer à une grande variété d'échantillons.

Notre travail s'articule autour de trois chapitres à savoir la synthèse des données de la littérature relatives à l'identification et la filiation génétiques, permettant d'appréhender le thème de recherche, les méthodes employées dans la réalisation du travail, l'ensemble des résultats est exposé puis discuté afin de dégager les avantages et inconvénients de la méthode développée. Enfin, les conclusions mettront en évidence les perspectives de recherche.

II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1 Organisation du génome humain

Le génome humain est constitué de deux génomes distincts comme l'illustre la figure 1

-Le génome nucléaire (ADNn) situé dans le noyau des cellules sous forme de chromosomes (22 paires d'autosomes et 1 paire de chromosomes sexuels, XX chez la femme et XY chez l'homme), il est hérité des deux parents.

-le génome mitochondrial (ADNmt) localisé dans les mitochondries, d'origine maternelle, il est transmis par les mitochondries présentes dans les ovocytes (Lander et *al.*, 2001 ; Butler, 2005).

Ces deux génomes ont de nombreuses caractéristiques qui les différencient et qui sont énumérées dans le tableau I

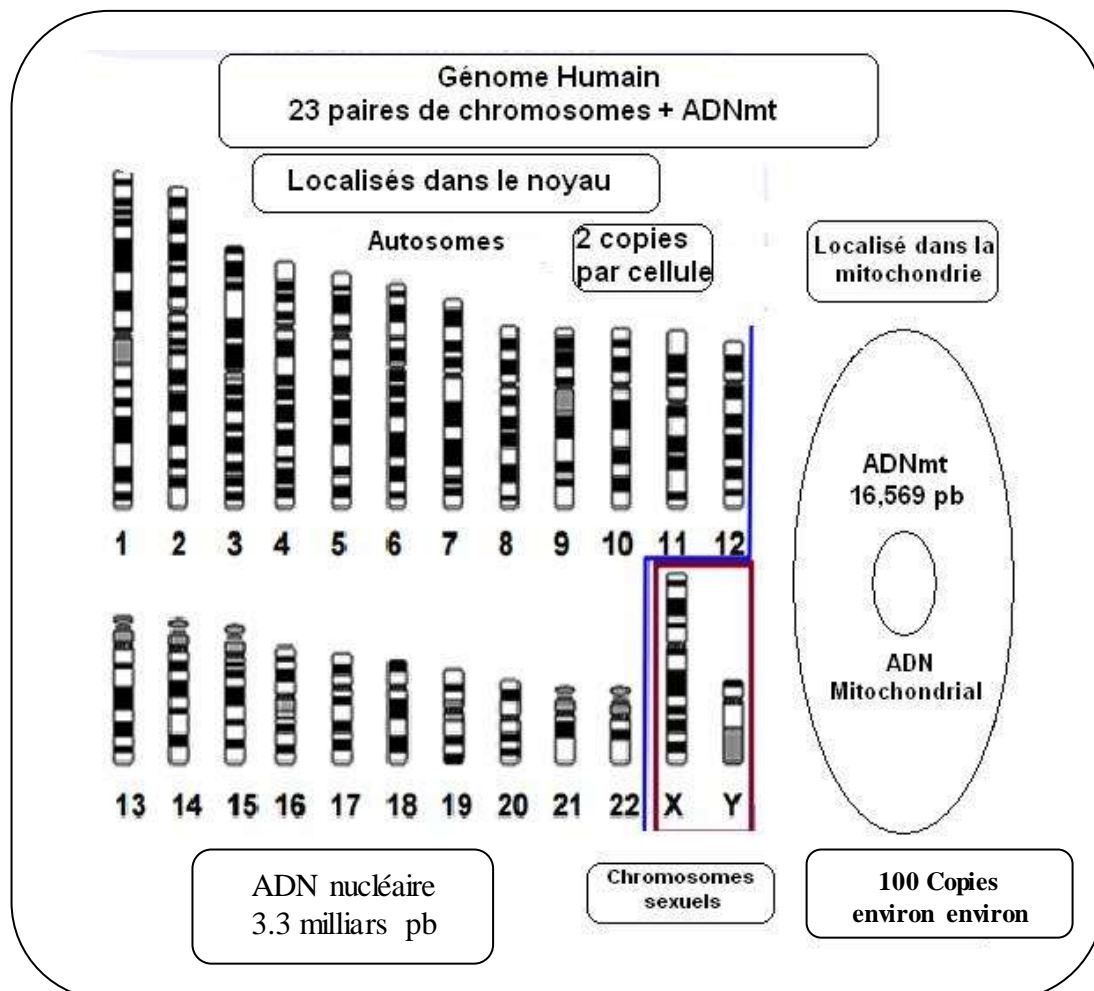


Figure 1: Organisation du génome humain (Butler, 2005)

Tableau I : Quelques différences fondamentales entre l'ADNm et l'ADNn

Caractéristiques	génomme nucléaire	Génomme mitochondrial
Nombre de molécules d'ADN	Lots de 23 chromosomes dans les cellules haploïdes et 46 dans les cellules diploïdes	Molécule circulaire en plusieurs milliers d'exemplaires par cellule (polyploïdie)
Quantité absolue par cellule	5-6 pg	0.045 pg
Nombre de gènes	~30000	37 (13 protéines -22 ARNt -2 RNr)
Taille	~ 3,3 x 10 ⁹ pb	16569 pb
Pourcentage d'ADN codant	~ 3%	~ 93%
Densité génétique	~ 1 par 40 000 pb	1 par 450 pb
Transmission entre génération	Biparental	Uniparental « maternelle »
Introns	trouvés dans la plupart des gènes	Absent
Transmission lors des divisions cellulaires	Etroitement contrôlée (lot de chromosomes strictement identique pour chaque cellule fille)	Contrôlée de façon lâche hétéroplasmie
Code génétique	Universel	Spécifique

(Butler, 2011)

II.2 Le génome nucléaire

Dans le noyau, le génome humain est constitué d'environ 3,3 milliards de paires de nucléotides. Cependant, le nombre de gènes semble être estimé à seulement 30000, le reste du génome est constitué d'introns, de portions de gènes non codantes et d'ADN inter génique (Venter et al., 2001).

II.2.1 Distribution et typologie des gènes

Les gènes cellulaires sont des séquences d'ADN localisées de façon précise sur un chromosome. Leur message est à l'origine de l'expression du phénotype cellulaire, ils codent pour environ 30000 protéines et leur taille peut varier de 1Kb à 2Mb (Venter *et al.*, 2001).

La fraction du génome nucléaire occupé par les gènes est relativement faible, estimé à 25% (les pseudo-gènes sont inclus) et répartis dans la majorité du génome, dont 3 % seulement codent pour des protéines. Les gènes sont transcrits en ARN, soit codants (ARNm traduits en protéines) soit non codant et non traduits (ARNr, ARNt). Selon leur typologie les gènes sont fréquemment morcelés en exons et introns ou très rarement en monoblocs tel que le gène de l'Histone H4. Ils peuvent être uniques ou répétés, chevauchants ou nichés (Gibson *et Muse*, 2004 ; Bergman, 2013).

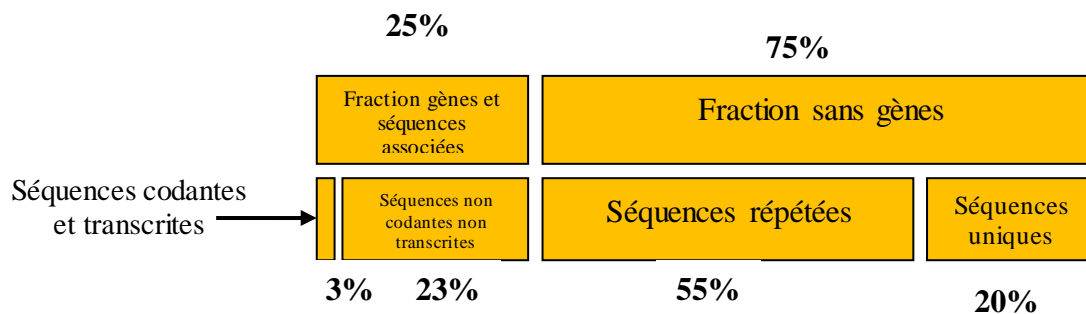


Figure 2 : fraction du génome nucléaire occupé par les gènes

II.2.2 ADN Intergénique

Aussi appelé ADN junk ou « poubelle », il constitue les régions majoritaires dans le génome, composé de segments de longueurs très diverses (de quelques nucléotides à quelques milliers).

L'ADN Intergénique constitue 75 % du génome humain (alors qu'il est minoritaire chez les eucaryotes inférieurs). Il aurait probablement un rôle important dans les modifications du génome humain en termes de variation, et d'évolution (Bergman, 2001).

II.2.3 Séquences uniques

Elle représente 20% du génome, ce sont des séquences non codantes très conservées, réparties sur tout le génome. Le taux de conservation chez les mammifères est très élevé (96 %). Elles sont souvent situées près des régions régulatrices de gènes des fonctions essentielles de la cellule (gènes du développement, ARNr...) (Richard *et al.*, 2008)

II.2.4 Répartition séquences répétées

Il y a deux groupes de séquences répétées : l'ADN répété dispersé et l'ADN répété en tandem, comme le montre la figure 3, les séquences répétées dispersées représentent 45% du génome, composées d'ADN moyennement répétitif. Elles dérivent d'éléments mobiles du génome (constitué de 3% de transposant et 42% de rétroposant), capables de se déplacer d'une région à l'autre. On les appelle éléments mobiles ou transposables, ou encore gènes sauteurs « jumping genes » (Pray, 2008).

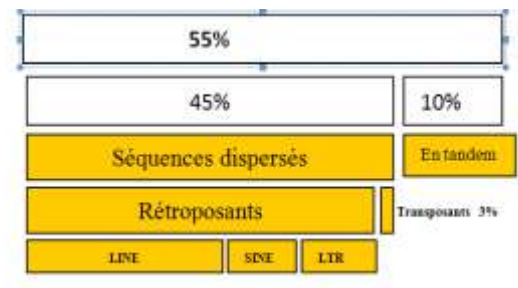


Figure 3: Composition des séquences répétitives du génome humain (Armour et al., 1989)

SINE : (Short Interspersed Nucleotide Elements) Courtes séquences nucléotidiques répétées dispersées
LINE : (Long Interspersed Nucleotide Elements) Longues séquences nucléotidiques répétées dispersées
LTR : (long terminal repeat sequence) séquence terminale longue répétée

II.2.5 Séquences en tandem (ADN hautement répétitif)

Elles représentent 10% du génome. Ce sont des séquences hautement répétées de quelques bases à quelques centaines de bases qui se suivent en tandem, elles sont dispersées dans le génome humain (en particulier au niveau de l'hétérochromatine), mais localisées toujours aux mêmes endroits du génome. Un polymorphisme de répétition est créé par des séquences courtes (dites séquences noyau ou motif de base), répétées de manière juxtaposée. Selon la structure et le nombre de répétitions du motif de base formant le polymorphisme, on distingue les minisatellites et les microsatellites (Coquoz et Taroni, 2006; Doutremepuich, 2012).

a- Minisatellites

Le motif de base de ces marqueurs, également appelés **VNTR** (Variable Number of Tandem Repeats) compte entre 9 et 100 pb. Il est réitéré entre deux et quelques centaines de fois à chaque locus, générant ainsi des fragments dont la longueur peut être de quelques centaines à quelques milliers de pb. Les minisatellites se trouvent plus fréquemment dans les régions subtélomériques des chromosomes, ils sont à la base des premières empreintes génétiques (Jeffreys et al., 1985 ; Vergnaud et Denoeud, 2000 ; Kelkar et al., 2011).

b- Micro-satellites ou STR (Short Tandem Repeats)

Ils sont constitués de 1 à 8 nucléotides répétés 5 à 50 fois, répétés un grand nombre de fois dans tout le génome (toutes les 25 à 100 kb), utilisés comme marqueurs génétiques pour l'établissement de profils génétiques. Ces profils génétiques présentent un fort pouvoir

discriminatoire avec une probabilité inférieure à 10^{-15} pour que deux personnes prises au hasard partagent les mêmes allèles (Verstrepen et *al.*, 2005 ; Butler et Hill, 2012).

II.3 Mitochondrie et génome mitochondrial

II.3.1 Description et fonctions de la mitochondrie

Les mitochondries sont des organelles cytoplasmiques d'une longueur d'environ 1 à 2 μm . Leur nombre est variable en fonction du type cellulaire, de quelques dizaines à quelques milliers, leur morphologie et leur localisation intracellulaire diffèrent également selon les tissus, leur demi-vie est de l'ordre de 6 à 10 jours suivant les cellules (Friedman et Nunnari, 2014). Elles dériveraient de l'endosymbiose d'une cellule eucaryote primitive qui aurait intégré une bactérie il y a environ 1,5 à 2 milliards d'années, lorsque l'atmosphère primitive s'est enrichie en dioxygène. Une étude phylogénétique indique que le plus proche parent de cette bactérie primitive connu actuellement est *Rickettsia prowazekii*, un parasite intracellulaire obligatoire. Au cours de l'évolution, la majorité des gènes de l'endosymbionte originel auraient été perdus ou bien transférés vers le noyau de la cellule eucaryote hôte. Cependant un petit nombre de gènes sont restés et ont donné lieu à la présence actuelle de mitochondries dans nos cellules (Lazcano et Peretó, 2017).

La membrane interne (MI) des mitochondries délimite une matrice, qui contient notamment les ribosomes mitochondriaux, des granules de phosphate de calcium, et l'ADN mitochondrial (ADNmt). La (MI) se replie vers l'intérieur de la mitochondrie en formant des crêtes mitochondriales, appelées également *cristae*, augmentant ainsi sa surface totale. Au niveau des crêtes se concentrent un grand nombre de protéines membranaires (Friedman et Nunnari, 2014).

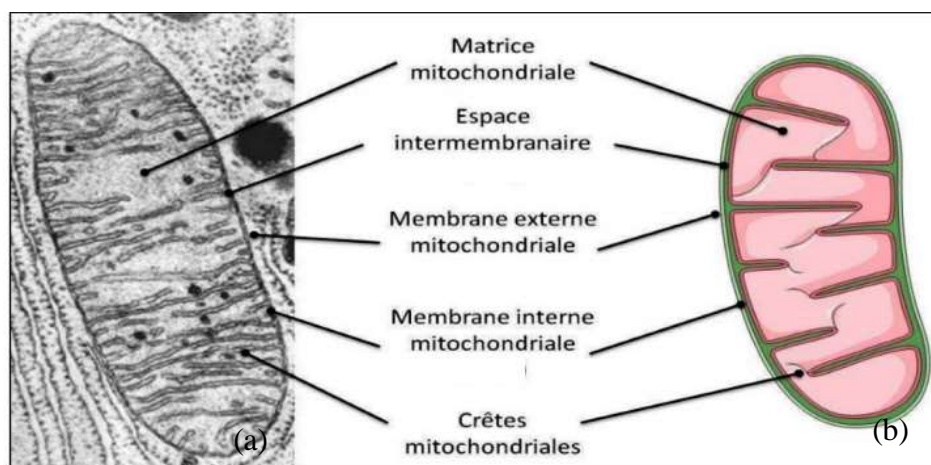


Figure 4 : Structure mitochondriale [(a) microscopie électronique à transmission (b) représentation schématique d'une mitochondrie] (d'après Goiran, 2016)

- Fonctions de la mitochondrie

Elle est le siège des réactions du catabolisme des acides aminés et du cycle de Krebs, de l'oxydation des acides gras et de la phosphorylation oxydative. Elle assure la phosphorylation oxydative et la production de l'énergie (Webster, 2012).

La mitochondrie a également pour fonction de participer à la synthèse des hormones stéroïdes générées à partir du cholestérol, par l'intermédiaire du cytochrome P450. D'autre part, avec le réticulum endoplasmique, la mitochondrie est le principal réservoir cellulaire de calcium, elle est impliquée dans la régulation de sa concentration dans le cytoplasme (Rasola et Bernardi, 2011).

Enfin, la mitochondrie est impliquée dans le processus de la mort cellulaire programmée, l'apoptose, par l'activation de divers mécanismes, notamment en cas de stress cellulaire ou de hausse de la concentration de Ca^{2+} (Gilkersonet *al.*, 2014)

II.3.2 Génome mitochondrial

II.3.2.1 Découverte et Séquençage du génome mitochondrial

La découverte de l'ADNmt date de 1963 par Nass et Nass, (Nass et Nass, 1963). Depuis, les études s'intéressant à cette molécule se sont multipliées marquant ainsi le début de l'ère de la génomique mitochondriale (Nicholls et Minczuk, 2014). La séquence du génome mitochondrial a été publiée en 1981 par (Anderson et *al.*, 1981), sous le nom de **Cambridge Reference Sequence**, (**CRS**) appelée aussi séquence d'"Anderson", le séquençage a été réalisé à partir de cellules placentaires d'un individu européen (Salas, 2012).

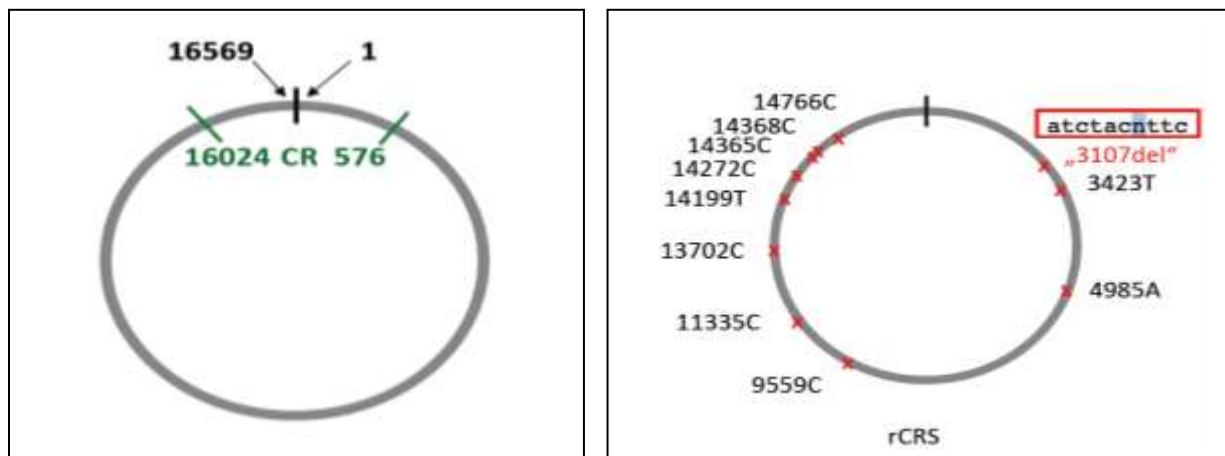
Avec une longueur totale de 16569 paires de bases, la séquence (**CRS**) a servi de référence pour la communauté scientifique. En 1999, une version révisée de la séquence CRS, appelée **rCRS** pour **revised Cambridge Reference Sequence** a été publiée à la suite de l'identification d'erreurs au niveau de 10 positions (3423T, 4985A, 9559C, 11335C, 13702C, 14199T, 14272C, 14365C, 14368C et 14766C) (Andrews et *al.*, 1999).

La nouvelle analyse a révélé aussi que cette séquence se compose de seulement 16568 pb, en effet la base à la position nucléotidique 3107 a été signalé par erreur dans la **CRS** et au lieu de redéfinir toutes les positions nucléotidiques en aval de cette position, elle est indiquée dans la **rCRS** comme une délétion (souvent indiqué par **N**) (Bandelt et *al.*, 2012).

La **rCRS** sert désormais de séquence de référence à laquelle est comparée toute nouvelle séquence d'ADNmt (Andrews et *al.*, 1999). Elle est entièrement disponible sur le site web de MITOMAP, qui est une base de données du génome mitochondrial humain

(<http://www.mitomap.org>). La figure 5 montre les positions nucléotidiques différentes entre la CRS et la rCRS (Bandelt et al., 2012).

MITOMAP: human mitochondrial genome database. [http://www .mitomap.org](http://www.mitomap.org)



CRS : Séquence de référence de Cambridge originale
GenBank: M63933
(Anderson et al.,1981)

rCRS : Séquence de référence de Cambridge révisée
GenBank: NC001807 (mitomap)
(Andrews et al.,1999)

Figure 5 : Séquence de Référence de Cambridge *original CRS* et *révisée rCRS* (Bandelt et al., 2012)

II.3.2.3 Organisation du Génome mitochondrial

Le génome mitochondrial ou l'ADNmt est localisé au niveau de la matrice mitochondriale et fait partie de structures nucléoprotéiques associées à la membrane interne mitochondriale, appelées nucléoïdes (Spelbrink et al., 2010) ; Prachař et al., 2016) il est circulaire, double brin. Le brin H (Heavy) dit brin lourd, riche en bases G (guanine) et le brin L (Light) dit brin léger riche en bases C (cytosine), ayant une longueur d'environ 16569 paires de bases). Il est particulièrement abondant, puisqu'il peut représenter jusqu'à 1% de l'ADN cellulaire total (environ 5000 copies d'ADN mt, soit 10 exemplaires d'ADNmt par mitochondrie environ), selon le type cellulaire, ces chiffres peuvent varier de façon extrêmement importante. Ainsi, dans la lignée germinale, l'ovocyte mature contiendrait jusqu'à 500 000 copies d'ADNmt alors que le spermatozoïde en contiendrait seulement 10 (Kéfi-Ben Atig et al., 2009).

L'ADNmt humain code pour 13 protéines, toutes des sous-unités de la chaîne respiratoire, 2 ARN ribosomiques (ARNr) et 22 ARN de transfert (ARNt), schématisée dans la Figure 6, la séquence de ce génome montre une extrême économie dans l'organisation des parties codantes, car il n'existe pas ou très peu de bases non codantes séparant deux gènes adjacents (Ojala et al., 1981). Le brin lourd code pour 15 ARNt, les 2 ARNr et 12 protéines, tandis que le brin léger code pour 7 ARNt et une protéine. Il existe également deux régions

non codantes, l'origine de réplication du brin léger (OL) et la région régulatrice ou de contrôle appelée **D-loop** (**D**isplacement **L**oop), elle est très variable en séquence et contient l'origine de réplication du brin lourd (OH) et trois promoteurs de transcription dont deux pour le brin H et un pour le brin L (Anderson et al., 1981 ; Andrews et al.,1999)

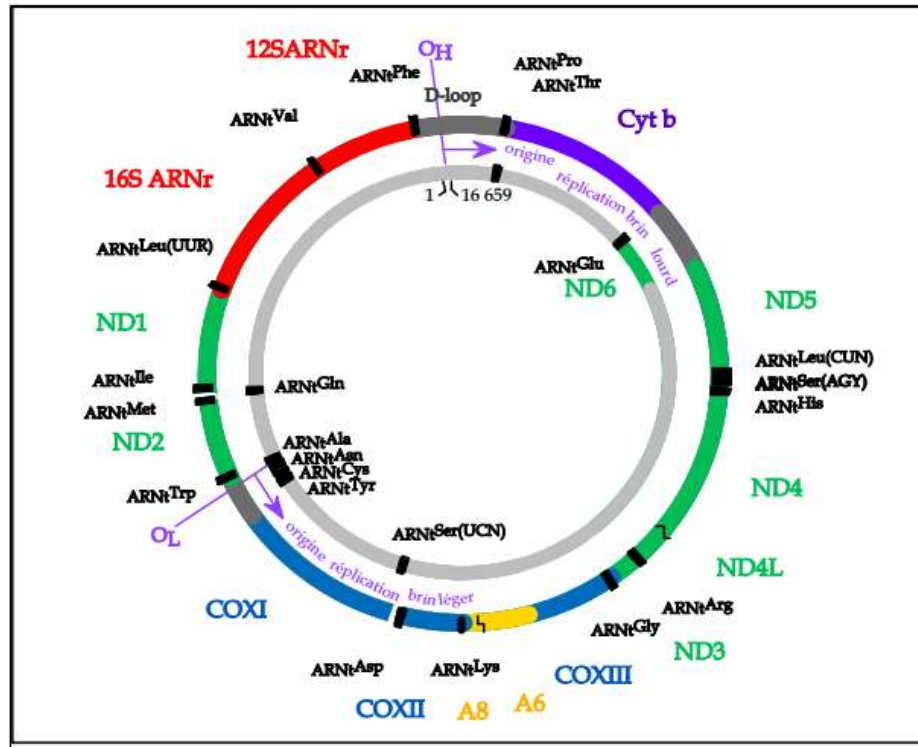


Figure 6 : Organisation de l'ADNmt humain (d'après Taylor et Turnbull, 2005)

- Le brin lourd (H) représenté par le cercle extérieur, le brin léger (L) par le cercle intérieur
- Gènes de la chaîne respiratoire **ND (ND1-2-3-4-4L-5-6) - Cyt b- CO (COI-II-III) - (A6 et A8)**
- Les ARNt Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, F-met, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val.
- Gènes des ARNr **12S et 16S.**
- Origine de réplication OH (brin lourd) OL (brin léger).

▪ Région de contrôle « D-Loop »

Le seul segment non-codant de l'ADNmt est la boucle de déplacement appelé aussi région de contrôle « RC », ayant une fonction de régulation, elle contient l'origine de réplication du brin lourd H (OH), les sites de régulation pour la transcription du brin L et H. Il s'agit d'une séquence de 1122 pb, située entre les gènes tRNA^{Pro} et tRNA^{Phe} à la position 16024 et 576 (Andersson et al., 1981 ; Andrews et al.,1999)

Cette région « D-loop », représentée schématiquement dans la figure 8, présente un degré de variation relativement important où la plus part des polymorphismes sont inclus dans

deux séquences Hyper-Variantes **HV1** et **HV2**, montrant donc un grand polymorphisme entre individus, d'où leur intérêt en sciences forensiques.

- La région hypervariable **HV1** : de la position 16024 à 16365 et d'une taille de 342pb
- La région hypervariable **HV2** : de la position 73 à 340 et d'une taille de 268pb

Il existe également une troisième région hypervariable **HV3** et deux régions variables **VR1** et **VR2** qui peuvent être aussi informatives (Butler, 2005; Coble et al., 2006).

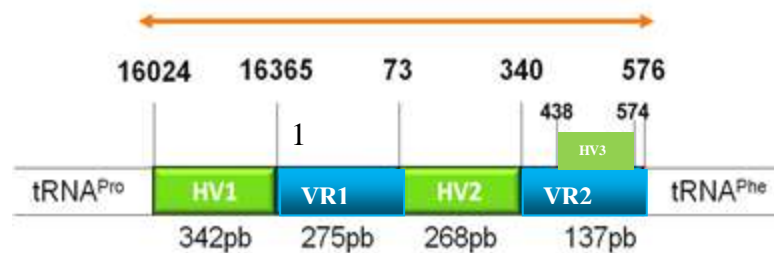


Figure 7 : Schéma représentatif de la Région de contrôle « D-Loop » (Coble et al., 2006)

II.3.3 Particularités génétiques de l'ADNmt

Le génome mitochondrial possède plusieurs particularités. Son code génétique est légèrement différent de celui de l'ADN nucléaire dit "universel". Quatre codons sont concernés, (UGA, AUA, AGA, AGG: respectivement STOP, Ile, Arg, Arg dans le code universel, et Trp, Met, STOP, STOP dans la mitochondrie. Une autre caractéristique est l'absence d'introns, en effet les gènes se trouvent contigus et parfois même chevauchants (Taanman, 1999 ; Kefi-Ben Atig et al., 2009).

II.3.3.1 La réplication et la transcription

▪ Transcription de l'ADNmt

L'ARN polymérase qui transcrit ADNmt est codé par l'ADNn. Les deux brins de l'ADN mitochondrial sont transcrits sous forme polycistronique. Leurs promoteurs respectifs, orientés en sens inverse, sont situés dans la D-Loop. Ils sont séparés par environ 150 pb et fonctionnent de manière indépendante. Le brin lourd possède deux sites d'initiation de la transcription : un site principal HSP1 et un site mineur HSP2, localisé à 77 pb en aval à l'extrémité 3' du gène de l'ARNt Phe. Le brin léger possède un seul départ de transcription localisé au niveau du promoteur LSP. Les deux brins sont transcrits intégralement, les longs transcrits primaires subissent une maturation en ARNm, ARNr et ARNt, ils sont ensuite clivés en ARNs individuels pour chaque gène (Clayton, 2003; Sohm, 2003).

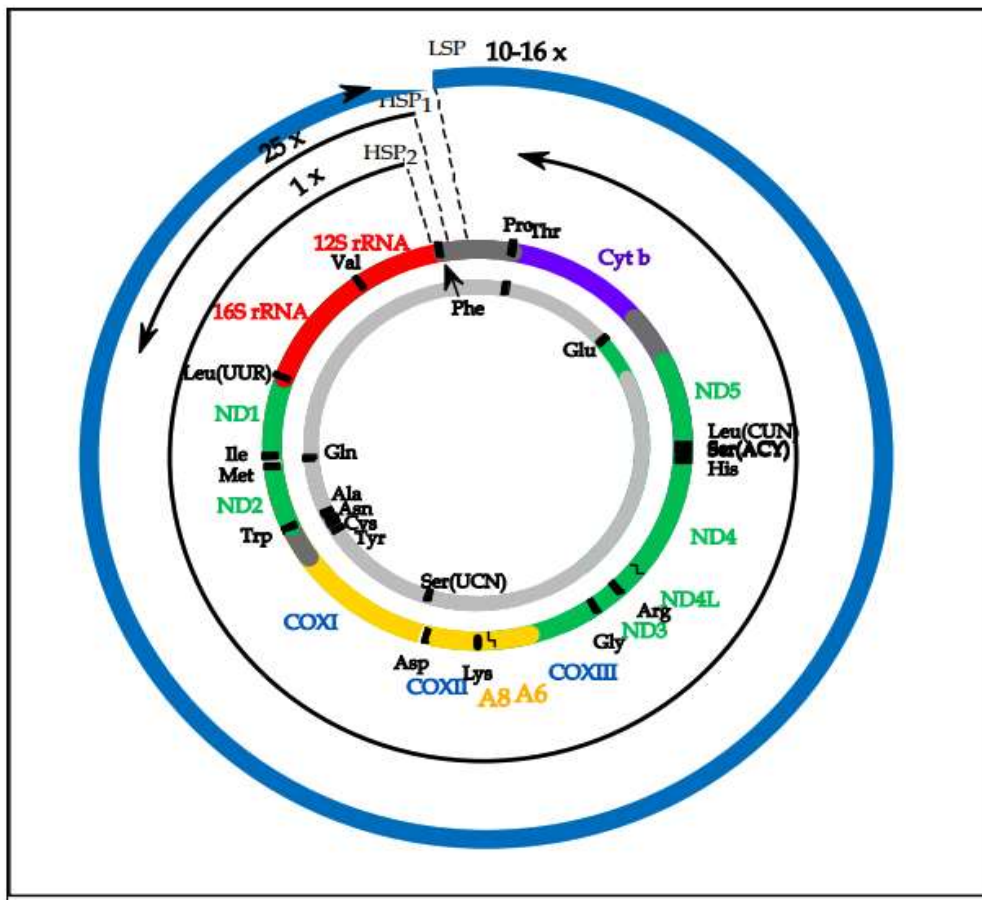


Figure 8 : Carte transcriptionnelle simplifiée du génome mitochondrial humain (King et Attaardi, 1993).

Trois transcrits sont synthétisés respectivement à partir des deux promoteurs de transcription du brin lourd HSP1 et HSP2; et du promoteur de transcription du brin léger LSP.

- Réplication de l'ADNmt

Le cycle de la réplication de l'ADNmt est illustré dans la figure 9. Il débute par la synthèse du brin H au niveau son origine de réplication spécifique (OH). Cette synthèse nécessite une amorce ARN, qui est transcrite à partir du (LSP), promoteur transcriptionnel du brin léger. L'amorce est ensuite coupée par la ribonucléase MRP (Mitochondrial RNA-Processing enzyme) puis allongée par l'ADN polymérase γ (polymérase spécifique de la mitochondrie). Cette copie du brin H (ARN-ADN) d'environ 680 nucleotides appelée **ADN 7S**, hybridée à sa matrice forme une structure en triple brin sous forme d'une boucle de déplacement d'où l'appellation « D-Loop » (**D**isplacement **L**oop). Une initiation de la synthèse du brin H permet l'élongation de la D-Loop et la réplication totale du brin H.

La synthèse du brin L débute à l'origine de réplication OL seulement lorsque cette région est rendue simple brin par la progression de la polymérase synthétisant le brin H (Nicholls et Minczuk, 2014 ; Berg Alonso, 2016).

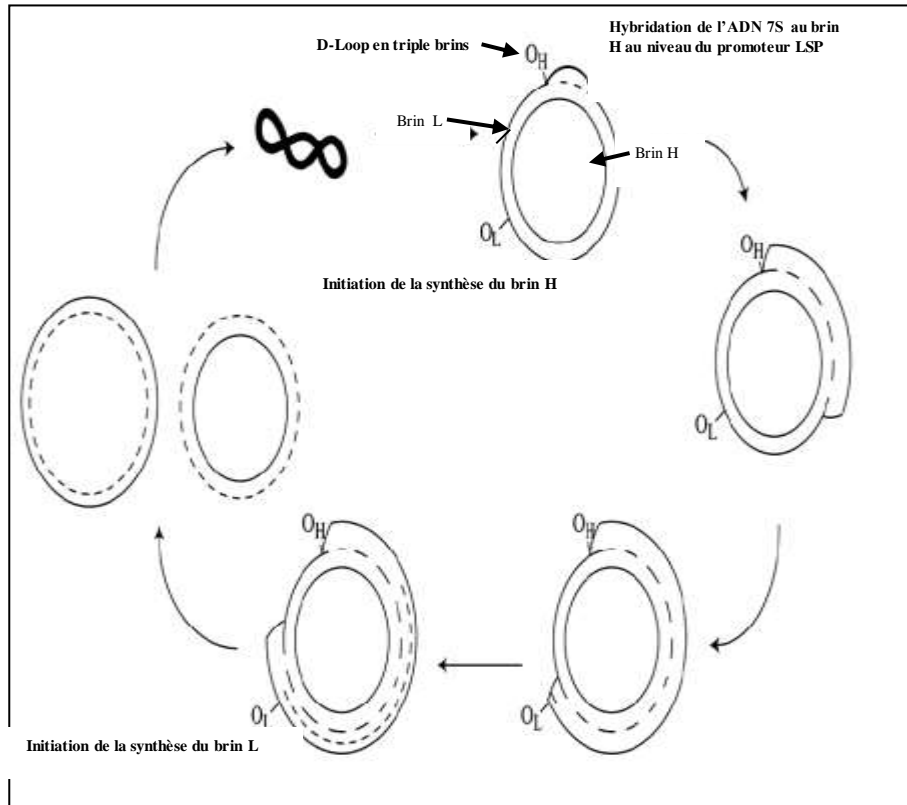


Figure 9 : Cycle de réplication simplifié de l'ADNmt (d'après Brown et al., 2005)

II.3.3.2 Mode de transmission matrilinéaire de l'ADNmt

La transmission de l'ADNmt s'effectue uniquement par la lignée maternelle. Ceci est dû au fait que lors de la fécondation, le capital mitochondrial de l'œuf fécondé provient pour l'essentiel du gamète femelle, dont le cytoplasme comporte bien davantage de mitochondries que le gamète mâle, qui recrute en quelques minutes des autophagosomes qui dégradent les mitochondries présentes avec leur ADN mitochondrial. De plus, des chercheurs ont identifié un gène, appelé *cps-6* qui code pour une endonucléase, qui semble être responsable de l'initiation du processus de détérioration dans les mitochondries paternelles (Wallace, 2007 ; Sato et Sato, 2013 ; Zhou et al., 2016).

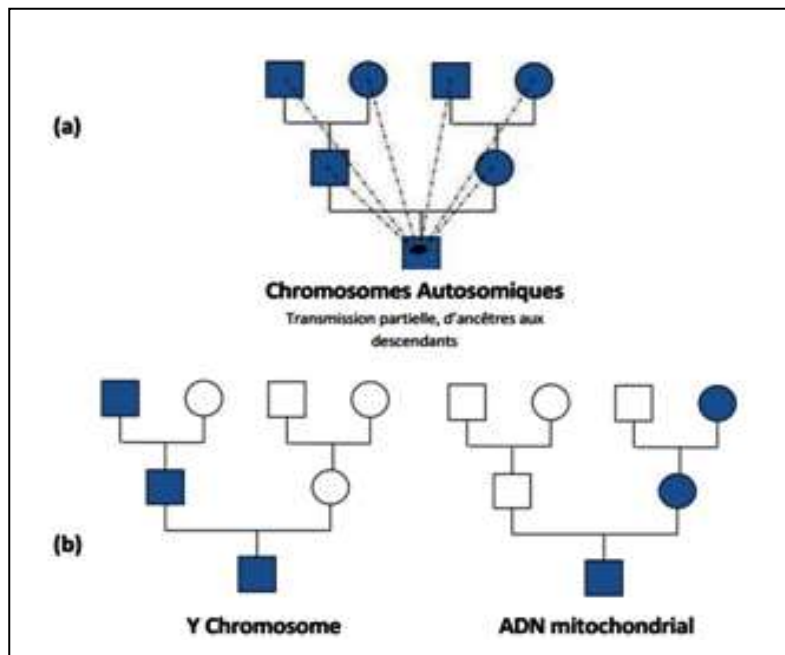


Figure 10 : Transmission de l'information génétique

(a) Transmission **partiel** de l'information génétique au niveau des **chromosomes autosomiques** à travers les générations.

(b) Transmission **totale** de l'information génétique contenue au niveau du chromosome **Y** (de père en fils) et de l'**ADN mitochondrial** (de mère à enfant) (Butler, 2005)

II.3.3.3 Taux de mutation de l'ADNmt

L'ADNmt présente un taux moyen de mutation de 10 à 17 fois supérieur à celui de l'ADN nucléaire. Même en excluant la D-Loop ce taux demeure élevé. En effet, en fonction de type de mutation considéré, le taux de variation de l'ADNmt est de 0,017 mutation par site et par million d'années (Ma). L'évolution rapide de l'ADNmt est due d'une part, à l'absence de protéines protectrices (les histones), au manque de fidélité de la réplication et à la défaillance du système de réparation des erreurs commises par l'ADN polymérase mitochondriale. D'autre part, la proximité de la chaîne respiratoire qui génère des quantités importantes d'espèces oxygénées réactives (**ROS : Reactive Oxygen Species**), expose le génome mitochondrial à des dommages oxydatifs. Ce risque est d'autant plus important lors de la réplication car l'ADN mitochondrial reste longtemps exposé sous forme simple brin, ce qui le rend particulièrement sensible aux attaques radicalaire (Liu et *al.*, 2003 ; Kefi-Ben Atig et *al.*, 2009).

Les mutations ne sont pas uniformément réparties sur l'ensemble du génome mitochondrial, elles s'accumulent, préférentiellement, au niveau de la D-Loop. L'hétérogénéité de la vitesse de mutation au sein de la D-Loop est due à la présence de sites appelés « points chauds » pour lesquelles les mutations sont très fréquentes. De même, les taux de mutations de la D-Loop varient en fonction des méthodes statistiques et phylogénétiques utilisées (Taylor et Turnbull, 2005).

II.4 ADNmt et Polymorphisme génétique

Le polymorphisme génétique est la coexistence de plusieurs allèles pour un gène ou un locus donné, dans une population. Il concerne aussi bien le génome nucléaire que le génome mitochondrial et touche de même la fraction codante et non codante de l'ADN. On rencontre donc des variations au niveau de l'ADNmt, de gènes nucléaires, de séquences non codantes répétées ou dispersées, d'autosomes, du chromosome X, du chromosome Y, etc.

Dans le domaine forensique, trois types de polymorphismes génétiques sont analysés (i) le polymorphisme des microsatellites ou STR (Short Tandem Repeat), (ii) le polymorphisme ponctuel de séquence SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (ii) du chromosome Y, et (iii) celui de l'ADNmt. Le polymorphisme génétique au niveau du chromosome Y et de l'ADN mitochondrial sont considérés comme des marqueurs haplotypiques ou uni-parentaux (Gill *et al.*, 1985; Jeffreys *et al.*, 1985).

Le polymorphisme génétique est la conséquence directe de changements survenus dans la séquence de l'ADN. Ces modifications peuvent être causées par divers mécanismes tels que les mutations ponctuelles (transitions, transversions, insertions et délétions) ou les transpositions d'un segment de l'ADN (Kefi-Ben Atig *et al.*, 2009)

Les mutations ponctuelles sont la source prépondérante du polymorphisme. Elles n'intéressent qu'une région très limitée du génome (quelques nucléotides). Les modifications les plus simples correspondent au remplacement d'une base de l'ADN par une autre (SNP, Single Nucleotide Polymorphism). Ces remplacements sont soit des transitions (substitution d'une base purique par une base purique ($A \leftrightarrow G$) ou d'une base pyrimidique par une base pyrimidique ($C \leftrightarrow T$)), soit des transversions (substitution d'une base purique par une base pyrimidique et réciproquement ($A, G \leftrightarrow C, T$)). Les autres mutations ponctuelles correspondent à l'insertion ou la délétion d'une base (Runa *et Walsh*, 2006 ; Razafindrazaka, 2010)

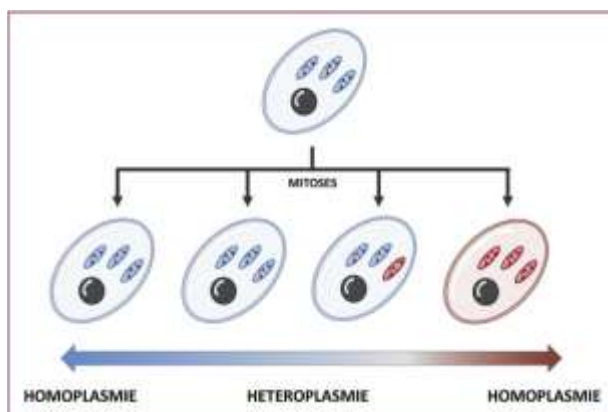
Lorsqu'elles se produisent à proximité ou dans les gènes eux-mêmes, les mutations modifient le cadre de lecture de ces gènes, ce qui peut altérer (ou non) la transcription et la traduction de l'information génétique. Par contre, lorsque les mutations surviennent dans l'ADN non codant, elles ne sont pas soumises à une quelconque pression de sélection et peuvent s'accumuler dans le génome de génération en génération. Ces caractéristiques permettent d'expliquer que les régions non codantes de l'ADN présentent des variations importantes d'un individu à l'autre. C'est le cas de deux régions hypervariables de la région D-Loop de l'ADNmt (Budowle *et al.*, 2003)

La très grande variabilité de ces deux régions a notamment permis un usage en identification individuelle puisqu'il est possible d'exclure un lien de parenté par lignée maternelle entre deux individus avec une probabilité de succès de plus de 99%. Inversement, si le même haplotype mitochondrial est observé entre plusieurs individus de populations différentes, il est donc probable que ces deux populations aient été liées par le passé ou que le haplotype mitochondrial en question ait été introduit d'une population à l'autre (Budowle et *al.*, 2003 ; Kefi-Ben Atig et *al.*, 2009)

II.4.1 L'ADNmt et l'hétéroplasmie

Un individu peut avoir au sein de certaines cellules d'un de ses organes des mitochondries ayant un génome mitochondrial différent de celui porté par la majorité de ses mitochondries. Cet état est appelé hétéroplasmie. C'est la conséquence de l'apparition d'une mutation au sein du génome mitochondrial, qui est propagée lors de la fission des mitochondries à plusieurs, voir de nombreuses copies de la mitochondrie dans laquelle la mutation est initialement apparue (Lagerström-Fermér et *al.*, 2001 Friedman et Nunnari, 2014).

Cet état hétéroplasmique est généralement perpétué lors de la division cellulaire, en fonction de la répartition des mitochondries de la cellule en division entre ses deux cellules filles. L'hétéroplasmie peut alors atteindre une fréquence importante au sein d'un organe donné. L'hétéroplasmie peut également être héritée si l'ovocyte fécondé lors de la conception était également hétéroplasmique (Wallace et Chalkia, 2013; Ladoukakis et Zouros 2017). La figure 11 décrit la répartition aléatoire lors des divisions cellulaires dans les cellules filles, des mitochondries ayant des formes d'ADNmt normales ou mutées.



Lors des divisions cellulaires, les mitochondries se répartissent au hasard dans les cellules filles. Le génotype mitochondrial évolue donc au cours de ces divisions, pouvant être normal ou enrichi en formes mutées.

Figure 11 : Ségrégation mitotique et hétéroplasmie (Cassereau et Codron, 2016)

Les méthodes d'analyse ne permettent pas de séparer les deux types d'ADN mitochondriaux (mutés et non mutés) présents dans la cellule. Lors de la révélation, les deux séquences des deux ADN mitochondriaux vont se superposer, le chromatogramme va présenter une hétéroplasmie. Il existe deux types d'hétéroplasmie, celles induisant une variation de séquence (hétéroplasmie ponctuelle) et celles induisant une variation de longueur (hétéroplasmie de taille) (Michikawa *et al.*, 1999 ; Theves *et al.*, 2006).

a- Hétéroplasmie ponctuelle

Il ya une transversion ou une transition sur l'un des deux brins d'ADN, qui apparaît sous forme d'une superposition de deux bases sur le chromatogramme à une même position. La présence d'une hétéroplasmie ponctuelle va augmenter le pouvoir discriminant de l'analyse de l'ADNmt (Ivanov *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 2010).

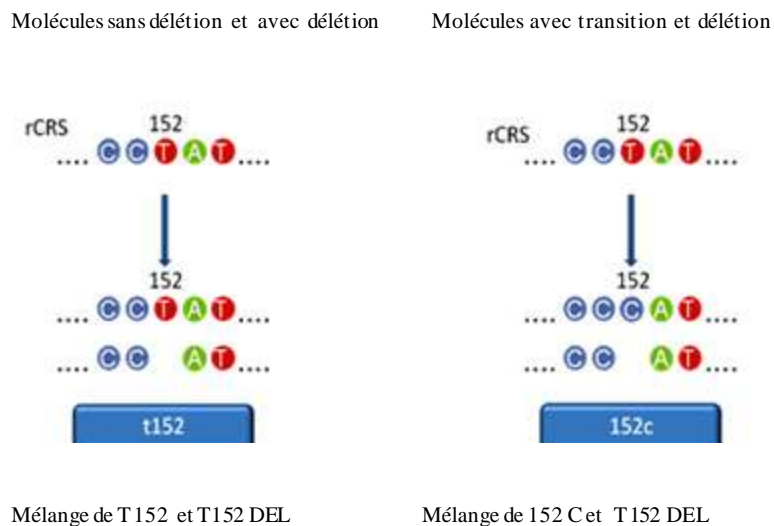


Figure 12 : Exemples d'hétéroplasmie de séquence ou ponctuelle (parson *et al.*, 2014)

b-Hétéroplasmie de taille

Ce type d'hétéroplasmie est fréquemment observé au niveau des régions hypervariables de la région de contrôle de l'ADNmt HV1, HV2 et HV3 qui contiennent des segments de séquences qui sont homopolymériques (par exemple une région homopolymérique, poly C dans HVI, qui commence au nucléotide numéro 16184. Quand une transition en position 16189 (T>C) est observée, une hétéroplasmie souvent apparaît (Wilson *et al.*, 2002 ; Berger *et al.*, 2011)

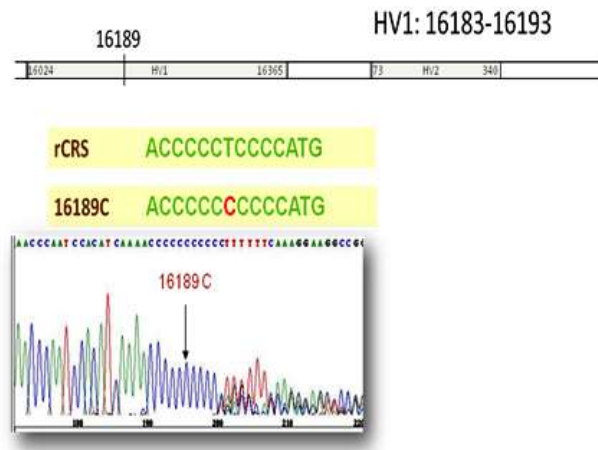


Figure 13 : Exemple d'hétéroplasmie de taille (Berger et al., 2011)

II.4.2 Les recommandations sur l'analyse de l'ADNmt et la nomenclature

La séquence d'"Anderson" ou rCRS est utilisée comme étalon pour la comparaison avec les séquences de l'ADN mitochondrial déterminé sur du matériel biologique analysé. Plutôt que de faire mention sur le résultat obtenu pour une séquence déterminée complète, on note uniquement les positions dans la séquence où une différence avec la séquence "d'Anderson" a été relevée, toutes les autres positions de la séquence sont considérées comme étant les mêmes que la rCRS (Wilson et al., 1995; Bär et al., 2000 ; Bandelt et al., 2014)

Nommer les séquences d'ADNmt en se référant à une séquence standard fournit un langage et un outil facile pour décrire la variation observée dans les populations humaines. Ainsi des lignes directrices sur la nomenclature sont décrites et doivent être utilisées par toute la communauté forensique (Budowle et al., 2003 ; Parson et al., 2014).

Pour les substitutions, par exemple, sur le site 73 la séquence d'Anderson a un A, cependant, une grande partie de la population à ce site est décrite comme 73G. La notation est différente pour les mutations de type INDEL produites par des insertions de bases ou au contraire par la suppression ou délétion de bases. Comme leur nom l'indique les insertions sont des mutations introduites par l'apparition d'une base supplémentaire après un locus donné. Ainsi l'expression 239.1C dans l'exemple de la figure 15 signifie qu'une base supplémentaire cytosine (C) a été trouvée juste après la position 239.

Les suppressions de bases constituent une autre forme de mutation. La notation employée pour indiquer cette délétion est exprimée par la position du locus où la suppression s'est produite, suivie par le signe moins ou par les trois lettres DEL. Ainsi 249- ou 249DEL indique la délétion d'une base qui, selon le modèle de référence, aurait dû se trouver au locus

249. Si une ambiguïté dans la lecture est observée sur n'importe quel site, le numéro de base du site est cité suivi d'un "N" par exemple sur le site 16125N. La figure 14 décrit quelques mutations de l'ADNmt et leur nomenclature selon les recommandations de « IUPAC » (International Union of Pure and Applied Chemistry) et « IFSG » (International Society for Forensic Genetics) (Doutremepuich, 2003 ; Parson *et al.*, 2014).

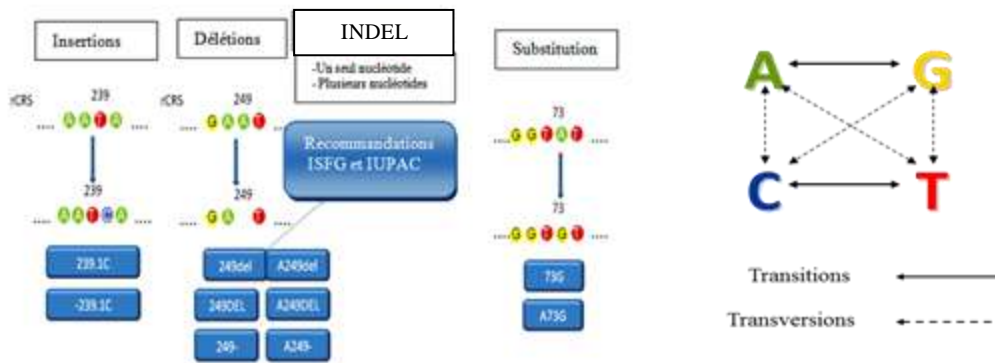


Figure 14 : Exemples de mutation de l'ADN mitochondrial et leurs nomenclatures selon les recommandations d'IUPAC et IFSG (Budowle *et al.*, 2003)

Des symboles sont utilisés pour exprimer l'hétéroplasmie, à titre d'exemple, la présence d'une hétéroplasmie à la position 73 d'un mitotype d'une personne donnée (en se référant au Tableau II) pourra dans les résultats être exprimée G73R, la lettre R représente les bases A ou G, ce qui signifie que certaines mitochondries sont 73 A alors que d'autres sont 73 G, ce qui représente la condition normale. D'autres possibilités hétéroplasmiques sont présentées dans le tableau II.

Tableau II : Liste des symboles utilisés pour dénoter la présence d'hétéroplasmie dans l'ADNmt

symbole	signification	symbole	signification	symbole	signification
U	U (uracile)	H	A ou C ou T	Y	C ou T
M	A ou C	D	A ou G ou T	K	G ou T
R	A ou G	N	G ou A ou T ou C	V	A ou C ou G
W	A ou T	S	C ou G	B	C ou G ou T

II.5 Evolution du génome mitochondrial et notion d'haplotypes et d'haplogroupes

Les études des mutations de l'ADNmt de diverses populations humaines mondiales ont permis de mettre en évidence différents haplotypes qui ont été regroupés, d'après leurs

relations phylogénétiques, en haplogroupes. Ces haplogroupes mitochondriaux sont répartis en différentes familles très fréquentes dans certaines régions géographiques voire même dans certaines populations. On distingue aujourd'hui divers ensembles d'haplogroupes rencontrés à des fréquences élevées en Afrique, en Europe, en Asie, dans certaines îles du Pacifique et en Amérique (Yacoubi Loueslati et *al.*, 1998; Bekada, 2015). Un arbre phylogénétique simplifié des relations de parenté entre les divers haplogroupes mitochondriaux est présenté dans la figure 15 .

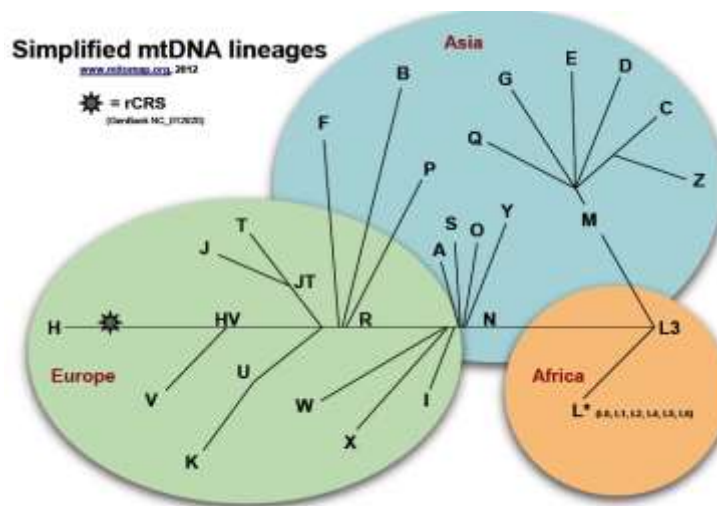


Figure 15: Distribution simplifiée de différents haplogroupes de l'ADNmt (www.mitomap.org, 2012)

Naturellement, des haplogroupes communément observés dans une région donnée sont aussi retrouvés ailleurs (mais à des fréquences plus basses), en raison des mouvements migratoires de populations. Une carte géographique de la répartition des haplogroupes de l'ADNmt est présentée dans la figure 16.

Les lignées A, B, C et D sont fréquentes en Amérique et à l'Est de l'Asie. Les populations européennes ont des fréquences élevées d'haplogroupes H, HV, I, J, K, T, U, V, W et X. Les lignées fréquentes au Proche-Orient, au sud de l'Asie et en Océanie sont M et N (lignées ancestrales), E, F, G, P, Q, R, Y et Z (Umetsua et Yuasab, 2005; Coudray et al., 2009). La lignée U6 est uniquement détectée dans les populations nord-africaines (Kéfi-Ben Atig et *al.*, 2009 ; Aboukhalid, 2012 ; Bekada, 20015 ; Saoudi, 2016). Enfin, les régions sub-sahariennes présentent un pourcentage élevé d'haplogroupes de la famille L. (Ingman et *al.*, 2000 ; Kivisild, 2015).

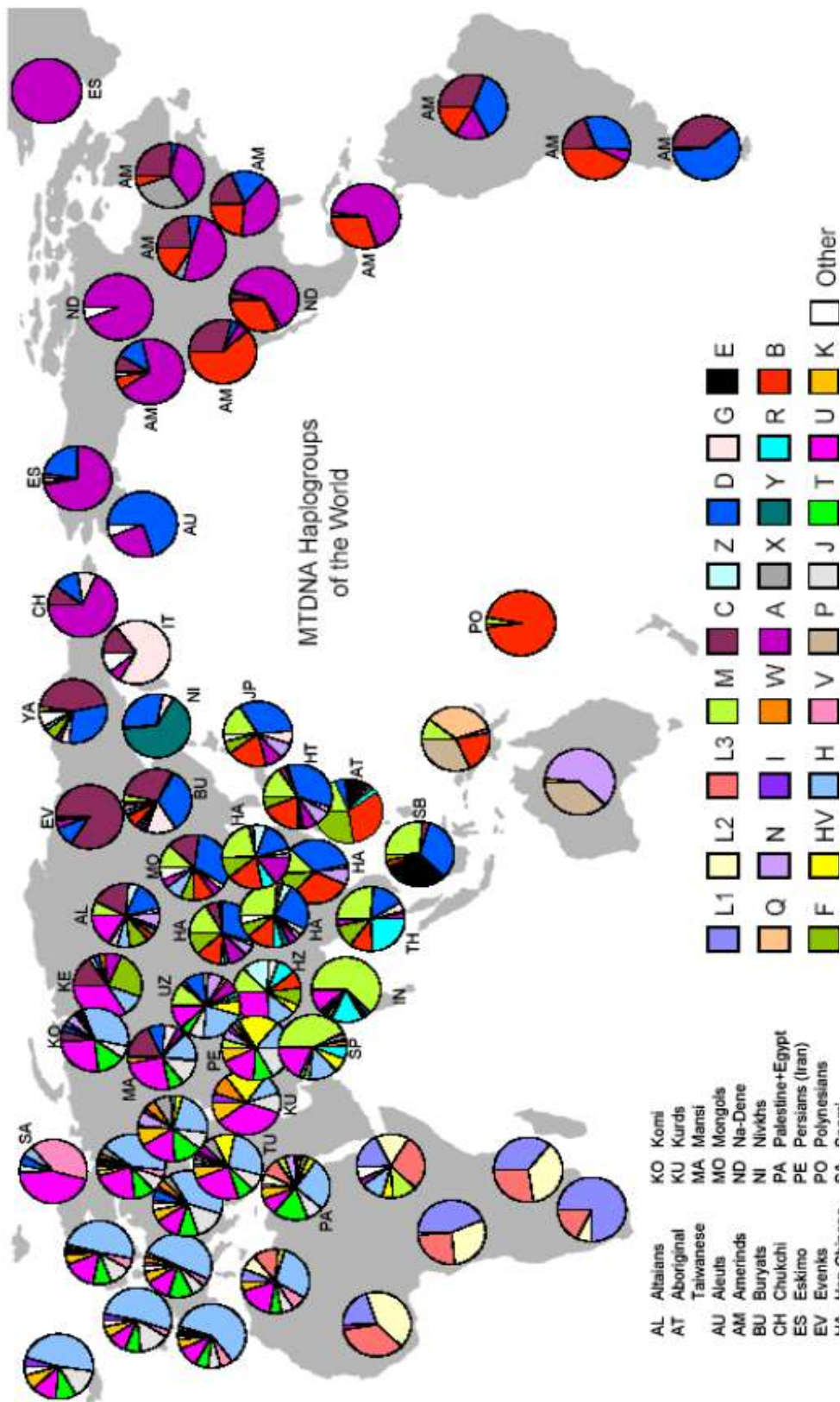


Figure 16 : Distribution des haplogroupes mitochondriaux dans le monde (Mc Donald, 2005).
<http://www.scs.uiuc.edu/mcdonald/WorldHaplogroupsMaps.pdf>

II.6 Applications de l'ADNmt

Les propriétés particulières de l'ADNmt à savoir le taux élevé de mutation, l'absence de recombinaison et la transmission maternelle, font de cette molécule un bon outil biologique exploitable dans de nombreux champs disciplinaires tels que la biologie de l'évolution, l'anthropologie génétique, l'histoire des maladies, la systématique, la phylogénie et les sciences criminalistiques (Just et *al.*, 2004).

- En médecine génétique, le génome mitochondrial est analysé dans le cadre du diagnostic ou de la recherche de variants de prédisposition pour certaines pathologies, telles que les cytopathies mitochondriales, les maladies neurologiques, les myopathies, les ischémies cardiaques et cérébrales, les maladies métaboliques et les cancers.
- Le génome mitochondrial est également très utilisé à la fois comme support pour étudier les flux de migrations humaines et comme concept d'étude de l'évolution des génomes.
- En anthropologie moléculaire, la connaissance de la diversité mitochondriale d'une population permet de déterminer ses origines et de tracer les voies de migrations qui ont été empruntées pour sa mise en place.
- En sciences criminalistiques, il est utilisé pour identifier les restes biologiques non déterminés dans le cas des affaires criminelles et des catastrophes naturelles ou encore pour établir des liens de parenté entre plusieurs individus.

(Budowle et *al.*, 2003 ; Kéfi-Ben Atig et *al.*, 2009)

II.7 L'intérêt de l'ADNmt en sciences criminalistiques

Le polymorphisme de l'ADNmt, sa très grande résistance (due au fait à sa protection à l'intérieur des mitochondries, le rendant ainsi moins sensible aux dégradations, contrairement à l'ADNn), son nombre de copies par cellule qui est très élevé par rapport à l'ADNn, permettent son utilisation privilégiée sur des traces anciennes et très dégradées (Mansuet-Lupo et *al.*, 2007).

En effet du fait de sa plus grande sensibilité, l'analyse de l'ADNmt est très utile lorsque l'investigation de l'ADNn échoue à cause de la dégradation et la faible quantité du matériel biologique, ce qui est souvent le cas en forensique. Il est utilisé régulièrement sur les os, les dents, les prélèvements dégradés, voire putréfiés ou les éléments pileux dépourvus du bulbe (Bender et *al.*, 2000 ; Adachi et *al.*, 2004)

Cependant, son hérédité exclusivement maternelle s'avère problématique lorsqu'il s'agit d'inclure un individu puisque toutes les personnes de la même lignée maternelle (frère, sœur, mère, grand-mère, cousin par la lignée maternelle...) possèdent le même ADNmt. L'ADNmt ne permet pas d'inclure un individu comme l'ADNn peut le faire. Cette analyse doit être pratiquée en complément à des résultats de l'analyse des STR ou dans les cas de leur absence. Toutefois, l'ADNmt permet d'exclure un individu (Asari et *al.*, 2007)

Une fois que le mitotype est établi, il peut alors être comparé aux mitotypes existants. Pour déterminer la force du résultat, il est indispensable d'utiliser des bases de données telles que « mitomap.org et EMPOP », qui permettent de connaître les fréquences d'apparition du mitotype observé ainsi que son appartenance à un haplogroupe.

Plusieurs laboratoires ont établi des bases de données, parmi elles celles regroupant des séquences en provenance de différentes populations humaines et qui sont élaborées dans le but d'augmenter le succès dans la résolution des affaires judiciaires, nous citons la banque de donnée du FBI (Federal Bureau of Investigation-USA) (Monson et *al.*, 2002) et la banque EMPOP réalisée par l'institut de médecine légale d'Innsbruck en Autriche et l'AFDIL (Armed Forces DNA Identification Laboratory-USA) (Parson et Dür, 2007). Le pouvoir de discrimination sera plus important en fonction de la rareté du mitotype observé dans ces bases de données.

D'autres laboratoires proposent l'analyse de certaines régions codantes de l'ADNmt afin d'accroître la discrimination entre les échantillons analysés (Budowle et *al.*, 2003 ; Nilsson et *al.*, 2008).

II.8 Données bibliographiques sur l'analyse de l'ADNmt en Algérie

Très peu d'analyses génétiques ont été effectuées dans la population algérienne contrairement à celles de la Tunisie et du Maroc. Concernant les données bibliographiques sur l'analyse de l'ADNmt dans la population algérienne, à notre connaissance, elle n'a été effectuée que sur 85 individus de la population M'Zab de Ghardaïa pour une première étude (Corte Côte-Real et *al.*, 1996) et la deuxième sur 47 Algériens dont les caractéristiques (le dialecte parlé et la région d'échantillonnage) n'ont pas été définies par l'auteur (Plaza et *al.*, 2003). En revanche deux autres études plus récentes, ont été réalisées, l'une comprenant 240 individus originaires du Nord-ouest Algérien (Bekada, 2015) et l'autre constituée de 114 individus d'une population Berbère de l'Est Algérien «Chaouis de la ville de Khenchela» (Saoudi, 2016).

II.9 Cas d'utilisation de l'ADNmt à des fins d'identification génétique

Lors d'évènements tels que les accidents, les crashes d'avions, les attentats ou les catastrophes naturelles de grande ampleur, les guerres et les génocides où le nombre de victimes est très élevé, l'ADN mitochondrial constitue, pour les enquêteurs, un outil d'identification des personnes disparues. L'analyse de l'ADNmt s'est avérée très utile aussi en criminalistique, notamment quand l'investigation de l'ADNn échoue à cause de la dégradation et la faible quantité du matériel biologique, ce qui est le cas par exemple pour les traces de contact, les ossements, les dents et les éléments pileux sans bulbe (Carey et Mitnik, 2002 ; Bhinu *al.*, 2014).

Dans les années 1990, l'analyse de l'ADNmt a été introduite dans les investigations pour des cas où les échantillons sont insatisfaisants pour l'analyse STR. Depuis 1993, le laboratoire d'identification d'ADN des forces armées à Rockville, au Maryland (USA), utilise l'ADNmt pour restituer les restes squelettiques des militaires morts à leurs familles (guerre du Vietnam). L'identification des personnes disparues est donc facilitée par cette technologie (Ginther *et al.*, 1992; Holland *et al.*, 1993)

De plus au cours des années 1990, les médecins légistes ont découvert que, bien que les racines de cheveux humains et les fragments de cheveux naturellement dépourvus de racines ne contiennent pas suffisamment d'ADNn pour le typage systématique des STR, ils contiennent de l'ADNmt abondant. Aujourd'hui, la possibilité d'effectuer une analyse ADNmt sur pratiquement tous les poils de la tête ou du corps est une technique supplémentaire dans les investigations criminelles (Wilson *et al.*, 1995 ; Vigilant, 2008 ; Alvarez-Cubero *et al.*, 2012)

II.10 Cas historiques de l'utilisation de l'analyse de l'ADNmt

L'analyse de l'ADNmt a permis de résoudre quelques spectaculaires cas historiques, ainsi qu'il était possible d'identifier de nombreux restes non déterminés, comme des victimes de la guerre du Vietnam (Holland *et al.*, 1993), des victimes d'affaires criminelles (Lutz *et al.*, 1996 ; Bender *et al.*, 2000) ou des victimes de catastrophes naturelles comme le tsunami (Deng *et al.*, 2005). De même, grâce à l'analyse de l'ADNmt des énigmes de l'histoire ont pu être résolues, tels que l'identification des restes de la famille impériale Romanov, derniers tsars de Russie disparus en 1918 lors de la révolution Bolchévique et découverts en 1991 (Gill *et al.*, 1994 ; Ivanov *et al.*, 1996; Coble *et al.*, 2009)

Plusieurs analyses de l'ADNmt se sont succédé, elles ont révélé une correspondance exacte entre la tsarine présumée et ses trois enfants avec un parent maternel vivant. D'autre

part la séquence de l'ADNmt extrait des restes du présumé Tsar Nichoias II (a), a montré la présence d'une hétéroplasmie à la position 16169 dans la région de contrôle « D-Loop » avec prédominance de la cytosine comme cela est illustré dans la figure 17. La séquence concorde avec celle déterminé à partir des os du grand-duc Georgij Romanov frère du présumé Tsar Nichoias II (exhumé) montrant la même hétéroplasmie avec prédominance de la thymine, ainsi qu'avec celle de la comtesse Xenia Cheremeteff-Sfiri, l'unique descendante directe par lignée maternelle du Tsar Nichoias II (vivante) mais homoplasmique pour la thymine (Ivanov et al., 1996).

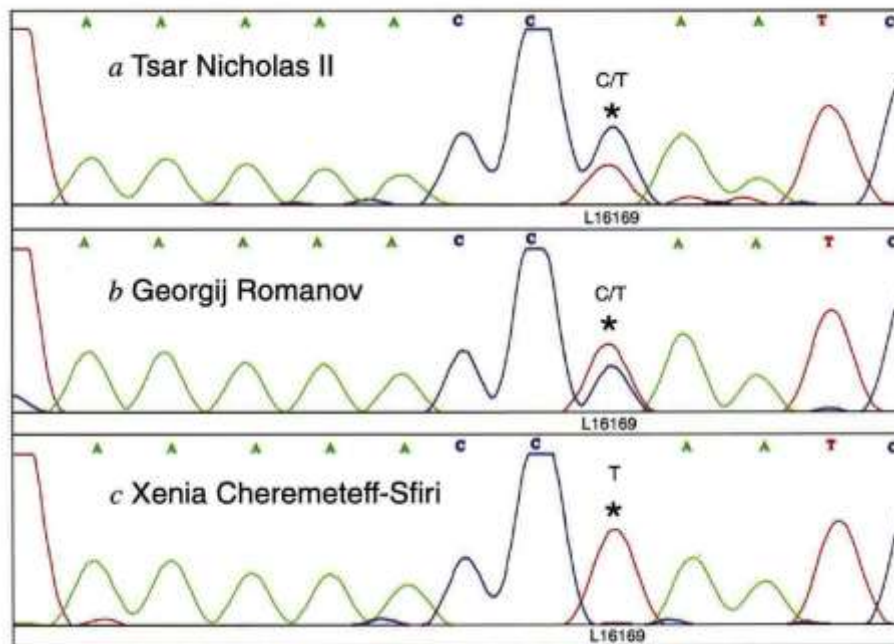


Figure 17 : Analyses de la séquence d'ADNmt de la famille du Tsar Nicholas II Montrant l'hétéroplasmie de séquence (Ivanov et al., 1996)

II.11 Echantillons biologiques utilisés dans l'analyse de l'ADNmt

Divers échantillons (sanguins, buccaux, traces de contacts, cheveux télogènes, poils sans racines, ongles, tissus, restes cellulaires, os et des dents), liés à plusieurs cas (homicides, agressions sexuelles, vols et identification de restes humains) peuvent constituer des sources potentielles d'ADNmt, ils sont énumérés dans le tableau III .

Tableau III : Quelques échantillons biologiques utilisés dans les analyses de l'ADNmt

Pièces à Conviction	Endroit du Prélèvement	Source de l'ADN
Batte de base Ball ou arme semblable	Poignée –extrémité	Sueur- peau- sang-cellules épithéliales
Chapeau.-bandana-masque	l'Intérieur	Sueur- éléments pileux pellicules
Ongles	Raclures	Sueur- sang- cellules épithéliales
Marque de morsure	Peau ou habits	Cellules buccales
Couverture – oreiller	Superficie	Sueur- éléments pileux - sperme, urine- salive
Préservatif utilisé	Surface interne ou externe	Cellules vaginales- rectales- sperme
Bouteille-verre-canette	Cotés - embouchure	Salive - sueur
Cigarette utilisée	Mégots de la cigarette	Cellules buccales
Timbre ou enveloppe	Secteur léché	Cellules buccales
Effets vestimentaires	Superficie	Sang- sueur- sperme
Restes cadavériques	Prélèvement autopsique	Sang cadavérique-lambeau de chair- muscle- moelle osseuse - dents - ossement Restes cellulaires

(Melton et Nelson 2001; Just et *al.*, 2004 ; Alvarez-Cubero et *al.*,2012 ; Nunn, 2013 ; Buš et Allen, 2016).

III. MATERIEL ET METHODES

Cette présente expérimentation a été réalisée au niveau du Département d'Identification Génétique du Laboratoire de la Police Scientifique d'Alger (LPS)

L'objectif de notre travail est de contribuer à la mise au point d'un protocole d'identification humaine par analyse de l'ADNmt caractéristique de la filiation matrilinéaire. Cette technique serait utile dans les cas des prélèvements biologiques humains dégradés et des prélèvements capillaires dépourvus de bulbes ou lorsque l'analyse par les marqueurs STR de ADNn se révèle impossible.

Concernant le choix des échantillons, notre étude porte sur trois types de prélèvement, le premier riche en ADNn (prélèvements buccaux et sanguins), le second faible en ADNn (restes musculaires) et le troisième dépourvu d'ADNn (prélèvements capillaires dépourvus de bulbes).

Notre méthodologie s'appuie sur le séquençage ciblant les des deux régions hypervariables HV1 et HV2 de la séquence D-Loop de ADNmt de tous ces échantillons choisis en adoptant deux stratégies différentes utilisant au total six (06) paires d'amorces.

Trois scénarios ont fait l'objet de cette expérimentation :

1. **Le premier** : il s'agit de consolider la recherche du lien de maternité entre une fille X et une mère présumée. Le père présumé étant absent et le résultat d'analyse des marqueurs STR de ADNn a montré que la fille partage la moitié de ses allèles avec celui de la mère présumé à l'exception de deux marqueurs parmi les seize (16) STR analysés et qu'on ne pouvait pas affirmer le lien de maternité entre elles à cause de ces deux exclusions (puisque il peut s'agir aussi de deux mutations).
2. **Le deuxième** : cas de l'identification d'un individu à partir de ses restes cadavériques où les résultats de l'analyse des marqueurs STR de ADNn étaient partiels
3. **Le troisième** : il s'agit d'un cas qui a été pris comme témoin constitué des prélèvements de tiges capillaires de deux personnes connues (une mère et de sa fille). Ce cas nous permet de vérifier le succès du protocole suivi et la possibilité de l'exploitation des échantillons dépourvus d'ADNn.

L'ensemble des étapes d'analyse de l'ADNmt est résumé dans le diagramme illustré dans la **Figure 18**.

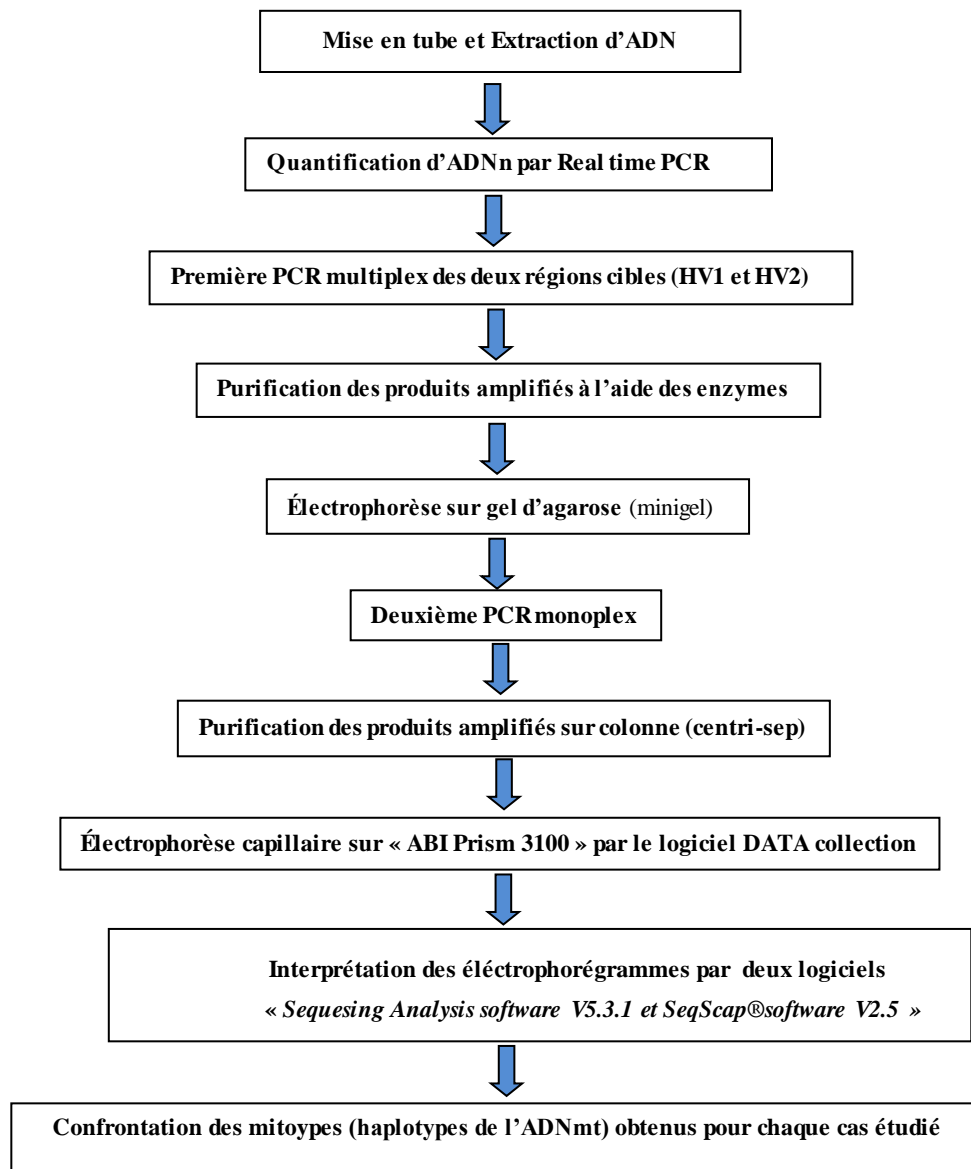


Figure 18 : Diagramme représentant les étapes d'analyse de l'ADNmt

La procédure débute par la mise en tube des échantillons, suivie de l'extraction et de la quantification de l'ADNn, après deux PCR ciblant les deux régions hypervariables HV1 et HV2 de la région de contrôle « D-Loop » de l'ADNmt sont réalisés, suivies toutes les deux de purifications. Pour vérifier le succès de la première amplification une étape de contrôle des produits amplifiés sur gel d'agarose peut être utile. Au terme de la seconde amplification, une électrophorèse capillaire est réalisée à l'aide du séquenceur « ABI Prism 3100 » qui permet la migration, la lecture des séquences, la validation et l'interprétation des électrophorégrammes obtenus, grâce aux logiciels dont il est doté. Une fois les mitotypes des échantillons sont obtenus, ils sont enfin confrontés afin de vérifier s'il y a un lien maternel entre les personnes à l'origine de ces échantillons.

III.1 Les précautions et les conditions d'analyses

L'évaluation de la mise au point de la technique d'identification génétique par analyse de l'ADN mitochondrial, nécessite des précautions importantes afin d'éviter les contaminations inter-échantillons et de produire de faux positifs. Nous avons suivi les conditions de travail selon les recommandations de l'ISFG (International Society for Forensic Genetics) et pour l'interprétation des résultats celles du groupe EDNAP (European DNA Profiling) (Tully et *al.*, 2001).

L'extraction se déroule toujours sous hotte à flux laminaire. Une salle spécifique est dédiée aux amplifications (PCR), les salles pré et post-PCR sont séparées et tous les consommables sont traités par UV. Le matériel est nettoyé à l'eau de javel et l'eau MilliQ® (ultra pure), des témoins négatifs (blancs) sont inclus à chaque étape : blanc d'extraction, blanc de PCR, blanc pour la PCR du séquençage, blanc dans chaque amplification.

III.2 Mise en tube des prélèvements biologiques

La mise en tube consiste à mettre chaque échantillon dans un tube Eppendorf, et de lui attribuer un code identificateur avant de procéder à l'étape d'extraction.

Tableau IV: Sources des échantillons qui ont fait l'objet de l'analyse d'ADNmt

Cas	Lien de parenté	Nature de prélèvement	Code attribué à l'échantillon
Premier	Fille X	Sang	ADN01
	mère présumée	Cellules buccales	ADN02
Deuxième	Cadavre X	Restes musculaires	ADN03
	mère présumée	Cellules buccales	ADN04
Troisième (Personnes apparentées)	Fille	Tiges capillaires	ADN05
	Mère	Tiges capillaires	ADN06

III.3 Extraction d'ADN

Les protocoles d'extraction d'ADN sont différents selon la nature et l'état de l'échantillon. En effet au sein du LPS d'Alger, différents protocoles sont élaborés soit par extraction organique soit en utilisant des Kits.

III.3.1 Protocole d'extraction pour les prélèvements sanguins et buccaux par le Kit d'AdemTech

L'extraction débute par une lyse des cellules buccales ou sanguines qui sont incubées dans 400 µl de tampon «Lysis Buffer» auquel sont ajoutés 50µl de protéinase K à 20mg/ml (pour la digestion des protéines y compris les histones) et de 4.5µl

de la Solution de DTT 3M (pour la rupture des ponts disulfure). Mettre le tout dans un bloc chauffant à 56°C sous agitation à 1000 rmp, pendant 60 minutes.

Après incubation, le **lysate** est récupéré par essorage à l'aide des spin baskets ; à ce lysate on ajoute : 250 µl du Tampon « LB Buffer », 250 µl « d'isopropanol » et 15 µl de « billes magnétiques ». Les tubes sont incubés de nouveau à 37°C sous agitation à 1000 trs/min pendant 10 min. (l'Isopropanol permet la fixation de l'ADN aux billes magnétiques). Par la suite on place les tubes dans le portoir magnétique pendant 5 min. cette étape permet la fixation des billes magnétiques enrobées d'ADN à la paroi des tubes et ainsi permettre l'élimination du surnageant contenant toutes les impuretés.

Une étape de purification par trois (03) lavages consécutifs est nécessaire pour se débarrasser des éventuels inhibiteurs de la PCR qui peuvent être liés à l'ADN et aux billes magnétiques.

On rajoute 500 µl du premier tampon de lavage « Washing Buffer1 » et les tubes sont remis sur le portoir magnétique pendant au moins 5 min pour que les billes magnétiques retiennent l'ADN, et pouvoir ainsi éliminer le surnageant (solution de lavage). Après ce premier lavage, les tubes sont retirés du portoir magnétique pour effectuer le deuxième lavage avec le deuxième tampon de lavage « Washing Buffer 2 » et le troisième avec de l'Ethanol à 70% tout en répétant les étapes réalisées lors du premier lavage, ensuite les tubes sont séchés sur le portoir magnétique sous hotte pendant au moins 5min à température ambiante. Enfin l'ADN est reconstitué dans 70 µl de « tampon d'éluion AE ». (Crime Prep Adem-Kit Instruction for manual protocol Version 1.6).

III.3.2 Protocole d'extraction organique pour le prélèvement de restes musculaires

L'ADN est extrait par une lyse cellulaire avec un tampon d'extraction, suivie de deux purifications, une phénolisation par PCI (phénol /chloroforme/Alcool Isoamélique (25/24/1, v/v) et une deuxième purification par filtration sur des colonnes centricon.

L'étape de lyse cellulaire consiste à incuber les cellules du reste musculaires à 37°C pendant 24h sous agitation dans 500 µl de tampon d'extraction avec 10 µl de PK (20 mg/ml) pour assurer la digestion enzymatique des protéines y compris les histones.

Pour la première purification de l'ADN, un même volume de PCI que le volume du lysate est ajouté, on mélange vigoureusement à l'aide d'un vortex pour homogénéiser, puis on centrifuge les échantillons pendant 10 min à 3500 rpm. La phase supérieure contenant l'ADN est transférée dans un nouveau tube, (si la galette protéique est importante, refaire l'étape de purification deux à trois fois en maintenant toujours le rapport de 1 volume de

phase aqueuse pour 1 volume de PCI). Enfin la phase aqueuse contenant l'ADN (plus au moins pur) est récupéré en le transférant toujours dans un nouveau tube.

La phase aqueuse récupérée est repurifiée une deuxième fois sur des colonnes Centricon. 250µl d'eau MiliQ (ultra pur) sont déposés sur la colonne Centricon afin d'humidifier sa membrane, on dépose ensuite l'extractum d'ADN à purifier au centre de la colonne humidifiée, on complète avec de l'eau MiliQ jusqu'au trait de jauge indiqué sur la colonne, puis on centrifuge pendant 25min à 9000 rpm. Cette étape de lavage peut être répétée deux à trois fois selon l'état d'impureté de l'échantillon. Enfin l'extractum d'ADN pur est récupéré, en inversant la colonne du Centricon et en centrifugeant pendant 5mn à 3000 rpm, l'ADN ainsi purifié est transféré dans un autre tube Eppendorf identifié. (Al-Sammarraie, 2016)

III.3.3 Protocole d'extraction organique pour les prélèvements capillaires

Avant de procéder à l'extraction de l'ADN à partir des échantillons capillaires, leur traitement préalable est nécessaire, afin d'éliminer les inhibiteurs de la Taq Polymérase tel que la mélanine et les traitements chimique potentiels qu'ils aient pu subir.

Pour cela 1ml de la solution de Terg-AZyme 5% est placé dans un eppendorf contenant 1cm de l'échantillon et incubé à 37°C pendant 15 mn, dans un bloc chauffant sous agitation à 5000 rpm. Après incubation, le TergAZyme est éliminé et l'élément pileux est rincé avec 1ml de d'éthanol absolu (on procède au rinçage par retournement de l'Eppendorf), ensuite l'éthanol est éliminé. L'élément pileux est de nouveau lavé en ajoutant 1ml d'eau MiliQ, on laisse l'échantillon capillaire sécher. On passe à l'étape de lyse qui consiste à répartir dans chacun des tubes contenant les échantillons, 300µl de la solution de lyse constituée de : 188 µl Tampon d'extraction, de 7.5µl de SDS (20%), de 75 µL DTT (1M) et de 30 µl Protéinase K (20 mg / ml). les échantillons sont incubés pendant 30 min, dans un bloc chauffant à 56°C avec agitation à 1400 tr/min. Après 30 minutes d'incubation, les échantillons doivent être dissous. Si les éléments pileux ne parviennent pas à se dissoudre, il faut ajouter 1µL de DTT (1M) et incuber pendant toute la nuit.

Par la suite, on procède à la purification en transférant les lysats dans des tubes eppendorf Phase Lock Gel (PLG) qui doivent être d'abord centrifugés pendant 30 secondes à la vitesse maximale puis , on ajoute au lysat le même volume de PCI et on mélange vigoureusement à l'aide d'un vortex pour homogénéiser, ensuite on centrifuge les échantillons pendant 3 minutes à 3500 rpm. Enfin la phase supérieure aqueuse contenant l'ADN est transférée dans un nouveau tube. Elle est ensuite repurifiée une deuxième fois à

l'aide des colonnes Microcon. On ajoute d'abord 100 µl d'eau MiliQ pour humidifier la membrane des colonnes, on transfère par la suite la phase aqueuse dans la colonne Microcon et on centrifuge à 500 rpm pendant 25 minutes. Après on procède au lavage on ajoutant 400µl d'eau MiliQ, on centrifuge à nouveau à 500 rpm pendant 20 minutes. Pour recueillir les échantillons d'ADN, on ajoute 20 µl d'eau MiliQ à la colonne, puis on centrifuge à 1000 rpm pendant 3 minutes tout en inversant la colonne, l'ADN purifié est ainsi transféré dans un autre tube Eppendorf identifié. (Bourdon et *al.*, 2014)

III.3.4 Quantification de l'ADN par PCR en temps réel

La quantité d'ADN détectée à partir des extractums des échantillons analysés dépend non seulement de la nature et l'état des échantillons mais également du protocole d'extraction. Pour cela, il est nécessaire de procéder à la quantification de l'ADNn par PCR en temps réel dans les extractums obtenus.

La PCR en temps réel est une technique d'amplification d'ADN, reposant sur la visualisation en temps réel de la phase exponentielle de la réaction de PCR. Elle permet la mesure de la quantité d'ADNn tout au long de la réaction, grâce à l'utilisation d'un marqueur fluorescent dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'amplicons produite.

Dans cette étude, nous avons utilisé le kit *Quantifiler Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems)*, en procédant à une quantification absolue qui se réfère à une gamme de concentrations connues du kit, basée sur la technique 5' Nuclease de la technologie TaqMan (Andréasson et *al.*, 2006).

La détermination quantitative d'ADN se base sur le nombre de cycles threshold (Ct) correspondant à une fluorescence donnée dans un tube réactionnel. Le seuil est déterminé pour correspondre à la zone d'amplification exponentielle de la réaction PCR. Les résultats obtenus permettent d'obtenir plusieurs informations :

- Si la quantité d'ADN humain détectée est suffisante pour procéder à l'analyse ADNmt.
- la quantité d'ADN permet d'optimiser les réactions à effectuer (soit dilution ou concentration) .
- Détecter les éventuels inhibiteurs par la détermination du cycle threshold (Ct) de l'IPC (Internal PCR Control) et ainsi pouvoir adapter les protocoles d'analyse en conséquence.

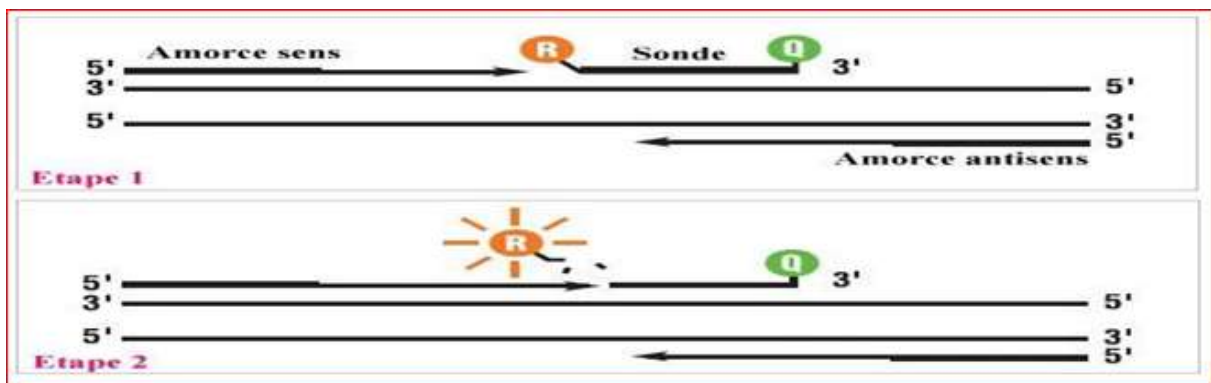
Les amplifications et lectures ont été faites au moyen de l'appareil ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (*Applied Biosystems*), en suivant le protocole recommandé par le fabricant.

Durant chaque cycle de la réaction de PCR en temps réel, la quantité d'ADN totale est détectée grâce à une sonde moléculaire spécifique dite TaqMan.

La sonde TaqMan porte à son extrémité 5' une molécule fluorescente (fluorochrome) dite Reporter et à son extrémité 3' un Quencher. Le Reporter est une molécule qui, après excitation par un faisceau laser, émet un signal de fluorescence à une longueur d'onde spécifique qui est mesuré à la fin de chaque cycle de PCR.

En absence d'amplification, la sonde reste intacte, le Quencher (suppresseur) absorbe en grande partie la fluorescence du Reporter (émetteur) et seule une fluorescence résiduelle est émise. En revanche, s'il y a amplification, la sonde TaqMan est hydrolysée lors de l'étape d'élongation de l'ADN par l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase.

Le "Reporter" est alors libéré et sa fluorescence n'est plus absorbée par celle du Quencher.



Etape 1 : La sonde, munie de son Reporter (R) et de son Quencher (Q) est hybridée sur le fragment à amplifier. Tant que la sonde est intacte, l'émission fluorescente du Reporter est absorbée par le Quencher.

Etape 2 : lors de l'élongation, la polymérase détache le Reporter de la sonde. Sa fluorescence est alors libérée.

III.3.5 Procédure d'amplification et séquençage suivie pour l'analyse de ADNmt

Une première PCR multiplex est réalisée, suivie d'une purification et d'un contrôle des produits amplifiés par électrophorèse sur gel d'agarose (minigel), pour passer ensuite à la deuxième PCR monoplex suivie de l'étape de purification, pour terminer enfin avec électrophorèse capillaire sur un séquenceur.

Pour toute PCR réalisée, un témoin positif est analysé systématiquement avec les échantillons, il est codifié « 9947A », d'une concentration d'ADNmt connue et avec un mitotype déterminé, il est passé soit à 10 ng/μl, 0.1 ng/ μl ou 0.005 ng/μl selon la quantité d'ADNn des échantillons de la série analysée.

Le mitotype du témoin positif 9947A : 16311C 93G 195C 214G 263G 309.1C 309.2C 315.1C

Des témoins négatifs (blancs), ceux de l'extraction, de la PCR et de la post-PCR, ont été aussi inclus, afin de détecter toute source de contamination durant les étapes de l'analyse.

▪ Choix des amorces utilisées pour le séquençage

L'analyse a été effectuée en séquençant les deux brins d'ADN sens et anti-sens des deux régions hypervariables HV1 et HV2 à chaque fois, ce qui permet de confirmer les résultats des mitotypes pour chaque échantillon.

Pour cela deux stratégies illustrées par la Figure 19 et la Figure 20 ont été proposées, elles nécessitent différents choix d'amorces (Wilson et *al.*, 1995). Les mêmes amorces pour la PCR d'amplification et de séquençage ont été utilisées, elles sont décrites dans le Tableau V et le Tableau VI.

Tableau V : Liste des amorces et leurs séquences selon la 1^{ère} stratégie

Région hypervariable ADNmt	Code des Amorces	Séquence (5'- 3')	Taille
HV1	16025 S	TCTTTCATGGGG AAGCAG ATTT	(22 nucléotides)
	16410 AS	GTGCGG GATATTGATTCAC	(20 nucléotides)
HV2	S2-29	GGTCTATCACCTATTAACCAC	(22 nucléotides)
	f1p3AS-449	GGAGTGGGAGGGGAAAATAA	(20 nucléotides)

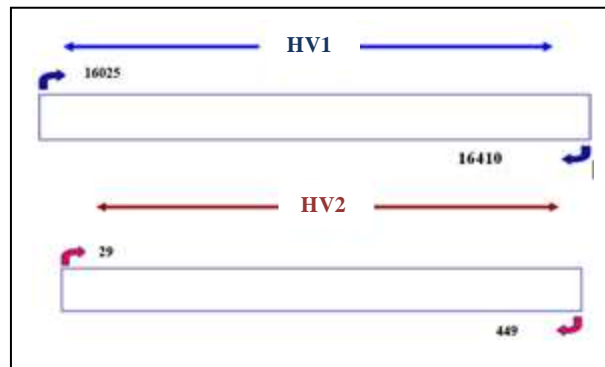


Figure 19 : Représentation schématique de la 1^{ère} stratégie de séquençage des deux régions hypervariables HV1 et HV2 de la D-Loop de l'ADNmt

Tableau VI : Liste des amorces et leurs séquences selon la 2^{ème} stratégie

Région hypervariable ADNmt	Code des Amorces	Séquence (5'-3')	Taille
HV1	L-15997 A1	CACCATTAGCACCCAAAGCT	(20 nucléotides)
	H- 16395 B1	CAC GGAGGATGGTGGTCAAG	(20 nucléotides)
	L-16159 A2	TACTTGACCACCTGTAGTAC	(20 nucléotides)
	H- 16236 B2	CTTTGGAGTTGCAGTTGATG	(20 nucléotides)
HV2	L-48 C1	CTCACGGGAGCTCTCCATGC	(20 nucléotides)
	H- 408 D1	CTGTAAAAGTGCATACCGCCA	(22 nucléotides)
	L-172 C2	ATTATTTATCGCACCTACGT	(20 nucléotides)
	H - 285 D2	GGGGTTTGGTGGAAATTTTTTG	(22 nucléotides)

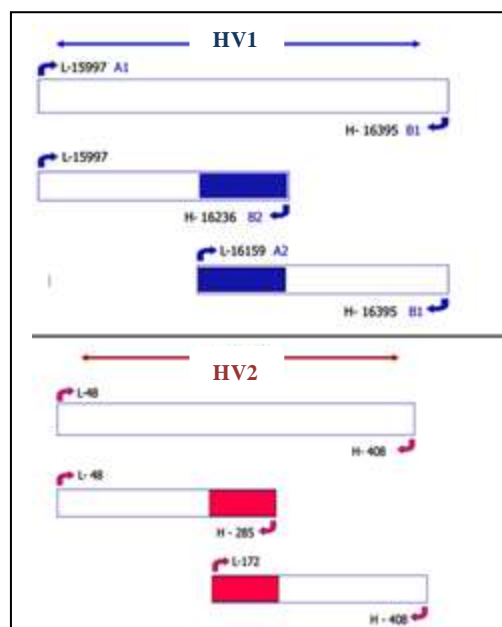


Figure 20 : Représentation schématique de la 2^{ème} stratégie de séquençage des deux régions hypervariables HV1 et HV2 de la D-Loop de l'ADNmt

III.3.5.1 Première PCR multiplex

La première PCR est effectuée afin d'amplifier simultanément les fragments d'intérêt HV1 et HV2 de l'ADNmt de chaque échantillon avec les amorces sens et anti-sens en une seule réaction. Vu que les concentrations d'ADNn estimées à partir des extractums sont variables, nous avons proposé trois protocoles d'amplification :

- Cas des échantillons riches en ADNn (où la concentration d'ADNn doit être amené à 10 ng / μ l) : La PCR est réalisée dans un volume réactionnel total de **25 μ l** avec **2 μ l** d'échantillon d'ADN, **1 μ l** d'amorce sens et **1 μ l** d'amorce anti-sens à **20 pM/ml** chacune, **1,5 μ l** de MgCl₂, **2 μ l** de dNTPs, **2,5 μ l** du tampon 10X et **0,2 μ l** d'ADN polymérase « Taq Gold », on complète avec de l'eau MiliQ autoclavée.

La PCR a lieu dans un thermocycleur Gene AmpPCR System 9700 d'*Applied Biosystems*, selon le programme suivant : une 1ère étape pour d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 10 minutes suivi de 35 cycles comprenant: une dénaturation à 95°C d'une 1 minute, une hybridation à 60°C d'une minute et une élongation à 71°C pendant 1 minute. Une étape d'élongation finale à 70°C pendant 10 minutes permettra d'amplifier la totalité des segments amorcés.

- Cas d'échantillons avec de faibles quantités d'ADNn (prélèvement effectué à partir des restes cadavérique): les concentrations estimées sont \leq **0.1ng/ μ l**. la PCR est réalisée avec **10 μ L** d'ADN dans un volume réactionnel de **40 μ l** et selon le même programme du thermocycleur que celui utilisé par le cas précédent.
- Cas d'échantillons avec de très faibles quantités d'ADNn voir absentes (tige capillaires). Il s'agit des échantillons d'ADN dont la concentration estimée est \leq 0.0005 ng/ μ l. La PCR est réalisée avec **20 μ l** de l'échantillon d'ADN dans un volume réactionnel de **30 μ l** contenant : 4 μ l d'amorces à 20 pM/ml, 4,8 μ l de MgCl₂, 4 μ l de dNTPs, 5 μ l du tampon 10X et 2,5 μ l de l'enzyme ADN polymérase « Taq Gold », on complète avec de l'eau MiliQ autoclavée.

- Les deux amorces (sens et anti-sens) doivent être incorporées dans un tube, lors de la préparation du mixte réactionnel de la première PCR multiplex pour chacune des régions cibles HV1 et HV2, selon la première stratégie ou la deuxième stratégie, comme il est schématisé dans la

-

Figure 21.

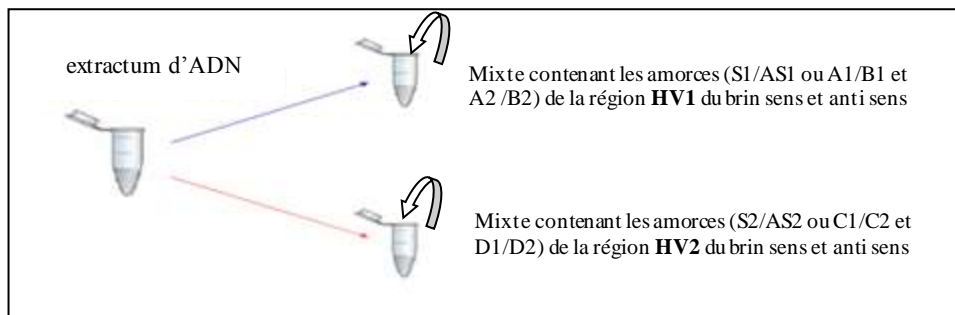


Figure 21 : Schéma représentatif de la PCR multiplex pour HV1 et HV2 (reconstitué)

III.3.5.2 Purification et électrophorèse sur gel d'agarose

Après la première PCR multiplex, les produits obtenus sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose pour vérifier le succès de l'amplification et estimer approximativement les quantités des séquences HV1 et HV2 amplifiées.

Cette étape est précédée d'une purification, qui permet l'élimination, des amorces et des dNTPs restants dans le milieu réactionnel.

■ La purification

Cette purification est réalisée à l'aide de deux enzymes: l'exonucléase I, qui permet d'éliminer les amorces libres grâce à son activité exonucléasique et l'enzyme Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), qui permet d'éliminer les phosphates en 5' des dNTP et donc rend leur incorporation dans l'ADN impossible. A chaque 5 μ l du produit de PCR, sont ajoutés 0.5 μ l de l'enzyme exonucléase I, 0.5 μ l de l'enzyme SAP et 4 μ l de H₂O bidistillée stérile pour obtenir un volume final de 10 μ l. La réaction est incubée pendant 40 minutes à 37°C (température d'action des enzymes), puis pendant 20 minutes à 80°C permettant la dénaturation des enzymes stoppant ainsi leur action. (Dugan et al., 2002).

■ L'électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose 3% contenant 0,3 g d'agarose dans 30 ml de TAE 1X (400mM Tris-Acetate, 10 mM EDTA) et 3 μ l de BET (Bromure d'Ethidium à 10 mg/ml), permet d'examiner les résultats de la PCR et de vérifier que le produit d'amplification est à la taille attendue situées à environ 300 pb en se référant au standard de taille, le phage ϕ 174 [72 à 1353 pb]. Le BET est un agent intercalant qui se glisse entre les bases azotées donnant ainsi

une fluorescence sous exposition aux UV à 254 nm, cette dernière permet de visualiser l'ADN et de vérifier sa migration. Avant de les déposer dans les puits, les échantillons sont mélangés à une solution de charge constituée de bleu de Bromophénol et de Xylène Cyanol pour suivre la migration électrophorétique. Cette solution appelée « loading buffer » permet aussi d'alourdir l'ADN et de le maintenir fond des puits. L'électrophorèse est réalisée pendant 30 à 45 minutes sous 80 Volts (Saoudi, 2016). La visualisation des bandes est faite sous lumière UV analytique avec une lampe « CAMAG » à une longueur d'onde de 254 nm.

III.3.5.3 Deuxième PCR monoplex

Cette technique repose sur le principe de séquençage enzymatique développé par Sanger pour établir la séquence nucléotidique des molécules d'ADN. A l'origine, la méthode de Sanger consistait à synthétiser, *in vitro*, des brins d'ADN complémentaires à l'ADN matrice en utilisant une amorce marquée par radioactivité et des didésoxyribonucléotides (ddNTP) qui lorsqu'ils sont incorporés bloquent l'extension des nouveaux brins synthétisés à cause de l'absence d'une extrémité 3' OH libre. La compétition entre l'incorporation des dNTPs et des ddNTPs aboutit à la synthèse d'un ensemble de brins radioactifs de longueurs différentes qui peuvent être visualisés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Aujourd'hui, cette méthode est améliorée et automatisée. Le marquage des fragments d'extension est réalisé désormais par l'incorporation de ddNTPs fluorescents.

Dans notre étude, les produits de PCR purifiés ont été séquencés grâce au séquenceur automatique «ABI Prism 3100 AVANT Genetic Analyser» en utilisant le kit Big Dye™ Terminator 3.1 d'*Applied Biosystems*, qui comprend :

- le Terminator Ready Reaction Mix : il présente l'avantage de contenir tous les composants nécessaires à la réaction de séquençage dans un seul tube.
- Les quatre didéoxynucléotides marqués aux fluorochromes (ddNTPs) :
 - A-Dye Terminator marqué au dichlororhodamine [R6G] ;
 - C-Dye Terminator marqué au dichlororhodamine [ROX] ;
 - G-Dye Terminator marqué au dichlororhodamine [R110] ;
 - T-Dye Terminator marqué au dichlororhodamine [TAMRA].
- les Désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) ;
- La Taq Gold polymérase : des enzymes thermorésistantes qui permettent d'effectuer plusieurs cycles d'élongation successifs.

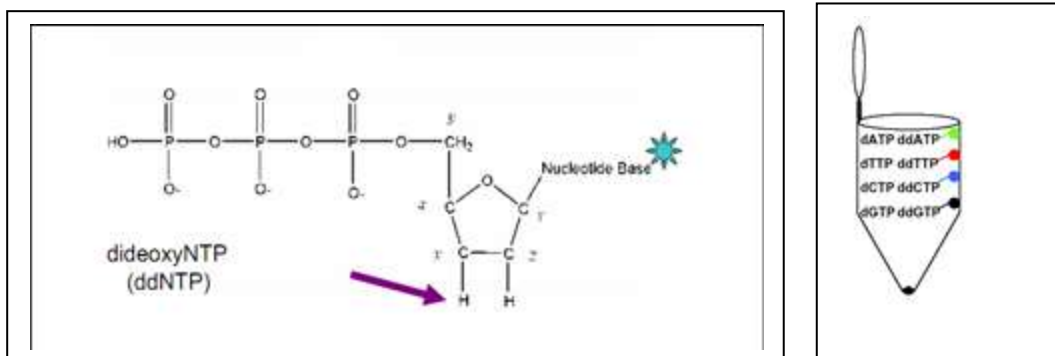


Figure 22 : Représentation schématique des molécules de ddNTPs didéoxynucléotides interrupteurs

▪ Protocole de la PCR de séquençage

La PCR de séquençage est réalisée à partir des fragments précédemment amplifiés, en utilisant le Kit utilisant le Kit BigDye™ Terminator. Cette étape permet l'incorporation des deux types de nucléotides, nucléotides, dNTPs et ddNTPs, à partir d'un brin d'ADN qui sert de matrice à l'ADN polymérase. L'élongation de chaque produit monobrin se termine par l'incorporation d'un ddNTP ddNTP spécifique. La migration électrophorétique du produit de cette réaction de séquençage sur un sur un gel très résolutif qui est le polyacrylamide va séparer tous les fragments présents en fonction fonction de leurs tailles. La

Figure 23 illustre les étapes de la réaction de séquençage ; les plus petits fragments vont migrer plus rapidement que les grands. La grande résolution de ce gel permet de distinguer des fragments différents entre eux d'une paire de base. (Ballard, 2016).

Dans notre étude à partir donc des produits amplifiés (amplicons de première PCR multiplex), les échantillons sont répartis chacun en deux tubes pour amplifier **séparément** les deux brins sens et anti sens des deux régions cibles selon les deux stratégies citées précédemment dans le tableau Tableau V et le Tableau VI en utilisant chaque amorce à part dans un tube comme l'illustre la Figure 24.

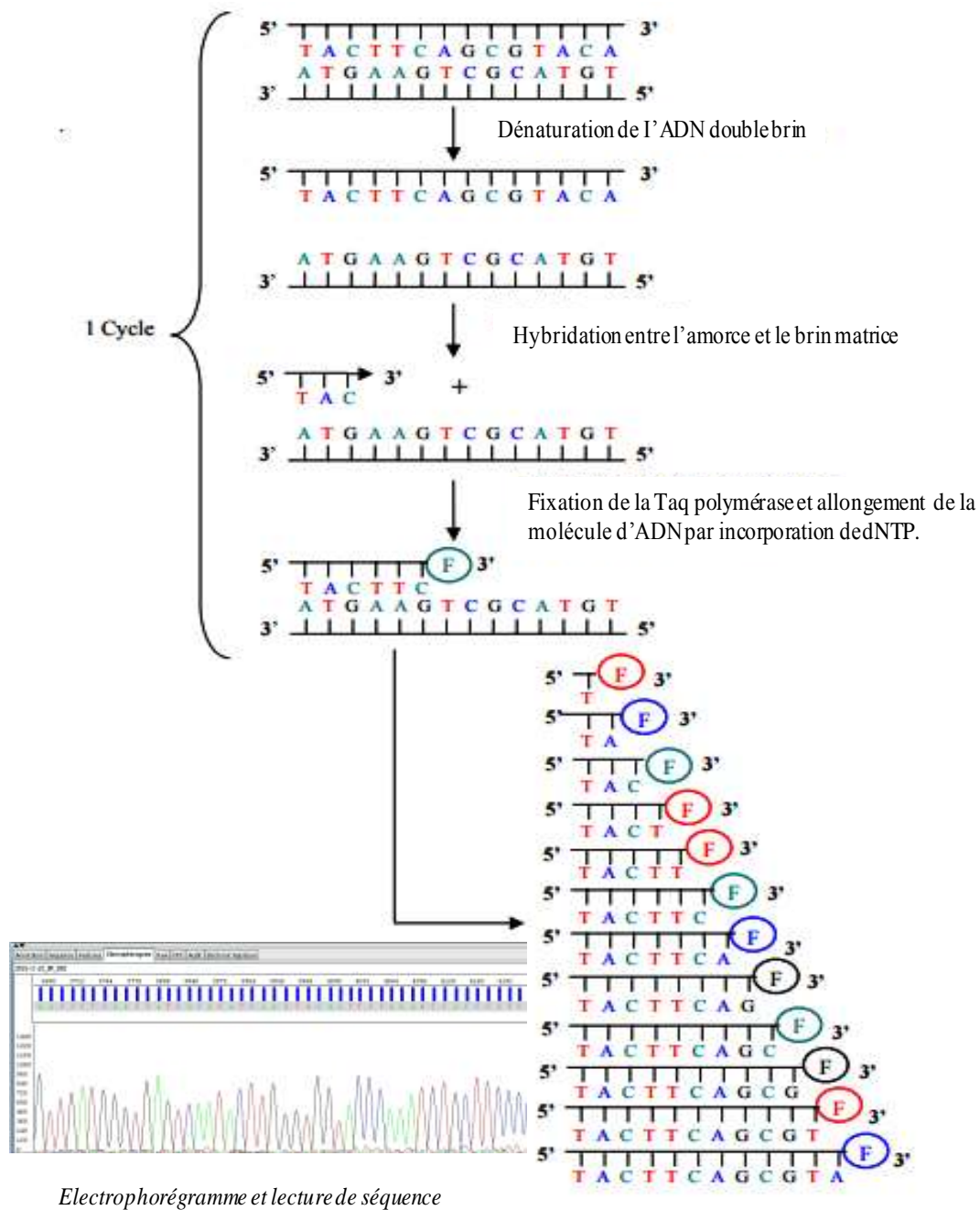


Figure 23 : Représentation schématique du principe de la technique de séquençage d'ADN

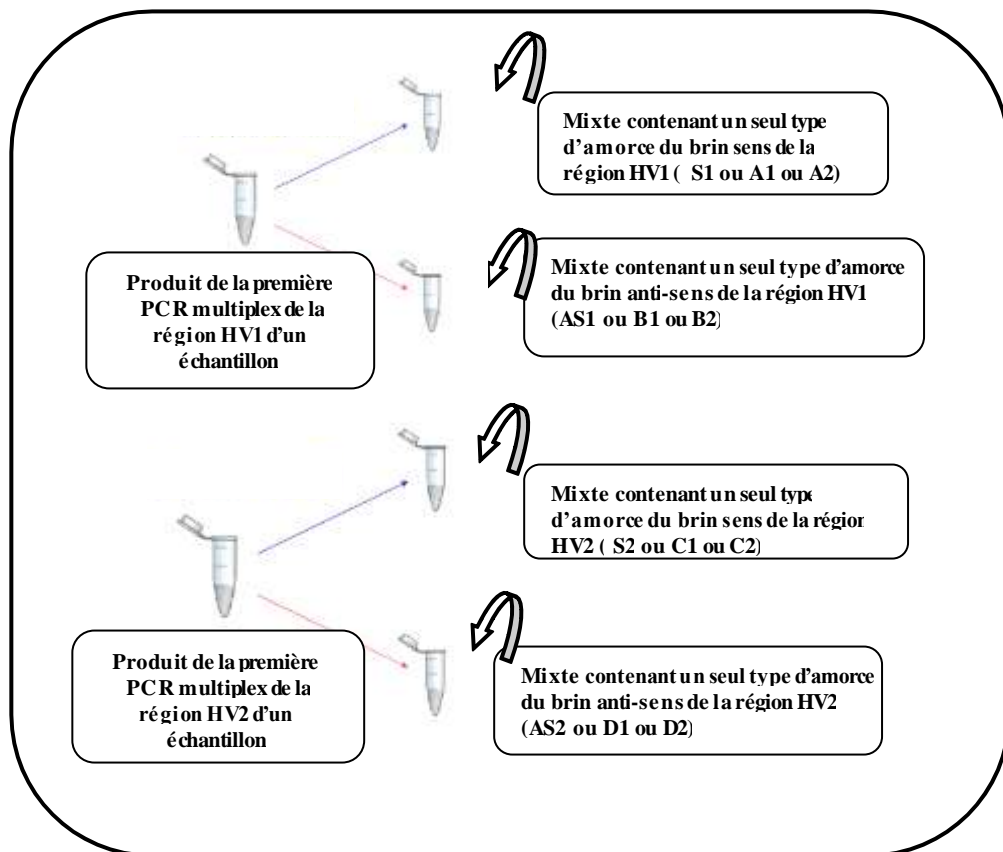


Figure 24 : Schéma représentatif de la PCR monoplex pour HV1 et HV2 (reconstitué)

Deux modes opératoires sont préconisés selon qu'il s'agit d'échantillons riches en produit amplifié ou non.

➤ Le Protocole concernant les échantillons riches en produit amplifié :

On prend **10 µl** de produit amplifié purifié, auquel on ajouté **10 µl** de mixte réactionnel du Kit BigDye™ Terminator contenant : 2 µl de (4 dNTPs, les 4ddNTPs et la Taq polymérase), 3 µl de tampon 5X et 1µl de l'une des amorces spécifiées citées précédemment à une concentration de **20 pM** et qui détermineront le sens de lecture de la polymérase et l'amplification d'un seul brin (5' ou 3'), et enfin 4 µl d'eau MilliQ autoclavée.

La PCR est réalisée dans un thermocycleur suivant un programme comprenant une première étape de dénaturation d'une minute à **96°C**, suivie de 25 cycles d'amplification incluant une dénaturation pendant 10 secondes à **96°C**, une hybridation de 5 secondes à **50°C** et une élongation de 4 minutes à **60°C**.

- Le protocole concernant les échantillons avec de faibles quantités de produit amplifié :

On prend **10 µl** de produit amplifié purifié, auquel est ajouté **10 µl** de mixte, contenant : **4 µl** de BigDye™ Terminator (incluant les 4 dNTPs et les 4ddNTPs fluorescents marqués par des fluorochromes différents et une ADN polymérase) et **2 µl** de tampon 5X d'Applied Biosystems ; A ce mélange est ajouté **1µl** d'amorces à une concentration de **10 pM** et qui détermineront le sens de lecture de la polymérase et l'amplification d'un seul brin (5' ou 3'), et enfin **3 µl** d'eau MilliQ autoclavée . À la fin du processus, chaque brin d'un fragment d'ADN donné est séquencé séparément.

La PCR est réalisée dans un thermocycleur suivant un programme comprenant une première étape de dénaturation à **96°C** d'une minute, suivit de 25 cycles d'amplification incluant une dénaturation à **96°C** pendant **15 secondes**, une hybridation d'une **1 secondes** à **50°C** et une élongation d'une **1minute** à **60°C**.

Au terme de cette PCR multiplex, nous procédons à la purification, qui est une étape très importante pour minimiser l'apparition de bruit de fond sur l'électrophorégramme, elle est réalisée grâce au le Kit de purification sur colonnes centri-sep. Cette étape est précédée d'abord d'une étape appelé « SDS cleanup » afin de faciliter l'élimination des amorces et des dNTPs en excès lors de leur passage par la colonne centri-sep. Elle consiste à ajouter 2µL de SDS 2% à chaque échantillon puis on centrifuge. Ils sont placés par la suite dans un thermocycleur selon le programme : 98°C pendant 5 minutes puis 25°C pendant 10 minutes.

■ Etape de purification sur colonne de centri-sep

D'abord on reconstitue le gel des colonnes, on ajoutant 800µl d'eau MilQ autoclavée dans chacune d'elles et on laisse 30 minutes pour hydrater le gel. Après que le gel soit hydraté et sans bulles, on ajoute 20 µl de produit amplifié dans la colonne. Pour une purification optimale, on centrifuge la colonne à une vitesse de 750 g pendant 2min, les échantillons ainsi purifiés sont récupérés dans de nouveaux tubes Eppendorff. (Dugan et al., 2002),

■ Etape de post-amplification

Cette étape est nécessaire pour préparer les échantillons à l'électrophorèse capillaire, elle consiste à ajouter 10 µl formamide à 10 µl de produit amplifié et en une dénaturation dans le thermocycleur (96°C pendant 2min).

III.3.5.4 Séquençage par électrophorèse capillaire

Le séquençage est réalisé sur le séquenceur ABI Prism 3100 AVANT, qui est représenté dans la Figure 25. Le logiciel DATA collection dont il est doté permet l'identification de chaque pic et son attribution à un nucléotide en fonction de la couleur du fluorochrome.

Lors de l'électrophorèse, les monobrins d'ADN vont migrer selon leurs tailles le long du capillaire, vers la fin de migration, ils passent devant une cellule de détection et sont excités par un faisceau laser. Cette excitation provoque la libération de photons (fluorescence) qui sont captés par une caméra CCD (Charge Couple Device). Les données sont analysées et visualisées sur un chromatogramme. La différence rencontrée entre la séquence de l'échantillon analysé et celle de la rCRS forme ce qu'on appelle l'haplotype mitochondrial ou le mitotype .



Figure 25 : Photographie du séquenceur « ABI Prism 3100 AVANT » Genetic Analyser d'Applied Biosystems

La Figure 26 résume les étapes d'un Run, c'est le cycle nécessaire pour la migration électrophorétique de l'échantillon.

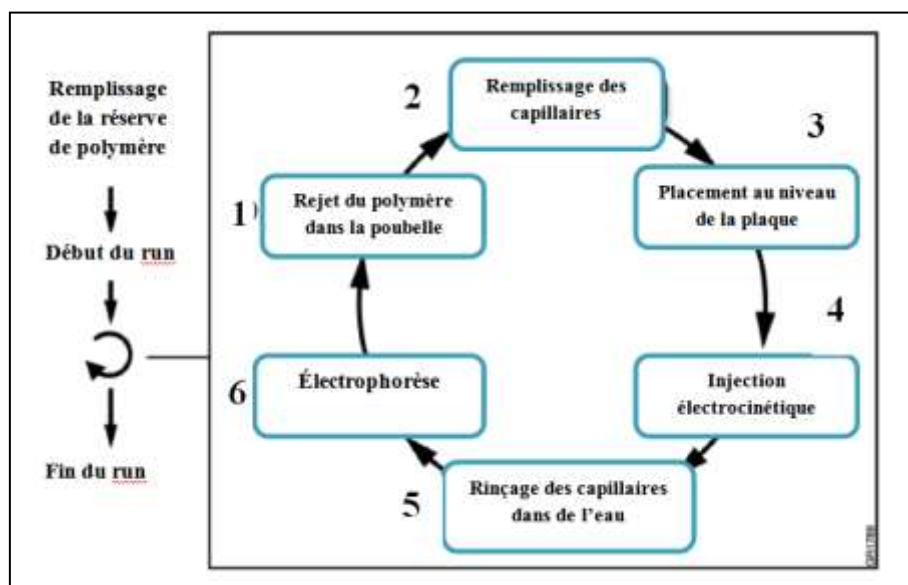


Figure 26 : Représentation schématique illustrant les principales étapes de fonctionnement du séquenceur lors d'un Run

Concernant les paramètres du Run (migration électrophorétique), ils sont définis par défaut par le logiciel DATA Collection de l'appareil, mais un module (programme) a été établi et ajusté selon la quantité d'ADNn tel que le temps d'injection, le temps du Run et le voltage. Ils sont définis dans le Tableau VII.

Tableau VII: Paramètres du Run ajustés selon la quantité d'ADNn

Quantité d'ADNn	Paramètres du Run	valeur	intervalle
Echantillon riche en ADNn	Temps d'injection	6	1-600 sec
	voltage	15	0-15 KV
	Temps du Run	3000	300-14000 sec
Echantillon faible en ADNn	Temps d'injection	12	1-600 sec
	voltage	13	0-15 KV
	Temps du Run	3000	300-14000 sec
Echantillon avec une très faible quantité d'ADNn voir absente	Temps d'injection	30	1-600 sec
	voltage	13	0-15 KV
	Temps du Run	3000	300-14000 sec

IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Pour les trois cas ayant fait l'objet de notre étude, nous avons réalisé 12 séquençages pour chaque prélèvement en ciblant les deux régions HV1 et HV2 de l'ADNmt et selon les deux stratégies que nous avons proposé, au totale 72 séquençages ont été atteints.

Sur l'ensemble de ces séquençages, nous avons choisi de présenter à titre d'exemple, quelques modèles représentatifs des mutations détectées telles qu'elles sont présentés par l'interface du logiciel.

IV.1 Résultats de la quantification

Les quantités d'ADN déterminées à partir des extractums peuvent varier selon la nature, l'état de l'échantillon et le protocole d'extraction choisi. Tous les produits extraits (extractums d'ADN) obtenus à partir des différents prélèvements biologiques analysés sont quantifiés par PCR en temps réel, les résultats de la quantité d'ADNn détectées varie entre [0.1-30 ng/µl], ils sont présentés dans le Tableau VIII.

Concernant le prélèvement capillaire sans bulbe (troisième cas), les résultats de la quantification indiquent le bon choix du protocole d'extraction et l'efficacité de l'étape de prétraitement vu l'absence d'inhibiteurs.

Tableau VIII : Résultats de la quantification d'ADNn dans les extractums des échantillons analysés

Cas	Lien de parenté	Nature de prélèvement	Code	Quantité d'ADNn détectée (ng/µl)
Premier	filles X	Sang	ADN01	30 ng/µl
	mère présumée	Cellules buccales	ADN02	40 ng/µl
Deuxième	cadavre X	restes cadavériques	ADN03	0,12 ng/µl
	mère présumée	Cellules buccales	ADN04	10 ng/µl
Troisième (Personnes connues)	Fille	tiges capillaires	ADN05	indélectable et absence d'inhibiteur
	Mère	tiges capillaires	ADN06	indélectable et absence d'inhibiteur

IV.2 Résultats de l'électrophorèse sur gel d'Agarose (minigel)

Durant notre travail, trois essais concernant le contrôle des produits amplifiés sur minigel ont été réalisés, mais la visualisation des bandes d'ADN était difficile. Cela peut être dû à la lampe UV de l'appareil CAMAG qui semble être défectueuse. La visualisation par le biais d'un autre appareil appelé « Crime scope » avec une exposition à la même longueur d'onde (254 nm), nous a permis de visualiser les deux bandes correspondant aux deux régions

HV1 et HV2 au niveaux attendus (situées à environ 300 pb), en se référant au standard de taille, le phage Ø174 [72 à 1353 pb]. Faute de temps, nous n'avons pas pu réaliser d'autres essais d'électrophorèse et les échantillons sont donc passés directement en PCR monoplex.

La première amplification a été réalisée en se référant aux résultats de la quantification de l'ADNn, nous avons ajusté à chaque fois le volume de l'échantillon à amplifier, le volume du mixte réactionnel et le programme du thermocycleur. En effet, pour les échantillons **riche** en ADNn (cas du prélèvement sanguin ou buccal) l'amplification est réalisée avec seulement **2µl** d'extractums d'ADN et 23 µl de mixte réactionnel; alors que pour les deux cas où les échantillons sont pauvres en ADNn ou n'en contiennent pas du tout, il fallait augmenter les volumes des échantillons et celui du mixte réactionnel (dans le but d'augmenter les chances d'hybridation, en apportant plus de matrice d'ADN, d'enzymes et d'amorces); donc pour les échantillons de **faibles** quantités d'ADNn (cas du prélèvement des restes cadavériques) l'amplification est réalisée avec **10µl** d'extractums d'ADN et 40µl de mixte réactionnel et pour les échantillons où l'ADNn est **absent** (cas du prélèvement capillaire sans bulbe) l'amplification est réalisée avec **20µl** d'extractums d'ADN et 30µl du mixte réactionnel.

IV.3 Résultats du séquençage

Pour chaque ADNmt les séquences consensus générées du séquençage du brin sens et anti sens, sont d'abord alignées et comparées pour confirmer s'il n'y a pas de divergence entre elles, ensuite on dénombre les mutations par rapport à la séquence de référence rCRS (revised Cambridge Reference Sequence).

Les nomenclatures pour l'haplotype d'ADNmt (mitotype) ont été déterminées suivant les recommandations d'ISFG et les directives du groupe EDNAP pour l'analyse de l'ADNmt. On dénombre le nombre de divergences existantes (substitution- délétion-inversion) et ceci pour chacune des régions cible HV1 et HV2.

IV.4 Validation des résultats

Avant l'interprétation des résultats nous avons d'abord vérifié le succès du séquençage par la visualisation des données brutes affichés par le logiciel *DATA Collection*, ensuite nous sommes passés à la lecture des séquences par deux logiciels *Sequencing Analysis software V5.3.1* et *SeqScap software V2.5*.

Plusieurs étapes de vérification ont été suivies pour valider les résultats obtenus et interpréter correctement les mitotypes, le procédé est le suivant :

➤ **Première étape :**

Vérification de l'allure du spectre des données brutes avec le logiciel *DATA collection* pendant le séquençage pour les deux brins sens et anti sens, un exemple ciblant le brin sens la région HV1 est présenté dans la **Figure 27**

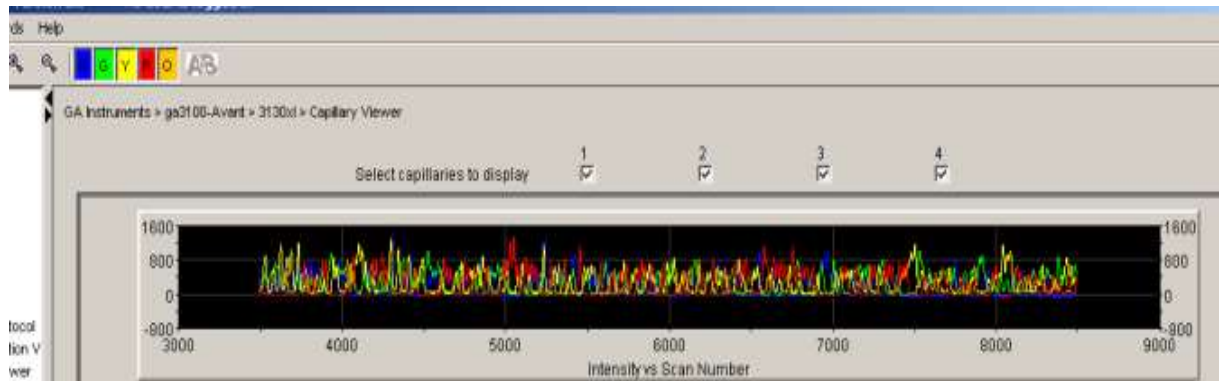


Figure 27: Spectre des données brutes affiché par le logiciel « DATA Collection » pendant le séquençage du brin sens de HV1

➤ **Deuxième étape :**

Vérification de l'allure de l'électrophorégramme pour prouver le succès du séquençage des deux brins sens et anti sens pour toutes les séquences analysées, un exemple est présenté dans la

Figure 28, il montre le sens de l'élongation dont l'allure des pics doit être décroissante.

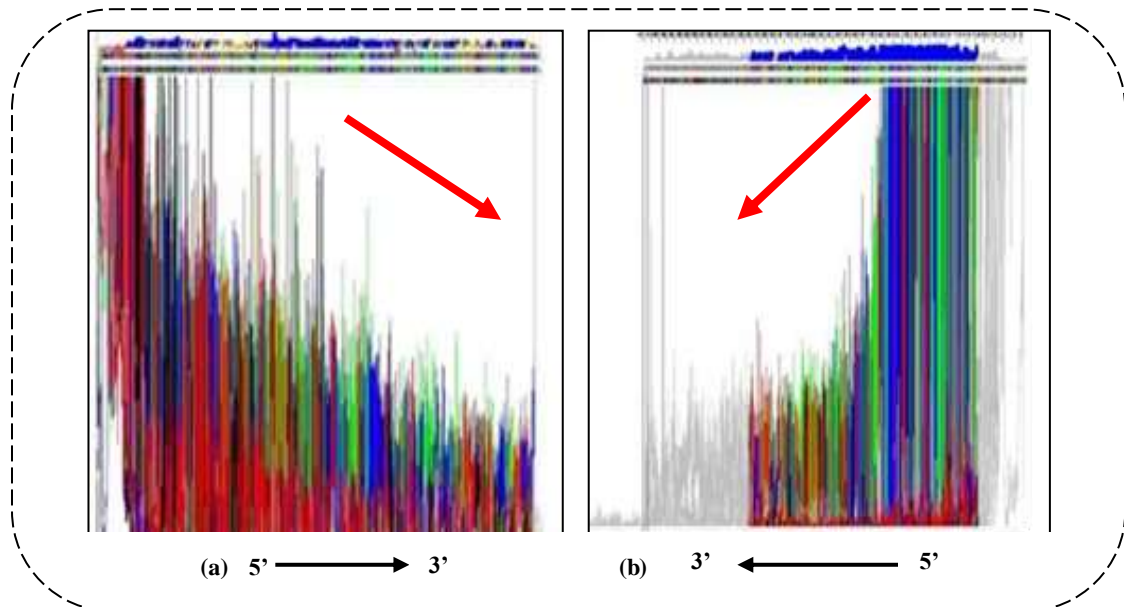


Figure 28: Allure des électrophorégrammes pour une lecture sens (a) et une lecture anti-sens(b)

➤ **Troisième étape :**

Vérification de la valeur QV (quality of value) de la base séquençée qui s'affiche selon trois indicateurs de couleur (bleu, jaune ou rouge), une bonne valeur de QV est comprise entre [15-60] qui s'affiche en bleu dont un exemple est présenté dans la **Figure 29** par l'interface des deux logiciels *Sequencing Analysis Software V5.3.1* et *SeqScap Software V2.5*.

L'estimation de cette valeur est importante pour poursuivre les étapes de validation, dans le cas où les valeurs QV sont affichées en couleur jaune ou rouge (pics faibles), la séquence ne sera pas validée et le séquençage doit être relancé en ajustant le paramètre « temps d'injection », tout en l'augmentant. Dans le cas où la valeur QV est supérieure à la valeur limite (pics élevés) le séquençage doit être relancé en diminuant le temps d'injection.

(a)

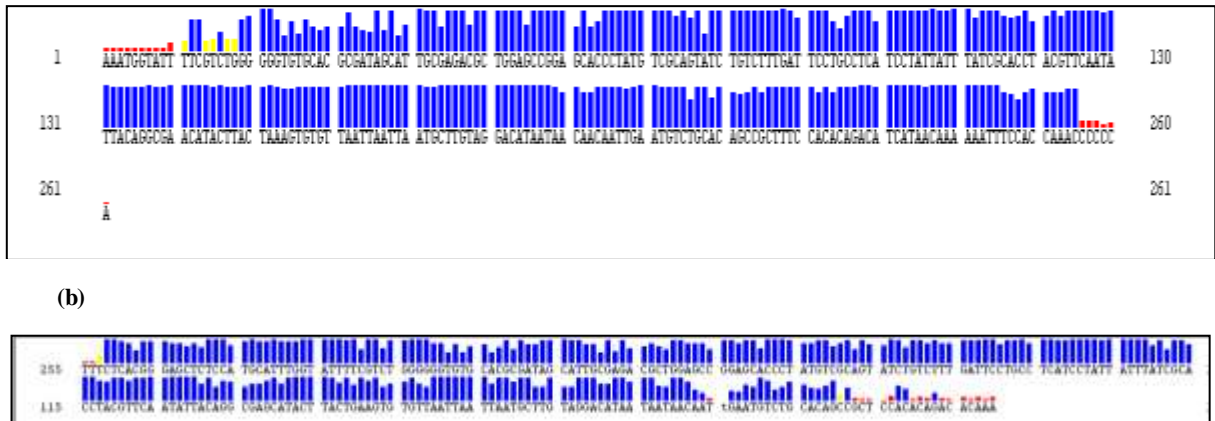


Figure 29: Résultats de QV obtenus après traitement des données brutes du séquençage analysés avec les logiciels Sequencing (a) et SeqScap (b)

➤ **Quatrième étape :**

Vérification de l'alignement de toutes les amorces par le logiciel *SeqScap* qui montre la position en paire de bases du début du site d'Hybridation jusqu'à la fin de l'élongation pour chacune des amorces utilisées ; nous avons choisi un exemple de la deuxième stratégie qui concerne la région HV1et qui est présenté dans la **Figure 30** en utilisant les deux amorces A1/B1 , et les deux mini amorces A2 /B2.

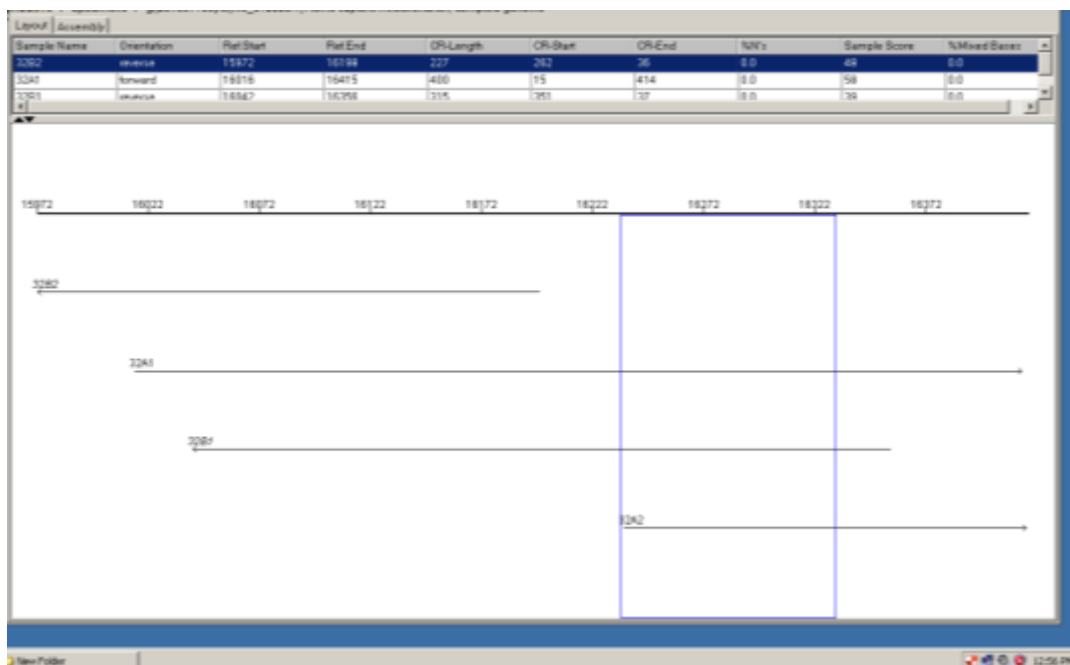


Figure 30: Verification de l'alignement des amorces d'un échantillon selon les deux stratégies

➤ **Cinquième étape**

A cette étape, nous faisons un rassemblement des deux séquences sens et anti sens par paire d'amorces pour que le logiciel SeqScap puisse faire des alignements et pouvoir intervenir ainsi pour supprimer les chevauchements au début et à la fin des deux séquences de la région cible et enfin déterminer les mutations communes.

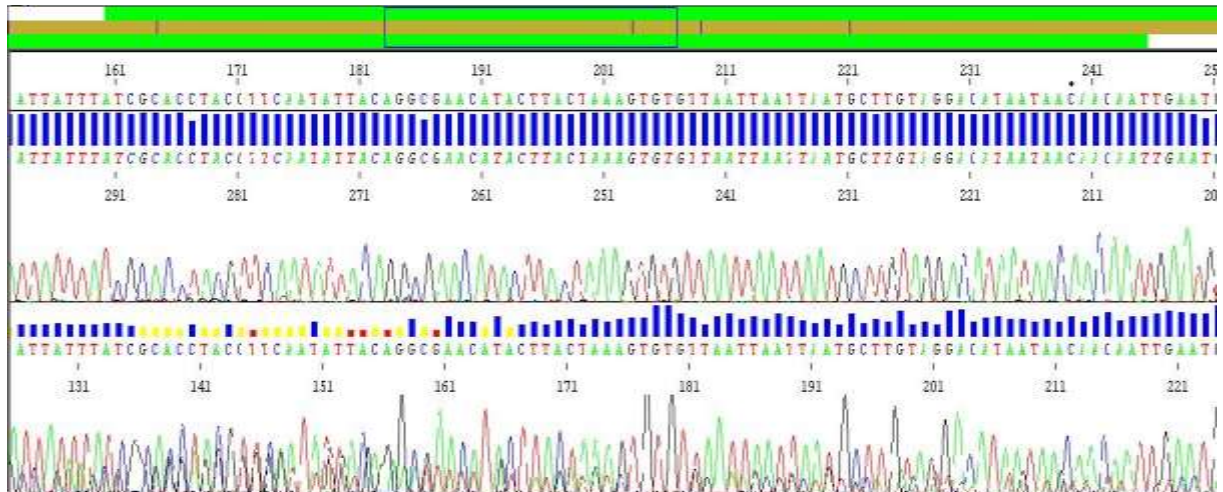


Figure 31: Exemple d'un rassemblement d'une paire d'amorces par le logiciel SeqScap qui permet l'alignement des deux séquences sens (S) et anti-sens (AS)

➤ **Sixième étape :**

La vérification concerne les résultats obtenus pour les témoins (négatifs et positifs) passés en même temps que la série des échantillons à chaque séquençage.

-le résultat du témoin positif sous référence 9947A présenté dans la Figure 32 a été obtenu avec succès et il concorde avec le mitotype attendu. (Wilson, 2003; Bintz et al., 2004)

Mitotype de 9947A : 16311C 93G 195C 214G 263G 309.1C 309.2C 315.1C

- le résultat de l'un des témoins négatifs présenté dans la Figure 33 après vérification du spectre des données brutes et le résultat de l'électrophorégramme révélé négatif , nous avons pu confirmer l'absence de contaminations par un ADNmt exogène dans tous les réactifs, le matériel et les instruments utilisés au cours des différentes étapes de cette analyse .

HV1(a)

Mutations						
Base Change	ROI	Position	Length	Type	QV	
16311T>C	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16311	1	Sub	46	

HV2(b)

Mutations						
Base Change	ROI	Position	Length	Type	QV	
93A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	93	1	Sub	16	
195T>C	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	195	1	Sub	14	
214A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	214	1	Sub	10	
263A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	263	1	Sub	32	
297A>C	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	297	1	Sub	18	
309-310insCC	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	309	2	Ins	0(avg)	
315-316insC	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion,	315	1	Ins	50	

Figure 32: Résultats des mutations détectées au niveau de la région HV1(a) et HV2(b) du témoin positif « 9947A » présenté par l'interface du logiciel SeqScap

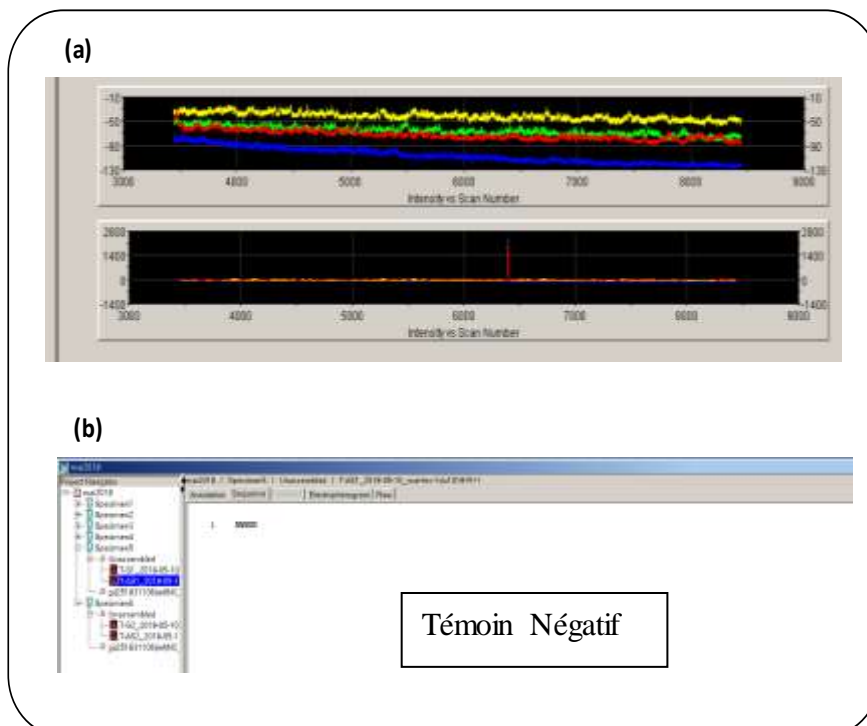


Figure 33: Présentation des données brutes d'un témoin négatif analysés avec le logiciel DATA Collection (a) et après traitement avec le logiciel SeqScap (b)

Comme l'haplotype de l'ADNmt du témoin positif a été obtenu avec succès et il concorde avec celui attendu et que tout les résultats du séquençage des témoins négatifs (l'extraction, des deux PCR et de la post- PCR), étaient bien négatifs, indiquant le bon suivi des consignes préconisées durant toutes les étapes de l'analyse de l'ADNmt. Cela nous a permis de poursuivre notre travail et de valider nos résultats.

IV.5 Résultats du séquençage de HV1 et HV2 de la région D-Loop de l'ADNmt

A titre de modèle de résultat d'un séquençage, nous avons choisi de présenter quelques cas reportant les mutations selon la première stratégie avec les amorces (S1 /AS1 pour HV1) et (S2 /AS2 pour HV2) ou la deuxième stratégie avec les amorces (A1/B1, A2/B2 pour HV1) et (C1/D1, C2/D2 pour HV2). Toutes les figures ont été reportées telles qu'elles sont représentées par l'interface du logiciel SeqScap

IV.5.1 Premier cas : recherche de lien de maternité entre une mère présumée et une fille X

IV.5.2 Résultats du séquençage de la région HV1 de ADNmt

Tous les résultats du séquençage selon les deux stratégies, obtenus à partir du prélèvement buccal de la mère présumée et sanguin de la fille X ciblant la région HV1, sont rassemblés dans le Tableau IX

Tableau IX : Résultats du séquençage de HV1 selon les deux stratégies concernant le premier cas

Région HV1		(stratégie 1)		(stratégie 2)			
Les amorces		Amorces		Amorces		Mini amorces	
		Sens (S1)	Anti-sens (AS1)	Sens (A1)	Anti-sens (B1)	Sens (A2)	Anti-sens (B2)
Mère présumée	Haplotype mitochondrial (mitotype)	16126 T>C	16126 T>C	16126 T>C	16126 T>C	-	16126T>C
		16294 C>T	16294 C>T	16294 C>T	16294 C>T	16294 C>T	-
		16304 T>C	16304 T>C	16304 T>C	16304 T>C	16304 T>C	-
Fille X	Haplotype mitochondrial (mitotype)	16126 T>C	16126 T>C	16126 T>C	16126 >C	-	16126T>C
		16294 C>T	16294 C>T	16294 C>T	16294 >T	16294 >T	-
		16304 T>C	16304 T>C	16304 T>C	16304T>C	16304T>C	-

Au niveau de cette région HV1, nous avons détecté aux mêmes positions, trois mutations dans l'ADNmt de la mère présumée et trois mutations dans l'ADNmt de la fille X, il s'agit de :

- substitution de T présente à la position 16126 de la **rCRS** par C (transition)
- substitution de C présente à la position 16294 de la **rCRS** par T (transition)
- une substitution de T présente à la position 16304 de la **rCRS** par C (transition)

Aucune mutation à la position 16126, n'a été détecté en utilisant la mini amorce A2 ainsi qu'aux positions 16294 et 16304 en utilisant la mini amorce B2, cela est dû au fait qu'elles sont situées en amont du site d'hybridation de l'amorce.

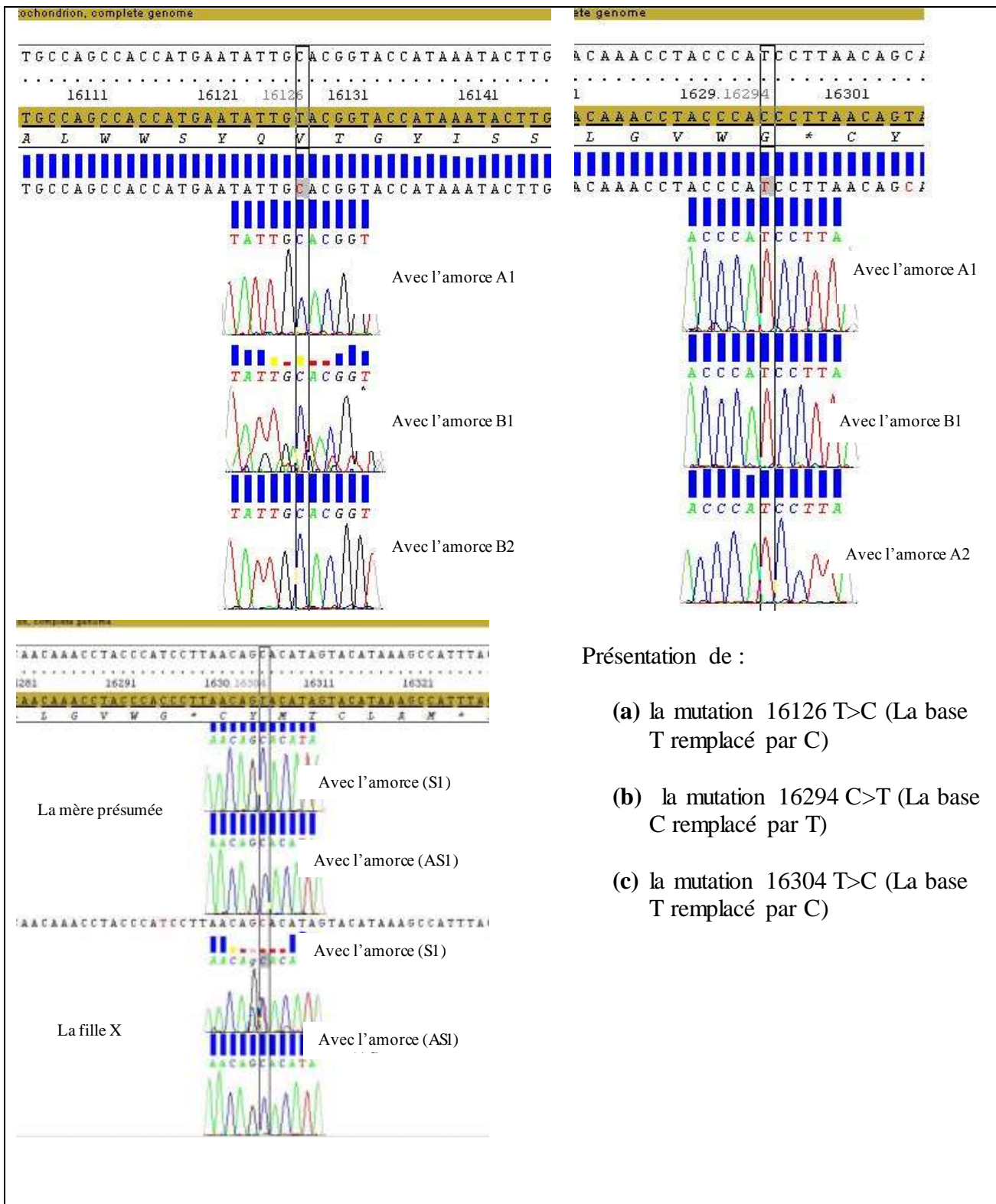
Figure 34 reporte les mutations détectées au niveau de la région HV1 de l'ADNmt des échantillons [ADN01 et ADN02] du premier cas, telles qu'elles sont représentées par l'interface du logiciel *SeqScap*®.

(a)					
Mutations					
Base Change	ROI	Position	Length	Type	
1-16046delGATCACAGGTCTA TCACCCT...TTTCATGGGGAA GCAGATT	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	1	16046	Del	
16126T>C	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16126	1	Sub	
16294C>T	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16294	1	Sub	
16304T>C	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16304	1	Sub	

(b)					
Mutations					
Base Change	ROI	Position	Length	Type	
1-16046delGATCACAGGTCTA TCACCCT...TTTCATGGGGAA GCAGATT	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	1	16046	Del	
16126T>C	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16126	1	Sub	
16294C>T	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16294	1	Sub	
16304T>C	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16304	1	Sub	

Figure 34 : Présentation des mutations détectées au niveau de la région HV1 de l'ADNmt : (a) de la mère présumée et (b) de la fille X, selon les deux stratégies

La **Figure 35** représente les électrophorogrammes illustrant les trois mutations décrites dans ce cas de recherche du lien maternel



Présentation de :

- (a) la mutation 16126 T>C (La base T remplacé par C)
- (b) la mutation 16294 C>T (La base C remplacé par T)
- (c) la mutation 16304 T>C (La base T remplacé par C)

Figure 35 : Présentation des électrophorogrammes des mutations détectées au niveau de la région HVI de l'ADNmt de la mère présumée et de la fille X (premier cas)

IV.5.2.1 Résultats du séquençage de la région HV2 de l'ADN mt

La Figure 36 indique les mutations détectées sur la région HV2 au niveau de l'ADNmt de la mère présumée et la fille X (premier cas)

(a)

Specimens in Report						
Specimen1						
Specimen1						
Mutations						
Specimen	Base Change	ROI	Position	Length	Type	QV
Specimen1	1-70delGATCACAGGTCTATC ACCCTATTAACCACTCACGG GAGCTCTCCATGCATTTGGT -ATTTTCGTGTGGGGG	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	1	70	Del	42(avg)
Specimen1	73A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	73	1	Sub	42
Specimen1	239T>C	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	239	1	Sub	50
Specimen1	263A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	263	1	Sub	36
Specimen1	315-316insC	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	315	1	Ins	37

(b)

Specimen3						
Specimen3						
Mutations						
Specimen	Base Change	ROI	Position	Length	Type	QV
Specimen3	1-20delGATCACAGGTCTATCAC CCT	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	1	20	Del	11(avg)
Specimen3	73A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	73	1	Sub	48
Specimen3	239T>C	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	239	1	Sub	46
Specimen3	263A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	263	1	Sub	39
Specimen3	315-316insC	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	315	1	Ins	45

Figure 36 : Présentation des mutations détectées au niveau de la région HV2 de l'ADNmt (a) de la mère présumée et (b) de la fille X

Tous les résultats du séquençage ciblant la région HV2 concernant les échantillons du cas traité dans cette partie et selon les deux stratégies, sont rassemblés dans Tableau X

Tableau X : Résultats du séquençage de la région HV2 selon les deux stratégies concernant le premier cas

Région HV2		(stratégie 1)		(stratégie 2)			
Les amorces		Amorces		Amorces		Mini amorces	
		Sens (S2)	Anti-sens (AS2)	Sens (C1)	Anti-sens (D1)	Sens (C2)	Anti-sens (D2)
Mère présumée	Haplotype mitochondrial (mitotype)	73 A >G	73 A >G	73 A >G	73 A >G	-	73 A >G
		239 T>C	239 T>C	239 T>C	239 T>C	239T >C	-
		263 A>G	263 A>G	263 A>G	263 A>G	263A >G	-
		315.1C	315.1C	315.1C	315.1C	315.1C	-
Fille X	Haplotype mitochondrial (mitotype)	73 A >G	73 A >G	73 A >G	73 A >G	-	73A >G
		239 T>C	239 T>C	239 T>C	239 T>C	239T >C	-
		263 A>G	263 A>G	263 A>G	263 A>G	263A >G	-
		315.1C	315.1C	315.1C	315.1C	315.1C	-

Nous avons détecté aux mêmes positions quatre mutations au niveau de la région HV2 de l'ADNmt de la mère quatre mutations pour celui de la fille X, il s'agit de :

- substitution de A présente à la position 73 de la rCRS par G (transition)
- substitution de T présente à la position 239 de la rCRS par C (transition)
- substitution de A présente à la position 263 de la rCRS par G (transition)
- insertion de C entre les positions 315 et 316 de la rCRS

Aucune mutation n'a été détectée à la position 73 en utilisant la mini amorce C2 ainsi qu'aux positions 239, 263 et 315 en utilisant la mini amorce D2 pour la même raison citée précédemment.

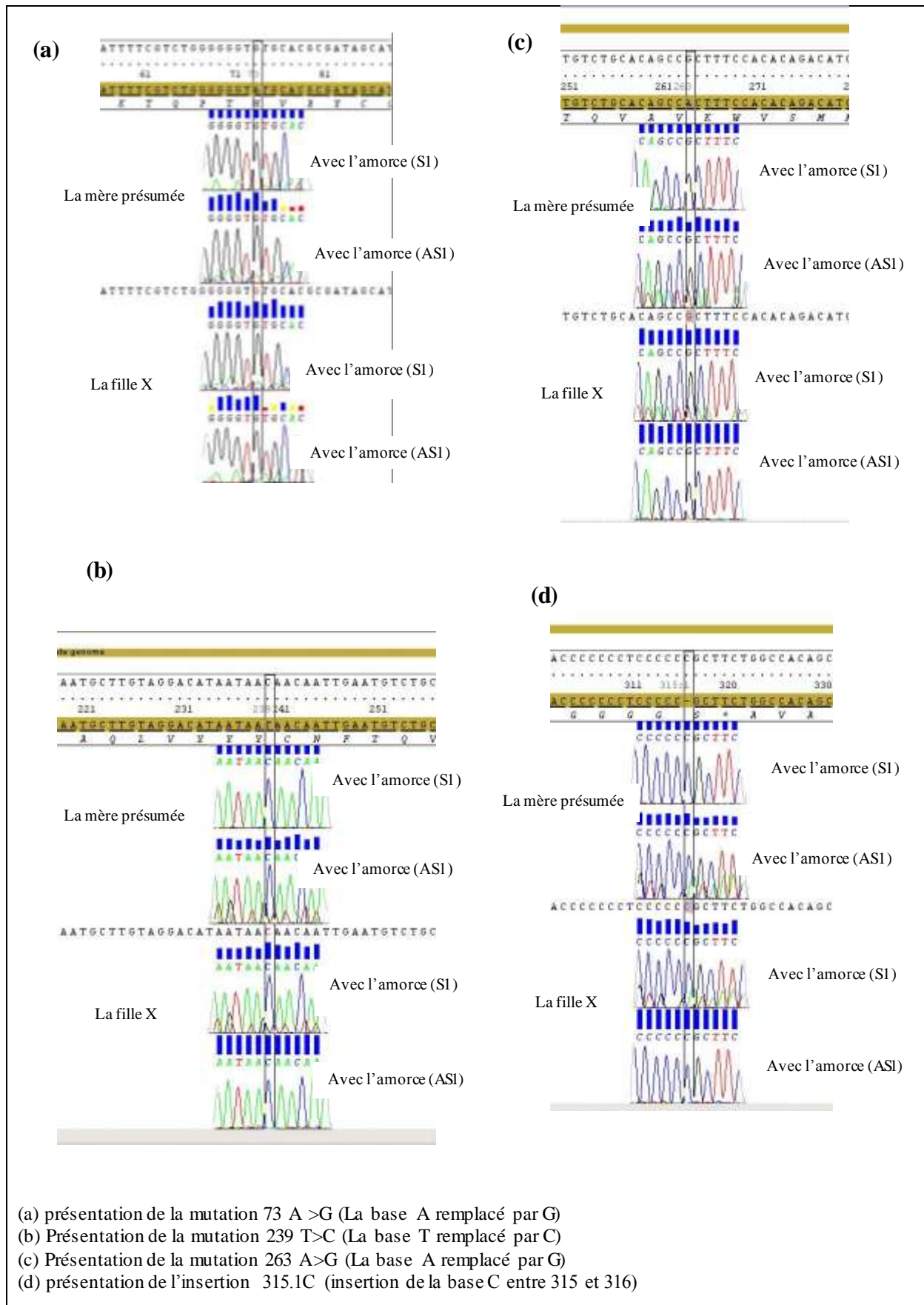


Figure 37 : Présentation des électrophorègrammes des mutations détectées au niveau la région HV2 de l'ADNmt de la mère présumée et de la fille X

Concernant notre premier cas d'étude, et après analyse des différents résultats obtenus pour toutes les mutations détectées sur les douze (12) séquences (sens et anti sens) ciblant les deux régions séquencées HV1 et HV2 (mère présumée et fille X), selon le protocole décrit (six amorces ; deux stratégies), nous sommes parvenues au résultat du mitotype suivant :

- Haplotype ADNmt obtenu à partir du prélèvement :

- Buccal de la mère présumée (code ADN01)

ADN01: 16126C 16294T 16304C 73G 239G 263G 315+c

- Sanguin de la fille X (code ADN02)

ADN02: 16126C 16294T 16304C 73G 239G 263G 315+c

Ce résultat nous montre clairement que les deux mitotypes de la mère présumée et celui de la fille X concordent en utilisant aussi bien la première ou la deuxième stratégie de séquençage. Dans ce cas, nous pouvons établir la conclusion « qu'on ne peut pas écarter que les deux personnes à l'origine de ces échantillons sont reliées par voie maternelle ».

Grâce au résultat de cette analyse nous pouvons donc consolider les résultats de l'empreinte génétique (Analyse des marqueurs STR), obtenus lors de la première analyse de l'ADNn.

IV.5.3 Deuxième cas : recherche de lien de maternité entre une mère présumée et un cadavre X

IV.5.3.1 Résultats du séquençage de la région HV1 de l'ADN mt

La **Figure 38** reporte les mutations détectées au niveau de la région HV1 de l'ADNmt de la mère présumée et du cadavre X.

(a)					
16209T>C	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16209	1	Sub	
16223C>T	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16223	1	Sub	
16292C>T	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16292	1	Sub	
16311T>C	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16311	1	Sub	

(b)					
16209T>C	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16209	1	Sub	
16223C>T	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16223	1	Sub	
16292C>T	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16292	1	Sub	
16311T>C	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16311	1	Sub	

Figure 38 : Présentation des mutations détectées au niveau de la région HV1 de l'ADNmt extrait à partir de (a) prélèvement buccal de la mère présumée et (b) du prélèvement de restes cadavériques

Tous les résultats du séquençage ciblant la région HV1, selon les deux stratégies, obtenus à partir du prélèvement buccal de la mère présumée et des restes cadavériques, sont détaillés dans le Tableau XI.

Tableau XI : Résultats du séquençage de la région HV1 selon les deux stratégies concernant le deuxième cas

Région HV1		(stratégie 1)		(stratégie 2)			
Les amorces		Amorces		Amorces		Mini amorces	
		Sens	Anti-sens	Sens	Anti-sens	Sens	Anti-sens
		(S1)	(AS1)	(A1)	(B1)	(A2)	(B2)
Mère présumée	Haplotype mitochondrial (mitotype)	16209 T>C	16209 T>C	16209 T>C	16209 T>C	16209 T>C	16209 T>C
		16223C>T	16223C>T	16223C>T	16223C>T	16223C>T	16223C>T
		16292C>T	16292C>T	16292C>T	16292C>T	16292C>T	-
		16311T>C	16311T>C	16311T>C	16311T>C	16311T>C	-
cadavre X	Haplotype mitochondrial (mitotype)	16209 T>C	16209 T>C	16209 T>C	16209 T>C	16209 T>C	16209 T>C
		16223C>T	16223C>T	16223C>T	16223C>T	16223C>T	16223C>T
		16292C>T	16292C>T	16292C>T	16292C>T	16292C>T	-
		16311T>C	16311T>C	16311T>C	16311T>C	16311T>C	-

Au niveau de la région HV1, nous avons détecté aux mêmes positions quatre mutations aussi bien sur l'ADNmt de la mère présumée que celui du cadavre X, il s'agit de :

- substitution de T présente à la position 16209 de la rCRS par la C (transition)
- substitution de C présente à la position 16223de la rCRS par T (transition)
- substitution de C présente à la position 16292 de la rCRS par la T (transition)
- substitution de T présente à la position 16311de la rCRS par la C (transition)

Aucune mutation n'a été détecté en utilisant les mini amorces B2 aux positions 16292 et 16311.

IV.5.3.2 Résultats du séquençage de la région HV2

Tous les résultats du séquençage ciblant la région HV2, selon les deux stratégies, obtenus à partir du prélèvement buccal de la mère présumée et les restes cadavériques, sont détaillés dans le Tableau XII

Tableau XII : Résultats du séquençage de la région HV2 selon les deux stratégies concernant le deuxième cas

Région HV2		(stratégie 1)		(stratégie 2)			
Les amorces		Amorces		Amorces		Mini amorces	
		Sens (S2)	Anti-sens (AS2)	Sens (C1)	Anti-sens (D1)	Sens (C2)	Anti-sens (D2)
Mère présumée	Haplotype mitochondrial (mitotype)	73A/G	73A/G	73A/G	73A/G	-	73A/G
		189A/G	189A/G	189A/G	189A/G	189A/G	189A/G
		200A/G	200A/G	200A/G	200A/G	200A/G	200A/G
		263A/G	263A/G	263A/G	263A/G	263A/G	-
		315+ C	315+ C	315+ C	315+ C	315+ C	-
cadavre X	Haplotype mitochondrial (mitotype)	73A/G	73A/G	73A/G	73A/G	-	73A/G
		189A/G	189A/G	189A/G	189A/G	189A/G	189A/G
		200A/G	200A/G	200A/G	200A/G	200A/G	200A/G
		263A/G	263A/G	263A/G	263A/G	263A/G	-
		315+ C	315+ C	315+ C	315+ C	315+ C	-

Nous avons détecté aux mêmes positions cinq mutations aussi bien sur l'ADNmt de la mère présumée que celui du cadavre X, il s'agit de :

- substitution de A présente à la position 73 de la rCRS par G (transition)
- substitution de A présente à la position 189 de la de la rCRS par (G transition)
- substitution de A présente à la position 200 de la rCRS par G (transition)
- substitution de A présente à la position 263 de la rCRS par G (transition)
- insertion de C entre les positions 315 et 316 de la rCRS

Aucune mutation n'a été détectée en utilisant les mini amorces C2 à la position 73 et D2 aux positions 263 et 315.

La Figure 39 reporte ces mutations détectées à partir des échantillons [ADN03 et ADN04] de ce présent cas.

Position	Reference	Count	Count	Type
73A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	73	1	Sub
189A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	189	1	Sub
200A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	200	1	Sub
263A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	263	1	Sub
315-316insC	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	315	1	Ins

Position	Reference	Count	Count	Type
73A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	73	1	Sub
189A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	189	1	Sub
200A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	200	1	Sub
263A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	263	1	Sub
315-316insC	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	315	1	Ins

Figure 39 : Représentation des mutations détectées au niveau la région HV2 de l'ADNmt (a) de la mère présumée (b) du cadavre X

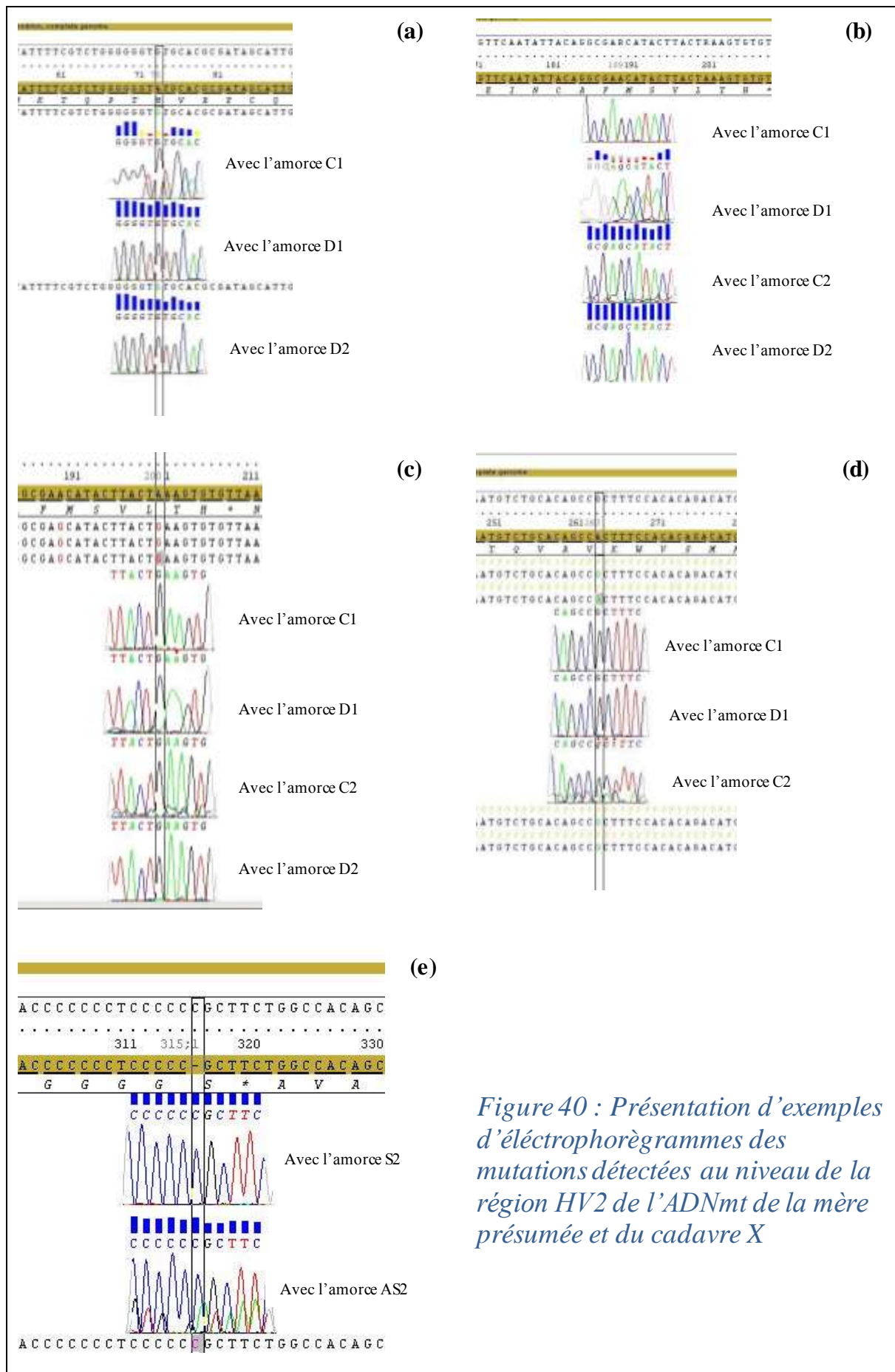


Figure 40 : Présentation d'exemples d'électrophorogrammes des mutations détectées au niveau de la région HV2 de l'ADNmt de la mère présumée et du cadavre X

Concernant ce deuxième cas d'étude, et après analyse des différents résultats obtenus pour toutes les mutations détectées sur les douze (12) séquences (sens et anti sens) ciblant les deux régions séquencés HV1 et HV2 (la mère présumée et cadavre X), selon le protocole décrit (six amorces ; deux stratégies), nous sommes parvenues au résultat du mitotype suivant :

- mère présumée (code ADN 03)

16209C 16223T 16292T 16311C 73G 189G 200G 263G 315+C

- cadavre X (code ADN04)

16209C 16223T 16292T 16311C 73G 189G 200G 263G 315+C

Ce résultat nous montre clairement que les deux mitotypes de la mère présumée et celui du cadavre X concordent en utilisant aussi bien la première ou la deuxième stratégie de séquençage. Dans ce cas, nous pouvons établir la conclusion « qu'on ne peut pas écarter que les deux personnes à l'origine de ces échantillons sont reliées par voie maternelle ». Grâce au résultat de cette analyse nous avons prouvé donc la possibilité de l'exploitation des échantillons dégradés, voire putréfiés afin d'établir l'identification humaine par le lien de filiation maternelle.

IV.5.4 Troisième (cas Témoin): confirmation du lien de maternité entre une mère et sa fille

IV.5.4.1 Résultats du séquençage de la région HV1 de l'ADNmt

Tous les résultats du séquençage ciblant la région HV1, selon les deux stratégies, sont détaillés dans le

Tableau XIII

Tableau XIII : Résultats du séquençage de la région HV1 selon les deux stratégies concernant le troisième cas

Région HV1		(stratégie 1)		(stratégie 2)			
		Amorces		Amorces		Mini amorces	
Les amorces		Sens	Anti-sens	Sens	Anti-sens	Sens	Anti-sens
		(S1)	(AS1)	(A1)	(B1)	(A2)	(B2)
Mère	Haplotype mitochondrial (mitotype)	16172 T>G	16172 T>G	16172 T>G	16172 T>G	16172 T>G	16172 T>G
		16219 A>G	16219 A>G	16219 A>G	16219 A>G	16219 A>G	16219 A>G
		16235 A>G	16235 A>G	16235 A>G	16235 A>G	16235 A>G	-
		16278 C>T	16278 C>T	16278 C>T	16278 C>T	16278 C>T	-
Fille	Haplotype mitochondrial (mitotype)	16172 T>G	16172 T>G	16172 T>G	16172 T>G	16172 T>G	16172 T>G
		16219 A>G	16219 A>G	16219 A>G	16219 A>G	16219 A>G	16219 A>G
		16235 A>G	16235 A>G	16235 A>G	16235 A>G	16235 A>G	-
		16278 C>T	16278 C>T	16278 C>T	16278 C>T	16278 C>T	-

Nous avons détecté quatre mutations aux mêmes positions au niveau de la région HV1 de l'ADNmt de la mère et quatre mutations sur l'ADNmt de la fille, il s'agit de :

- substitution de T présente à la position 16172 de la rCRS par G (transversion)
- substitution de A présente à la position 16219 de la rCRS par G (transition)
- substitution de A présente à la position 16235 de la rCRS par G (transition)
- substitution de C présente à la position 16278 de la rCRS par T (transition)

Aucune mutation n'a été détecté en utilisant la mini amorce B2 aux positions 16235 et 16278.

La Figure 41 reporte les mutations détectées sur la région HV1 des échantillons du troisième cas [ADN05 et ADN06].

(a)						
Mutations						
Specimen	Base Change	ROI	Position	Length	Type	QV
Specimen3	1-16121delGATCACAGGTCTATC ACCCT...TACTGCCAGCCACCAT GAAT	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	1	16121	Del	29(avg)
Specimen3	16172T>C	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16172	1	Sub	22
Specimen3	16219A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16219	1	Sub	21
Specimen3	16235A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16235	1	Sub	17
Specimen3	16278C>T	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16278	1	Sub	26

(b)						
Mutations						
Specimen	Base Change	ROI	Position	Length	Type	QV
Specimen1	1-16131delGATCACAGGTCTATC ACCCT...CACCATGAATATTGTAC GGT	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	1	16131	Del	23(avg)
Specimen1	16172T>C	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16172	1	Sub	21
Specimen1	16219A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16219	1	Sub	30
Specimen1	16235A>G	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16235	1	Sub	23
Specimen1	16278C>T	gi 251831106 ref NC_012920.1 Homo sapiens mitochondrion, complete genome	16278	1	Sub	36

Figure 41 : Représentation des mutations détectées au niveau de la région HV1 de l'ADNmt (a) de la mère (b) de la fille

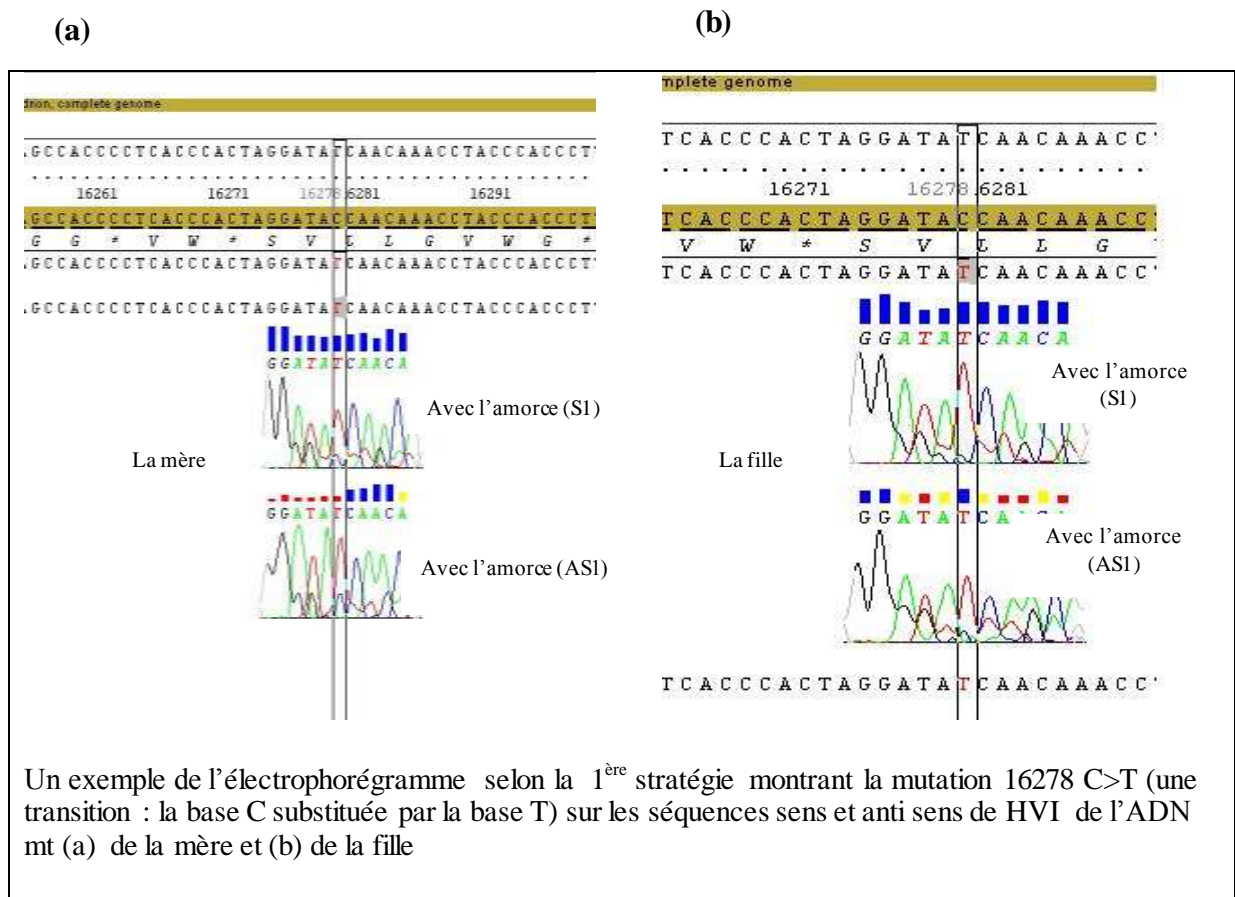


Figure 42 : Présentation d'un exemple de mutation détectée sur HVI (troisième cas).

IV.5.4.2 Résultats du séquençage de la région HV2 de l'ADNmt

Les résultats du séquençage de la région HV2 pour ce cas se sont révélés négatifs, aucun assignement n'a été détecté (Figure 43)

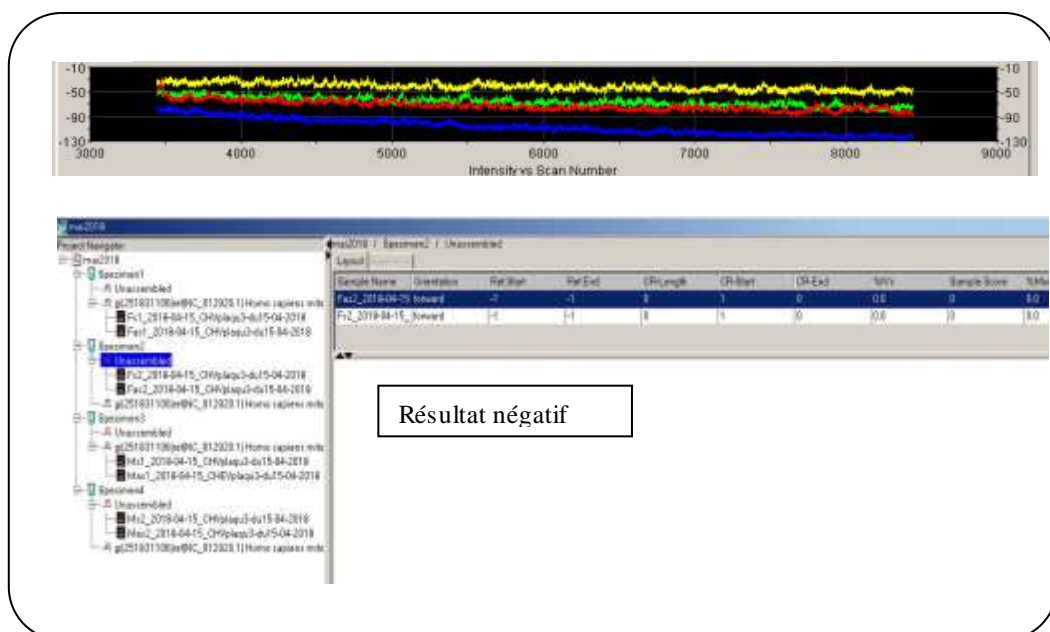


Figure 43: présentation des données brutes du résultat du séquençage de la région **HV2** de l'ADNmt de la mère et la fille, analysés avec Data Collection (a) et les résultats de non assignement après traitement avec le SeqScap (b)

Concernant ce dernier cas d'étude, et après analyse des différents résultats obtenus pour toutes les mutations détectées sur les six séquences (sens et anti sens) ciblant la région HV1 de l'ADNmt de la mère et sa fille, nous sommes parvenues au résultat du mitotype partiel suivant :

➤ la mère (code ADN05)

16172G 16219G 16235G 16278 T

➤ la fille (code ADN06)

16172G 16219G 16235G 16278 T

Dans notre troisième cas d'étude nous avons rencontré un problème d'assignation de la région HV2, cela peut être dû à la dégradation des amorces spécifiques à cette région, vu qu'elles ont été régénérées bien avant que celles de HV1. Ceci nous a amené à vérifier la qualité des amorces de HV2. Pour tenter de résoudre ce problème, une deuxième analyse a été faite, mais elle s'est révélée toujours négative. Alors nous avons suggéré de procéder à un contrôle sur minigel et malgré les difficultés de visualisation, nous sommes parvenues à distinguer uniquement la bande correspondant à HV1 qui a fait objet d'une bonne migration, tandis que celle correspondant à HV2 s'est manifestée par une trainée sur le gel. Ceci semble confirmer l'hypothèse de la dégradation des amorces de HV2 donnant l'explication du résultat négatif.

Ce dernier cas d'étude est encourageant pour nous parce qu'il nous a permis de prouver la possibilité de l'exploitation des prélèvements capillaires dépourvus de bulbes où l'analyse de l'ADNn est impossible et par la même occasion d'initier la validation d'un nouveau protocole d'extraction d'ADN à partir de ce type d'échantillon .

IV.6 Exemple de recherche bioinformatique de l'appartenance d'un haplotype à un haplogroupe

Après obtention des mitotypes nous avons tenté d'identifier les haplogroupes auxquels appartiennent les haplotypes mitochondriaux des personnes ayant fait l'objet de notre étude, par bioinformatique. Nous avons consulté une base de données disponible au niveau du Laboratoire de Police Scientifique qui est sous forme d'un fichier Excel regroupant 2500

haplogroupes et sous haplogroupes (*fichier excel /Control-region haplogroup motifs (relative to the rCRS) distilled from PhyloTree Build 13*). Elle est mise à jour par le groupe EDNAP (Bandelt et al., 2012).

	A	B	C
1	Supplementary Table 1. Control-region haplogroup motifs (relative to the rCRS) distilled from PhyloTree Build 13.		
2			
3	Haplogroup	Extended HVSI (16024-16569)	Extended HVSI (1-576)
265	L3b1a6	16124 16223 16278 16362	73 152 263
266	L3b1b	16124 16223 16278 16362	73 152 263
267	L3b1b1	16124 16223 16278 16362	73 152 217 263
268	L3b2	16124 16223 16278 16362 16527	73 263
269	L3b2a	16124 16189 16223 16278 16362 16527	73 263
270	L3f	16209 16223	73 263
271	L3f1	16209 16223	73 263
272	L3f1a	16209 16223	73 263
273	L3f1a1	16209 16223	73 263
274	L3f1b	16209 16223 16292 16311	73 189 (200) 263
275	L3f1b1	16209 16223 16292 16295 16311	73 189 (200) 263
276	L3f1b2	16209 16223 16292 16311	73 189 (200) 263
277	L3f1b2a	16172 16209 16223 16266A 16292 16311	73 189 (200) 263
278	L3f1b-150	16209 16223 16292 16311	73 150 189 (200) 263
279	L3f1b3	16209 16223 16292 16311	73 150 189 (200) 263
280	L3f1b4	16209 16223 16292 16311	73 150 189 (200) 263
281	L3f1b4a	16209 16223 16311	73 150 189 (200) 263
282	L3f1b4a1	16209 16223 16311	73 150 189 (200) 263
283	L3f2	16209 16223 16311	73 263
284	L3f2a	16209 16223 16311	73 152 263
285	L3f2a1	16209 16223 16311	73 152 263
286	L3f2b	16209 16223 16311	73 263 374.1A
287	L3f3	16176 16209 16223 16234	73 189 263 318
288	L3f3a	16176 16209 16223 16234 16284	73 189 263 318
289	L3c'd	16223	73 152 263
290	L3c	16223 16311 16362	73 152 195 263 498.1C
291	L3d	16124 16223	73 152 263

Figure 44 : Résultat de la recherche de l'haplogroupe du cadavre X présenté par l'interface de la base de données

Seul le mitotype déterminé à partir du prélèvement de restes cadavériques était répertorié dans cette base de données. Il appartient à l'haplogroupe **L3** et au sous haplogroupe **L3f1b2** qui est fréquent dans le Nord Est de l'Afrique (Mc Donald, 2005 ; Parson et Dür, 2007). Ceci est en accord avec l'appartenance géographique de mère présumée, qui d'après l'enquête est originaire de l'Est du pays.

IV.7 Discussion générale

A la lumière des résultats obtenus pour ces trois cas analysés, il s'avère que cette technique d'identification humaine utilisant l'ADNmt, nous a permis de retrouver la filiation maternelle premièrement dans le cadre d'une recherche maternité, deuxièmement de contribuer à l'identification des restes d'un cadavre et enfin de confirmer que même sur un échantillon dépourvu d'ADNn, nous avons pu mettre en évidence un mitotype.

La reproductibilité des résultats de mitotypage obtenus pour les trois cas étudiés en utilisant les amorces ciblant chacune des régions HV1 et HV2 selon les deux stratégies qu'on a proposé [les deux paires d'amorces sens/anti sens (S1/AS1, S2/AS2) pour la première stratégie ou avec les deux paires d'amorces sens/anti sens (A1/B1, C1/D1) et les deux paires mini-amorces (A2/B2 et C2/D2) pour la deuxième stratégie] offre un avantage pour le choix de la stratégie de séquençage selon la nature de l'échantillon à analyser. (Wilson et al., 1993 ; Tully et Wetton, 2014).

Depuis 2004, le département d'identification génétique du LPS analyse le polymorphisme des STR à des fins d'identification humaine. Au cours de cette période, différents types d'échantillons (sang, salive, cheveux télogènes, poils, ongles, tissus, restes cellulaires, os et dents) liés à des homicides, des agressions sexuelles, des vols et l'identification de restes humains ont été étudiés. Quelques constatations problématiques ont été détectées dans le traitement des dossiers judiciaires de routine impliquant les limites de cette technique en matière de quantité et de qualité d'ADN des échantillons analysés.

Pour cette raison l'analyse du polymorphisme de l'ADNmt des deux régions hypervariables HV1 et HV2 de la D-loop, est devenue un outil incontournable dans ce domaine de l'identification et de la recherche de l'origine matrilineaire.

Le polymorphisme de l'ADNmt est moins marqué que celui de l'ADNn et l'analyse qui en est faite est moins discriminante, néanmoins il présente des intérêts ; préservé par la haute résistance de la mitochondrie et présent à de nombreux exemplaires dans une cellule (de l'ordre de 50 génomes mitochondriaux pour un seul génome nucléaire), il peut être analysé sur des traces anciennes ou fortement dégradées sur lesquelles l'ADNn n'est plus exploitable. Cette analyse en a fait ces dernières années un fréquent usage, notamment pour l'identification des os anciens, des victimes de guerre et de catastrophes de grandes ampleurs. Il peut également permettre d'expertiser des tissus biologiques dépourvus d'ADNn, mais riches en ADNmt, qui sont prélevés sur une scène de crime. C'est notamment le cas des tiges capillaires (Bourdon et al., 2014 ; Al-Sammarraie, 2016).

Durant les études réalisées dans ce travail, nous avons contribué à la mise au point d'un protocole pour le séquençage des deux régions hypervariables HV1 et HV2 de La D-Loop de l'ADNmt à des fins d'application dans le domaine forensique. Pour cela et dans la mesure d'assurer une très grande qualité de données, toutes les recommandations concernant cette technique d'analyse ont été bien suivies.

Les résultats de la quantification d'ADN des échantillons ayant fait l'objet de ce travail se sont révélés très orientatifs pour le choix de la stratégie de séquençage. Ils révèlent aussi le bon choix des protocoles d'extraction et d'amplification d'ADN.

Le mitotype du témoin positif a été obtenu avec succès et il concorde avec celui attendu (Wilson, 2003 ; Bintz et *al.*, 2014), il nous a permis d'évaluer l'efficacité de l'étape d'amplification. Pour tous les témoins négatifs à savoir ceux de l'extraction, des deux PCR et de la post-PCR, les résultats du séquençage étaient bien négatifs, indiquant le bon suivi des consignes durant toutes les étapes de l'analyse de l'ADNmt préconisées. Cela nous a permis de poursuivre notre travail et de pouvoir valider tous les résultats de cette technique.

Bien que cette technique est très répandue dans la plus part des laboratoires de police scientifique à travers le monde, depuis les années 90 (Wilson et *al.*, 1993 ; Tully et Wetton, 2014), en Afrique et plus particulièrement en Algérie, elle est méconnue, au sein d'institutions médico-légales. Cette présente étude représente donc, une première.

Le Laboratoire de Police Scientifique étant actuellement à vocation de recherches en ADNn, il n'est pas doté de moyens adéquats pour la quantification de l'ADNmt dans l'extractum et après son amplification. Le diagramme de la Figure 45 illustre les deux points critiques à résoudre afin de parfaire cette technique. Pour cela nous préconisons la dotation du laboratoire de deux nouvelles techniques : (i) la première est la quantification par PCR en temps réel utilisant la sonde : *TaqMan® Primer and Probe for Detection of Mt-DNA (HV1)* (Kefi-Ben Atig et *al.*, 2003; Proserpio et Lönnberg, 2016), ciblant la région hypervariable HV1 de l'ADNmt grâce à deux amorces dont les séquences nucléotidiques sont les suivantes :

HV1- S (sens) CACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCC

HV1-AS (anti sens) AGGGTTGATTGCTGTACTTGCTT

(ii) la deuxième est la quantification des produits amplifiés à l'aide de l'appareil *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Mueller, 2001; Jensen, 2004 ; Andreasson et *al.*, 2006).

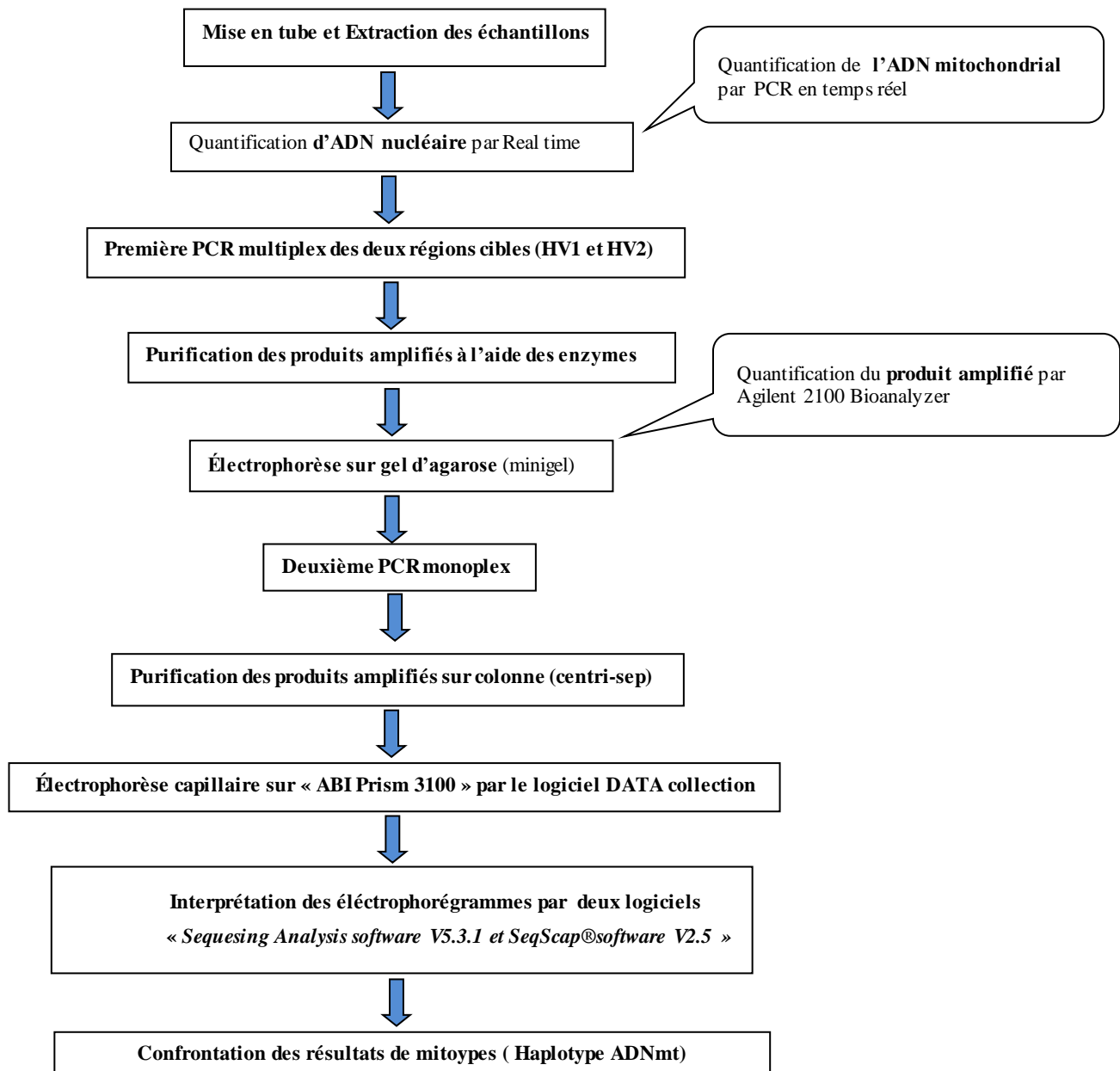


Figure 45 : Diagramme illustrant les des deux points critiques de l'analyse d'ADNmt et les recommandations préconisées

V. Conclusion et perspectives

L'intérêt de ce travail était avant tout d'initier la faisabilité et la reproductibilité de la méthode, les premiers résultats sont encourageants. Ils montrent le bon choix des techniques d'extraction d'ADN et des amorces pour la réussite de la stratégie de séquençage. Ils indiquent également la possibilité d'exploiter certains échantillons provenant de scène de crime dont l'analyse des STR est impossible. Il sera quand même nécessaire de réaliser de nouvelles expériences afin de confirmer ces premières observations et d'analyser un plus grand nombre d'échantillons et plus diversifié.

Cette technologie est lourde et onéreuse, s'agissant d'une méthode permettant l'analyse de micro-prélèvements biologiques, elle est très sensible aux contaminations. Plus encore que pour l'ADNn, la séparation des activités et la mise en place de nombreux contrôles (extraction-amplification) revêtent une importance particulière pour la validation des résultats.

Un problème majeur qui reste posé actuellement que nous avons rencontré dans cette procédure, est de pouvoir quantifier le plus exactement possible la quantité d'ADNmt à partir des échantillons analysés, face à cette contrainte, Il serait sans doute intéressant pour se faire d'utiliser des technologies déjà développées au sein de certains laboratoires de police scientifique. Il s'agit de la quantification de d'ADNmt par PCR en temps réel de la région hypervariable HV1 et de la quantification des produits amplifiés à l'aide de l'appareil Agilent 2100 Bioanalyzer capable d'analyser des fragments d'ADN amplifiés des deux régions hypervariables HV1 et HV2 .

D'un point de vue plus général, cette technique d'analyse de l'ADNmt offre différentes perspectives. Il serait donc souhaitable dans un proche avenir de mettre en place au niveau du Laboratoire de Police Scientifique l'analyse des polymorphismes mononucléotidiques (SNP **S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism) définissant l'haplogroupe dans la région codante de l'ADNmt, qui pourrait effectivement améliorer le pouvoir de discrimination (Nilsson et *al.*, 2008).

L'évaluation et la validation de cette technique, permettant de pouvoir la généraliser pour tous types d'échantillon pouvant provenir des scènes de crime ou à partir d'échantillons contenant de l'ADN ancien en infime quantité ou hautement dégradé.

Il serait également intéressant de faire une étude populationnelle, dans le but de concevoir une base de données spécifique pour l'Algérie contenant tous les haplotypes et les haplogroupes représentatifs de toutes les régions et les ethnies (Imaizumi et *al.*, 2002 Saoudi, 2016 ; Bekada, 2015).

Références bibliographiques

A

Aboukhalid R. (2013). Caractérisation anthropo-génétique d'un Echantillon de la population marocaine en utilisant les marqueurs uni-parentaux (Chromosome Y et ADN mitochondrial) thèse de Doctorat Université Mohammed V, Agdal Faculté Des Sciences, Rabat, Maroc, 160 pages.

Aboukhalid R., Sturk-Andreaggi K., Bouabdellah D S., Irwin J A et Amzazi S. (2013). Mitochondrial DNA control region variation from samples of the Moroccan population. *International Journal of Legal Medicine*, 127:757–759.

Adachi N., Umetsu K., Takigawa W et Sakaue K. (2004) .Phylogenetic analysis of the human ancient mitochondrial DNA. *Journal of Archaeological Science*, 31:1339-48.

Al-Sammarraie H.K.I. (2016). Comparison between Two Different DNA Extraction Techniques Taken from Buccal Swabs Suitable for Genetic Analyzer. *Journal of Al-Nahrain University*, 19 (3):108-113.

Alvarez-Cubero M.J., Martinez-Gonzalez S.M., Alvarez J.C., Eisenberg A.J., Budowle B et Lorente J.A. (2012). Genetic Identification of Missing Persons: DNA Analysis of Human Remains and Compromised Samples. *Pathobiology*, 79:228–238.

Anderson S., Bankier A.T., Barrel B.G., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon J.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Staden R. et Young I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 90: 457-465.

Andreasson H., Nilsson M., Budowle B., Lundberg H et Allen M. (2006). Nuclear and Mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. *Forensic Science international*, 164 : 55-64.

Andrews R. M., Kubacka I., Chinnery P. F., Lightowers R. N., Turnbull D. M. et Ho well N. (1999). Reanalysis and revision of the cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, 23 (2):147

Asari M., Umetsu K., Adachi N., Azumi J., Shimizu K et Shiono H. (2007). Utility of Haplogroup Determination for Forensic mtDNA Analysis in the Japanese Population. *Legal Medicine*, 9 (5):237-240.

B

Ballard D. Analysis of Mitochondrial Control Region Using Sanger Sequencing. (2016). Forensic DNA Typing Protocols, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1420, Springer Science New York.

Bandelt H., Kloss-Brandstätter A., Richards M.B., Yao Y et Logan I. (2014). The case for the continuing use of the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) and the standardization of notation in human mitochondrial DNA studies. *Journal of Human Genetics*, 59: 66–77.

- Bandelt H., van Oven M et Salas A. (2012). Haplogrouping mitochondrial DNA sequences. *Forensic Genetics. International Journal of Legal Medicine*, 126 (6):901-16.
- Bär W., B Brinkmann B., Budowle A., Carracedo P., Holland G M., Lincoln P J., Niels W M ., Olaisen M B., Schneider P ., Tully G et Wilson M. (2014). (DNA Commission of the Guidelines for Mitochondrial DNA Typing .International Society for Forensic Genetics. *Journal of Human Genetics*, 59: 66–77.
- Bekada A. (2015). Caractérisation antropogénétique d'un échantillon de la population algérienne : analyse des marqueurs parentaux. Thèse de Doctorat de l'Université Ahmed Ben Bela, Oran, Algérie ,292 pages.
- Bender K., Schneider P. M et Rittner C. (2000). Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. *Forensic Science International*, 113: 103–107.
- Berg Alonso L. (2016). Déficiés de la chaîne respiratoire mitochondriale avec instabilité de l'ADN mitochondrial : Identification de nouveaux gènes et mécanismes. Thèse de Doctorat de Université de Nice, France, 163 pages.
- Berger C., Hatzer-Grubwieser P., Hohoff C et Parson W. (2011) Evaluating sequence-derived mtDNA length heteroplasmy by amplicon size analysis. *Forensic Science International Genetics*, 5: 142–145.
- Bergman J. (2001). The Functions of Introns: From Junk DNA to Designed DNA. *Perspectives on Science and Christian Faith*, Volume 53, Number 3.
- Bergman J. (2013). The Origins and Genetic Functions of Pseudogenes. *Creation Research Society Quarterly*, 49:308–318.
- Bhinu S., Nur Haslindawaty A., Sundarajula P et Norazmi M. (2014). Sequence polymorphism of mitochondrial DNA hypervariable regions HVI and HVII in malay population of Malaysia. *Scientific world*, Vol. 12, No. 12.
- Bintz B J., Dixon G B et Wilson M R. (2014). Simultaneous Detection of Human Mitochondrial DNA and Nuclear-Inserted Mitochondrial-origin Sequences (NumtS) using Forensic mtDNA Amplification Strategies and Pyrosequencing. *Technology Journal Of Forensic Sciences*, Volume59 Issue: 41064-1073
- Blein S. (2014). Étude de la variabilité du génome mitochondrial comme facteur de susceptibilité au cancer du sein. Thèse de Doctorat L'université Claude Bernard, Lyon, France 264pages.
- Bourdon V., Ng C., Harris J et Prinz M. (2014). Optimization of Human mtDNA Control Region Sequencing for Forensic Applications. *Journal of Forensic Sciences*, 59:1057-1063.
- Brown, T.A., Cecconi, C., Tkachuk, A.N., Bustamante, C., and Clayton, D.A. (2005). Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes & Development*, 19: 2466–2476.

Budowle B., Allard M.W., Wilson M. R et Ranajit C. (2003). Forensics and mitochondrial DNA: Applications, Debates, and Foundations. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 4:119–41.

Budowle B., Polanskey D., Fisher C. L., Den Hartog B. K., Kepler R. B et Elling J. W. (2010). Automated Alignment and Nomenclature for Consistent Treatment of Polymorphisms in the Human Mitochondrial DNA Control Region. *Journal of Forensic Sciences*, 55(5):1190–1195.

Buś M.M., Nilsson M et Allen M. (2016). Analysis of Mitochondrial DNA from a Burned, Ninhydrin-Treated Paper Towel. *Journal of Forensic Sciences*, 61(3):828-832.

Butler J.M. (2005). Forensic DNA typing: Biology, technology, and genetics of STR markers. 2nd edition, New York: Elsevier, 660 pages.

Butler J. (2011). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. 1st Ed. Elsevier : Academic Press, 704 pages.

Butler J.M., et Hill C.R. (2012). Biology and Genetics of new Autosomal STR Loci Useful for Forensic DNA Analysis. *Forensic Science Review*, 24 (1):15-26.

C

Carey L et Mitnik L. (2002). Trends in DNA forensic analysis. *Electrophoresis*, 23, 1386–1397.

Carracedo A., Bär W., Lincoln P., Mayr W., Morling N., Olaisen B., Schneider P., Budowle B., Brinkmann B., Gill P., Holland M., Tully G. et Wilson M. (2000). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Science International*, 110: 79–85.

Cassereau J. et Codron P. (2016). Neuropathies héréditaires d'origine mitochondriale. *Pratique Neurologique – FMC*, Volume 7, Issue 2:93–99.

Chen X.J et Butow R.A. (2005). the organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature Review Genetics*, 6 (11): 815–825.

Clayton, D.A. (2003). Mitochondrial DNA replication: what we know. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 55: 213– 217.

Coble M D., Just R S., Saunier J L.; O’Callaghan J E.; Letmanyi I H Peterson., C T., Irwin J A., Vallone P M., Butler J M., et Parsons T J. (2005). Forensic Application of Sequence Variation in the Human mtDNA Genome Mitochondrial. Molecular Biology and Pathology Workshop NIH – Bethesda, MD April 29, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA and The Armed Forces DNA Identification Laboratory, Rockville, MD, USA.

Coble M D., Vallone P M., Just R S., D T M., S Brion et Parsons T J. (2006). Effective strategies for forensic analysis in the mitochondrial DNA coding region. *International Journal of Legal Medicine*, 120: 27–32.

Coquoz R. (2003). Preuve par l'ADN : La Génétique au Service de la Justice. 1ère édition, Lausanne, Presses polytechniques et universitaires romandes, 327P de pages.

Coquoz R., et Taroni F. (2006). Preuve par l'ADN. La génétique au service de la justice. 2ème édition, Lausanne, Presses polytechniques et universitaires romandes.

Côrte-Real HB., Macaulay VA., Richards MB, Hariti G., Issad MS., Cambon-Thomsen A., Papiha S., Bertranpetit J et Sykes BC. (1996). Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis. *Annals of Human Genetics*, 60 (4):331-50.

Coudray C., Olivieri A., Achilli A., Pala M., Melhaoui M., Cherkaoui M et Dugoujon J M. (2009). The complex and diversified mitochondrial gene pool of Berber populations. *Annals of Human Genetics*, 73: 196–214.

Cravo J P., Westring C G et Mazzanti H E. (2013). Comparative Analysis of Size Specific DNA Concentrators Following Organic DNA Extraction. A Presentation before the 65th Anniversary Meeting of the American Academy of Forensic Sciences, 18-23, Washington, D.C.

Cummins J M. (2002). The role of maternal mitochondria during oogenesis, fertilization and embryogenesis. *Reproductive BioMedicine Online* Vol 4. No 2: 176–182.

D

Deng YJ., Li YZ., Yu XG., Li L., Wu DY., Zhou J., Man TY., Yang G., Yan JW., Cai DQ., Wang J., Yang HM., Li SB et Yu J. (2005). Preliminary DNA identification for the tsunami victims in Thailand. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, (3):143-57.

Doutremepuich C. (2003). ADN mitochondrial de l'intérêt scientifique à la pratique judiciaire Edition : La Documentation Française, Collection : IHESI Année : 12/2003, 94 pages.

Doutremepuich C. (2012). Les empreintes génétiques en pratique judiciaire *Bulletin de l'Académie National de Médecine*, 196, N° 6, 1117-1130.

Dugan K A., Lawrence H S., Hares D R., Fisher C L et Budowle B. (2002). An improved method for post-PCR purification for mtDNA sequence analysis. *Journal of Forensic Sciences*, 47:811-18.

F

Falkenberg M., Larsson N et Gustafsson C. (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annual Review of Biochemistry*, 76: 679-699.

Friedman J R et Nunnar J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, 505: 335-343.

G

Gilkerson R., Bravo L., Garcia I., Gayta N., Herrera A., Maldonado A et Quintanilla B (2014). The Mitochondrial Nucleoid: Integrating Mitochondrial DNA into Cellular Homeostasis. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 5: a 011080.

Gill P., Jeffreys AJ et Werrett DJ. (1985). Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*, 318: 577-579.

Goiran, T. (2016). Etude de la protéine PINK1 dans la maladie d'Alzheimer et le Cancer Cérébral. Thèse de Doctorat de l'Université Côte d'Azur, France, 268 pages.

H

Howard R et al., (2013). Comparative analysis of human mitochondrial DNA from World War I bone samples by DNA sequencing and ESI-TOF mass spectrometry. *Forensic Science International: Genetics* 7:1-9.

I

Ingman M., Kaessmann H., Pääbo S et Gyllenstein U. (2000). Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature*, 408:708-713.

Irish D. J. (2000). The Iberomaurusian enigma: North African progenitor or dead end? *Journal of Human Evolution*, 39, 4: 393-410.

Ivanov P L., Wadhamsa M J., Roby R K., Holland M M., Weedn VW et Parsons T J. (1996). DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgi j Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nature Genetics*, volume12: 417-420

Imaizumi K., Parsons T. J., Yoshino M. M et Holland M. (2002). A new database of mitochondrial DNA hypervariable regions I and II sequences from 162 Japanese individuals *International Journal of Legal Medicine*, 116: 68-73

J

Jeffreys A J., Wilson V et Thein S L. (1985). Individual specific fingerprints of human DNA. *Nature*, 316:76-79.

Jeffreys A J., Neumann R et Wilson V. (1990). Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis. *Cell*, 60 (3):473-85.

Jensen M. (2004). Use of the Agilent 2100 Bioanalyzer and the DNA 500 LabChip in the Analysis of PCR Amplified Mitochondrial DNA. *Agilent Technologies publication*, 5989-0985 EN. www.agilent.com/chem.

Just R S., Irwin J A., O'Callaghan J E., Saunier J L., Coble M D., Vallone P M., Butler J M., Barritt S M., Parsons T J. (2004). Toward increased utility of mtDNA in forensic identifications. *Forensic Science International*, 146: 147-149.

K

Kefi-Ben Atig R., Stevanovitch A., Bouzaid E et Béraud-Colomb E. (2005). diversité mitochondriale de la population de taforalt . (12.000 ans bp – maroc): une approche génétique à l'étude du peuplement de l'Afrique du nord .*Anthropologie* XLIII/1 :1–11.

Kefi-Ben Atig R., Hsouna S., Beraud-Colom E et Abdelhak S. (2009). ADN mitochondrial : propriétés et applications. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 86 :1-4.

Kefi-Ben Atig R., Mafart B., Spadoni J. L., Stevanovitch A., Beraud-Colomb E. (2003) Application de la technique de la PCR en temps réel à l'étude de l'ADN ancien. *Comptes rendus Paleo*, vol 2 :125–132.

Kelkar Y D., Eckert K A., Chiaromonte F et Makova K D. (2011). A matter of life or death: How microsatellites emerge in and vanish from the human genome *Genome Research*, 21: 2038-2048

Kivisild T. (2015). Maternal ancestry and population history from whole mitochondrial genomes . *Investigative Genetics*, 6: 3.

L

Ladoukakis E D et Zouros E. (2017). Evolution and inheritance of animal mitochondrial DNA: rules and exceptions. *Journal of Biological Research – Thessaloniki*, 24:2

Lagerström-Fermér M., Olsson C., Forsgren L et Syvänen A. (2001). Heteroplasmy of the Human mtDNA Control Region Remains Constant during Life. *American Journal of Human Genetics*, 68:1299-1301.

Lander E S., Linton L M., Birren B., Nusbaum C. et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, Vol. 409 : 860-921.

Lazcano A et Peretó J. (2017). On the origin of mitosing cells: A historical appraisal of Lynn Margulis endosymbiotic theory. *The Journal of Theoretical Biology*, 434:80-87.

Lescuyer P. (2002). Etude de l'expression des gènes nucléaires codant pour les sous-unités du complexe I mitochondrial humain .thèse de Doctorat de l'Université Joseph Fourier- Grenoble I, France ,160 pages.

Li M., Schönberg A., Schaefer M., Schroeder R., Nasidze I et Stoneking M. (2010). Detecting Heteroplasmy from High-Throughput Sequencing of Complete Human Mitochondrial DNA Genomes. *American Journal of Human Genetics*, 87 (2):237-49.

Liu V W S., Yang H J., Wang Y., Tsang P C K., Cheung A N Y., Chiu P M., Ng T Y., Wong L C., Nagley P et Ngan H Y S. (2003). High frequency of mitochondrial genome instability in human endometrial carcinomas. *British Journal of Cancer*, 89 (4): 697 – 701.

Loistron S. (2009). Les empreintes génétiques en médecine légale : réalisation et législation (thèse du diplôme d'état de Docteur en chirurgie dentaire Université de Nantes-Unité de formation et de recherche d'odontologie, France, 128 pages.

Luning P.E.T et Kazazian Jr.H.H. (2000). Mobile elements and the human genome. *Nature Reviews Genetics*, vol 1: 133-144

Lutz S., Weisser H.J., Heizmann J., Pollak S. (1998). Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany, *International Journal of Legal Medicine*, 111 (2): 67–77.

M

McDonald JD. 2005. <http://www.scs.illinois.edu/~mcdonald/WorldHaplogroupsMaps.pdf>

Mansuet-Lupo A., Rouger P et Van Huffel V. 2007. Les empreintes génétiques : état de l'art en 2007, techniques, applications et législation. *Transfusion Clinique et Biologique* Volume 14, Issue 3, 334-342.

Melton T et Nelson K. (2001). Forensic Mitochondrial DNA Analysis: Two Years of Commercial Casework Experience in the United States. *Croatian Medical Journal*, 42:298-303.

Michikawa Y., Mazzucchelli F., Bresolin N., Scarlato G et Attardi G. (1999). Aging-Dependent Large Accumulation of Point Mutations in the Human mtDNA Control Region for Replication. *Science*, 286 (5440):774-9.

Monson K. L., Miller K. W. P., Wilson M. R., DiZinno J. A., and Budowle B. (2002). The mtDNA population database: An integrated software and database resource, *Forensic Science Communications [Online]*. Available: www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/april2002/miller1.htm.

Mueller O., Hahnenberger K., Dittmann M., Yee H., Dubrow R., Nagle R et Ilsley D. A (2000). microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis*, 21:128-134.

Mitochondrial DNA Analysis Protocol 2.wpd Issue Date: 3/26/2008.

N

Nass M.M.K et Nass S (1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics Fixation and Electron Staining Reactions. *Journal of Cell Biology*, 19 (3): 593–611.

Nicholls T.J et Minczuk M. (2014). In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA *Experimental Gerontology*, 56:175-181.

Nunn S. (2013). Touch DNA collection versus firearm fingerprinting: comparing evidence production and identification outcomes. *Journal of Forensic Sciences*, 58 (3):601–8.

Nussbaumer C et Korschineck I. (2006). Non human mtDNA helps to exculpate a suspect in a homicide case. *International Congress Series*, 1288:136-138

Nilsson M., H. Andréasson-Jansson, M. Ingman et M. Allen (2008). Evaluation of mitochondrial DNA coding region assays for increased discrimination in forensic analysis. *Forensic Science International Genetics*, 2: 1-8.

O

Oliver S., McMahon T., Konduru S., White A., Barritt S et MAJ Finelli L, DC, USA
Armed Forces DNA Identification Laboratory Validation and stability study of exosap-it®
post-PCR purified Casework mtDNA samples at the armed forces DNA identification
laboratory.

Olivieri A., Achilli A., Pala M., Battaglia V., Fornarino S., Al-Zahery N., Scozzari R., Cruciani F., Behar DM., Dugoujon JM., Coudray C., Santachiara-Benerecetti AS., Semino O., Bandelt HJ et Torroni A. (2006). The mtDNA legacy of the Levantine early Upper Palaeolithic in Africa. *Science*, 314: 1767-1770.

P

Parson W et Dür A. (2007). EMPOP-a forensic mtDNA database. *Forensic Science International Genetics*, 1(2):88-92.

Parson W., Gusmão L., Hares D.R., Irwin J.A., Mayr W.R., Morling N., Pokorak E., Prinz M., Salas A., Schneider P.M et Parsons T.J. k. (2014). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Science International Genetic*, 13: 134–142.

Parsons T., Muniec D S., Sullivan K., Woodvatt N., Alliston-Greiner R., Wilson M R., Berg D L., Holland K A., Weedn V W., Gill P et Holland M M. (1997). A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nature Genetics*, 15: 363-368.

Pham-Hoaia E, Pussiaua A et Curcia J-Y. (2017). ADN, une perpétuelle avancée. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 489 :67-76.

Plaza S., Calafell F., Helal A., Bouzerna N., Lefranc G., Bertranpetit J., Comas D. (2003). Joining the pillars of Hercules: mtDNA sequences show multidirectional gene flow in the western Mediterranean. *Annals of Human Geneicst*, 67:312-28.

Pons N. (2018). Évaluation de l'hétérogénéité mitochondriale par séquençage de l'ADN. Mémoire pour l'obtention du Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Paris, France, 95 pages.

Prachář, J. (2016). Ultrastructure of mitochondrial nucleoid and its surroundings. *General Physiology and Biophysics*, 35: 273–286.

Pray L A. (2008). Transposons: The Jumping Genes. *Nature Education* ,1:204

Prieto et al., (2013). GHEP-ISFG proficiency test 2011: Paper challenge on evaluation of mitochondrial DNA results. *Forensic Science International: Genetics*, 7:10–15.

Proserpio V et Lönnberg T. (2016). Single-cell technologies are revolutionizing the approach to rare cells. *Immunology and Cell Biology*, 94(3): 225–229.

R

- Rasola A., Bernardi P. (2011). Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺dependent apoptosis and necrosis .*Cell Calcium*, 222–233.
- Razafindrazaka H. (2010). Le peuplement humain de Madagascar : Anthropologie génétique de trois groupes traditionnels. Thèse de Doctorat en Biotechnologies et Anthropobiologie, Université de Toulouse III, France, 397 pages.
- Rezgoune Mohamed Larbi. Génétique mitochondriale des infertilités masculines. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques Spécialité : *Génétique Moléculaire*, Université des Frères Mentouri, Constantine, Algérie, 221 pages.
- Richard G-F., Kerrest A., et B Dujon. (2008). Comparative Genomics and Molecular Dynamics of DNA Repeats in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 72, No. 4:1092-2172.
- Rishishwar L et Jordan I K. (2017). Implications of human evolution and admixture for mitochondrial replacement therapy. *BMC Genomics*, 18(1):140.
- Rodríguez-Monge A., Montesino M., Prieto L., García E., Alvarez D et Rivas E. (2003). mtDNA control region polymorphism: sequence database and forensic applications *International Congress Series*, 1239: 521–524
- Rothberg J. M., Hinz W., Rearick T. M., Schultz J., Mileski W., Davey M., Bustillo J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475: 348–352.
- Runa D et Walsh S. J. (2006). The Continuing Evolution of Forensic DNA Profiling - From STRS to SNPS, *Australian Journal of Forensic Sciences*, 3859-3874

S

- Sato M et Sato K. (2013). Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(8):1979-84
- Saoudi S. (2016). Origines, évolution et biodiversité de la population Algérienne selon les ethnies: les Chaouis à la wilaya de Khenchela. Thèse de Doctorat Université Badji Mokhtar, Algérie, 247 Pages.
- Sigurgardottir S., Helgason A., Gulcher J.R., Stefansson K. et Donnelly P. (2000). The mutation rate in the human mtDNA control region. *American Journal of Human Genetics*, 66:1599-1609.
- Stevanovitch A., Gilles A., Bouzaid E., Kefi R., Paris F., Gayraud R.P., Spadoni J.L., El-Chenawi F et Beraud-Colomb E. (2004). Mitochondrial DNA sequence diversity in a sedentary population from Egypt. *Annals of Human Genetics*, 68, 23-39.

Sohm B. (2003). Impact de mutations pathologiques dans les ARNt mitochondriaux humains sur les propriétés d'acylation et sur le protéome mitochondrial. Thèse de Doctorat Université Louis Pasteur de Strasbourg, France, 196 pages.

Spelbrink, J.N. (2010). Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 62: 19–32.

Stoneking M. (2000). Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspot. *American Journal of Human Genetics*, 67: 1029-1032.

T

Taanman J.W. (1999). The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1410: 103-123.

Taylor R W et Turnbull D. M. (2005). Mitochondrial DNA Mutations In Human Disease, *Nature Reviews Genetics*, (5):389-402.

Tapper D. P et Clayton D.A. (1981) .Mechanism of Replication of Human Mitochondrial DNA Localization Of The 5' Ends Of Nascent Daughter Strands. *The journal of biological chemistry*, vol. 256, N°10: 5109-5115.

Tezel A., Çetinkaya Ö., Güzeltepe B et Kiliç N . (2016). Genetic identification with heteroplasmic variations in maternally related individuals in forensic cases Gendarmerie Criminal Laboratories, Ankara, Turkey .*Turkish Journal of Biology* , 40: 694-698 .

Theves C., Keyser-Tracqui C., Crubezy E., Salles J-P., Ludes B et Telmon N. (2006). Detection and Quantification of the Age-Related Point Mutation A189G in the Human Mitochondrial DNA. *Journal of Forensic Science*, Vol 51, No 4

Torroni A., Huoponen K., Francalacci P., Petrozzi M., Morelli L., Scozzari R., Obinu D., Savontaus M.L et Wallace D. (1996). Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics*, 144: 1835-1850.

Tully G et al., (2001). Considerations by the European DNA profiling group (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Science international*, 124: 83-91.

Tully G., Barritt SM., Bender K., Brignon E., Capelli C., Dimo-Simonin N et al. (2004). Results of a collaborative study of the EDNAP group regarding mitochondrial DNA heteroplasmy and segregation in hair shafts. *Forensic Science international*, 140(1):1-11.

Tully G et Wetton J.H. (2014). Interpretation of Mitochondrial DNA Evidence. *Wiley Encyclopedia of Forensic Science* <https://doi.org/10.1002/9780470061589.fsa130.pub2>

U

Umetsua K et Yuasab I . (2005). Recent progress in mitochondrial DNA analysis *Legal Medicine*, 7:259–262.

V

Vafai S B et Mootha VK (2012). Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature*, 491(7424):374-83.

Venter J C et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507):1304-51.

Van Oven M et Kayser M. (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human Mutation*, 30: 386–394.

W

Wallace D. C., Brown MD et Lott MT. (1999). Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene*, 238(1):211-30.

Wallace D. C. (2007). Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary. *Annual Review of Biochemistry*, 76: 781–821.

Wallace D.C. et Chalkia D. Mitochondrial DNA Genetics and the Heteroplasmy Conundrum in Evolution and Disease. (2013). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 5:a021220.

Webster K A. (2012). Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species. *Future Cardiology*, 8(6): 863–884

Wilson M.R., Holland M.M., Stoneking M., DiZinno J.A., Budowle B. (1993) Guidelines for the use of mitochondrial DNA sequencing in Forensic Science, *Crime laboratory digest*, 20 (4) 68–77.

Wilson M. R., DiZinno J. A., Polanskey D., Replogle J., Budowle B. (1995 a). Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *International Journal of Legal Medicine* 108:68-74.

Wilson MR, Polanskey D, Butler J, DiZinno JA, Replogle J, Budowle B. (1995 b) .Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts *Biotechniques*, 18(4): 662-9.

Wilson M. R., Allard M. W., Monson K. L., Miller K. W. P et Budowle, B. (2002). Recommendations for consistent treatment of length variants in the human mtDNA control region, *Forensic Science International*, 129/1: 35-42.

Wilson MR. (2003). Draft & Final Technical Report Assessing Deep Sequencing Technology for Human Forensic Mitochondrial DNA Analysis. Primary Investigator Western Carolina University, Cullowhee, NC.

X

Xu F-L., Yao J., Ding M., Shi Z., Wu X., Zhang J et Wang B. (2018). Characterization of mitochondrial DNA polymorphisms in the Han population in Liaoning Province, Northeast China. *Journal Mitochondrial DNA Part A DNA Mapping, Sequencing, and analysis* Volume 29, - Issue 2.

Yacoubi Loueslati B., Ennafaa H., Ben Amor M., Heyer E., Langaney A., Ben Ayed F et Ben Ammar Elgaaied A. (1998). Le polymorphisme de l'ADN mitochondrial révèle une différenciation génétique entre certains groupes ethniques de la population de jerba. *Revue des Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 75(1/2), 3-8.

Yaran Y., Bingbing X et Jiangwei Y. (2014). Application of Next-generation Sequencing Technology in Forensic Science. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 12(5): 190–197.

Z

Zhou Q., Li H., Nakagawa A., Lin J. L., Lee E.S et al., (2016). Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. *Science*, 353(6297): 394-399.

Annexes

■ Equipements et réactifs

Equipements

- ABI Prism 3100AVANT Genetic Analyzers à 4 capillaires
- ABI Prism 7500 fast pour qPCR temps réel
- Autoclave
- Blocs chauffants avec agitateurs
- Centrifugeuses et Microcentrifuges
- Hotte chimique pour la post- PCR
- Hotte chimique pour la préparation des solutions
- Hottes à flux laminaires avec lampe UV pour les extractions
- Micropipettes réglables de 1 à 1000µl
- Portoir magnétique
- Réfrigérateurs à -20°C et -80°C
- Thermal Cycler (Applied Biosystems, Inc. GeneAmp System 9700)

Réactifs

- ABI Prism ® BigDye™ terminator cycle sequencing v3.1 dilution buffer Conservé à 4°C.
- ABI Prism ® BigDye™ terminator cycle sequencing v3.1 ready reaction kit Conservé à -20°C.
- **Amorces:** « Oligonucleotide DNA Primers » conservées à -20°C lyophilisées
- **AmpliTaq Gold® DNA POLYMERASE d'Applied Biosystems** (250 U) à 5U/µL 200 réactions. Conservée à -20°C.
- **BUFFER 10X (GeneAmp 10X PCR Buffer)** d'Applied Biosystems N808-0244) continent : 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, et 0.01% (w/v) Conservé à -20°C.

- **Désoxyribonucleosides Triphosphates (dNTPs) MIX:** GeneAmp dNTP (Applied Biosystems N808-0260) mix à une concentration de 10 mM, avec chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) à 2.5 mM à une concentration. Conservés à -20°C.
- **DTT (Dithiothreitol, $C_4H_{10}O_2S_2$)** de Sigma-Aldrich Conservé à -20°C.
- **Eau MILIQ :** Eau distillée désionisée Sterile
- **EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid Disodium Salt $C_{10}H_{14}N_2O_2NA.2H_2O$, 0.5 M, pH 8.0).**
- **ETHANOL (EtOH) Absolu** (Sigma-Aldrich E7023 -500 mL).
- **FORMAMIDE (HI-DI, pour ABI Prism 3100AVANT Genetic Analyzers)** d'Applied Biosystems.
- **Kit pour extraction d'ADN :** Smart DNA database Ademtech
- **Kits pour le Séquençage d'ADN**
- **Loading buffer :** solution de Bromophénol et de Xylène Cyanol
- **MgCl₂ à 15 Mm**
- **PCI (Phenol / Chloroform / Isoamyl alcohol (25:24:1; v/v))** de Sigma.
- **POP-6** d'Applied Biosystems.
- **Positive Control DNA: 9947A** Cell line control DNA à 0.1ng/ul dilué à 200 pg d'Applied Biosystems.
- **PROTEINASE K (20 mg/mL)** d'AMRESCO, Inc (25 mL), aliquots de 5 µL à -20°C.
- **SDS à 20% et à 2% Sodium Dodecyl Sulfate)** de Sigma-Aldrich
- **SODIUM CHLORIDE (NaCl)** de Sigma-Aldrich S-3014 Molecular Biology Grade.
- **SULFURIC ACID (4 N H_2SO_4)** de Fisher SA 818-500.

■ Matériel et consommables

- **Capillaires pour ABI Prism 3100 AVANT Genetic Analyzers** d'Applied Biosystems 50 cm et 36 cm.
- **Colonnes CENTRI-SEP SPIN.**
- **EXO SAP-IT** d'United States Biochemical.
- **MICROAMP RETAINER** d'Applied Biosystems .
- **MICROCON 100** Filters Amicon/Millipore. Extra collection tubes (100 pk) Amicon/Millipore.

- Plaques pour PCR 96 well soreson.
- Plaques pour post- PCR 96 well d'Applied biosystems.
- Plate base 96 well d'Applied Biosystems.
- Plate Septa (96 well) pour 3100 AVANT Genetic Analyzer d'Applied Biosystems.
- Reaction Tubes (Eppendorf) de Fisher.

Régions Hypervariables HV1 et HV2 de la rCRS : Human Mitochondrial DNA Revised Cambridge Reference Sequence

Région Hypervariable 1 (HV1)

16024- TTCTTTCATG GGG AAGCAGA TTTGGGTACC ACCCAAGTAT
16064- TGA CTCACCC ATCAACAACC GCTATGTATT TCGTACATTA
16104- CTGCCAGCCA CCATGAATAT TGTACGGTAC CATAAATACT
16144- TGACCACCTG TAGTACATAA AAACCCAATC CACATCAAAA
16184- CCCCCTCCCC ATGCTTACAA GCAAGTACAG CAATCAACCC
16224- TCAACTATCA CACATCAACT GCAACTCCAA AGCCACCCCT
16264- CACCCACTAG GATACCAACA AACCTACCCA CCCTTAACAG
16304- TACATAGTAC ATAAAGCCAT TTACCGTACA TAGCACATTA
16344- CAGTCAAATC CCTTCTCGTCCC -**16365 (Fin)**

Région Hypervariable 2 (HV2)

73- ATGCACGCGA TAGCATTGCG AGACGCTGGA GCCGGAGCAC
113- CCTATGTCGC AGTATCTGTC TTTGATTCCT GCCTCATCCT
153- ATTATTTATC GCACCTACGT TCAATATTAC AGGCGAACAT
193- ACTTACTAAA GTGTGTTAAT TAATTAATGC TTGTAGGACA
233- TAATAATAAC AATTGAATGT CTGCACAGCC ACTTTCCACA
273- CAGACATCAT AACAAAAAAT TTCCACCAA CCCCCCTCC
313- CCCGCTTCTG GCCACAGCAC TTAAACAC - **340 (Fin)**

Table des 37 gènes de l'ADN mitochondrial humain et de leur localisation dans la séquence de référence de Cambridge

Gène		Produit	Positions dans le mitogénome	Brin
<u>MT-ATP8</u>	Code une protéine	ATP synthase , Fo sous-unité 8 (complexe V)	08 366 - 08 572 (chevauchement avec MT-ATP6)	H
<u>MT-ATP6</u>	Code une protéine	ATP synthase , Fo sous-unité 6 (complexe V)	08 527 - 09 207 (chevauchement avec MT-ATP8)	H
<u>MT-CO1</u>	Code une protéine	Cytochrome c oxydase , sous-unité 1 (complexe IV)	05 904 - 07 445	H
<u>MT-CO2</u>	Code une protéine	Cytochrome c oxydase , sous-unité 2 (complexe IV)	07 586 - 08 269	H
<u>MT-CO3</u>	Code une protéine	Cytochrome c oxydase , sous-unité 3 (complexe IV)	09 207 - 09 990	H
<u>MT-CYB</u>	Code une protéine	Cytochrome b (complexe III)	14 747 - 15 887	H
<u>MT-ND1</u>	Code une protéine	NADH déshydrogénase , sous-unité 1 (complexe I)	03 307 - 04 262	H
<u>MT-ND2</u>	Code une protéine	NADH déshydrogénase , sous-unité 2 (complexe I)	04 470 - 05 511	H
<u>MT-ND3</u>	Code une protéine	NADH déshydrogénase , sous-unité 3 (complexe I)	10 059 - 10 404	H
<u>MT-ND4L</u>	Code une protéine	NADH déshydrogénase , sous-unité 4L (complexe I)	10 470 - 10 766	H
<u>MT-ND4</u>	Code une protéine	NADH déshydrogénase , sous-unité 4 (complexe I)	10 760 - 12 137 (chevauchement avec MT-ND4L)	H
<u>MT-ND5</u>	Code une protéine	NADH déshydrogénase , sous-unité 5 (complexe I)	12 337 - 14 148	H
<u>MT-ND6</u>	Code une protéine	NADH déshydrogénase , sous-unité 6 (complexe I)	14 149 - 14 673	L
<u>MT-TA</u>	ARN de transfert	ARNt- Alanine (Ala ou A)	05 587 - 05 655	L
<u>MT-TR</u>	ARN de transfert	ARNt- Arginine (Arg ou R)	10 405 - 10 469	H
<u>MT-TN</u>	ARN de transfert	ARNt- Asparagine (Asn ou N)	05 657 - 05 729	L
<u>MT-TD</u>	ARN de transfert	ARNt- Acide aspartique (Asp ou D)	07 518 - 07 585	H
<u>MT-TC</u>	ARN de transfert	ARNt- Cystéine (Cys ou C)	05 761 - 05 826	L
<u>MT-TE</u>	ARN de transfert	ARNt- Acide glutamique (Glu ou E)	14 674 - 14 742	L
<u>MT-TQ</u>	ARN de transfert	ARNt- Glutamine (Gln ou Q)	04 329 - 04 400	L
<u>MT-TG</u>	ARN de transfert	ARNt- Glycine (Gly ou G)	09 991 - 10 058	H
<u>MT-TH</u>	ARN de transfert	ARNt- Histidine (His ou H)	12 138 - 12 206	H
<u>MT-TI</u>	ARN de transfert	ARNt- Isoleucine (Ile ou I)	04 263 - 04 331	H
<u>MT-TL1</u>	ARN de transfert	ARNt- Leucine (Leu-UUR ou L)	03 230 - 03 304	H
<u>MT-TL2</u>	ARN de transfert	ARNt- Leucine (Leu-CUN ou L)	12 266 - 12 336	H
<u>MT-TK</u>	ARN de	ARNt- Lysine (Lys ou K)	08 295 - 08 364	H

	transfert			
<u>MT-TM</u>	ARN de transfert	ARNt- Méthionine (Met ou M)	04 402 - 04 469	H
<u>MT-TF</u>	ARN de transfert	ARNt- Phénylalanine (Phe ou F)	00 577 - 00 647	H
<u>MT-TP</u>	ARN de transfert	ARNt- Proline (Pro ou P)	15 956 - 16 023	L
<u>MT-TS1</u>	ARN de transfert	ARNt- Sérine (Ser-UCN ou S)	07 446 - 07 514	L
<u>MT-TS2</u>	ARN de transfert	ARNt- Sérine (Ser-AGY ou S)	12 207 - 12 265	H
<u>MT-TT</u>	ARN de transfert	ARNt- Thréonine (Thr ou T)	15 888 - 15 953	H
<u>MT-TW</u>	ARN de transfert	ARNt- Tryptophane (Trp ou W)	05 512 - 05 579	H
<u>MT-TY</u>	ARN de transfert	ARNt- Tyrosine (Tyr ou Y)	05 826 - 05 891	L
<u>MT-TV</u>	ARN de transfert	ARNt- Valine (Val ou V)	01 602 - 01 670	H
<u>MT-RNR1</u>	ARN ribosomique	Petite sous-unité : SSU (12S)	00 648 - 01 601	H
<u>MT-RNR2</u>	ARN ribosomique	Grande sous-unité : LSU (16S)	01 671 - 03 229	H