

ADN AMPLIFIABLE ET PROTÉINES DANS LES SPÉCIMENS ARCHÉOLOGIQUES

Mouhsine El Mansouri et Eliane Béraud-Colomb

INTRODUCTION

Nous avons montré qu'il est possible d'extraire, d'amplifier et de séquencer des fragments d'ADN provenant d'ossements humains anciens (Béraud-Colomb *et al.* 1995; 1997). Parmi les spécimens étudiés, deux individus proviennent du site archéologique de Taforalt au Maroc. Les datations au ^{14}C montrent que ces individus appartiennent à la population de Cromagnoides ayant occupé le site il y a 12000 ans. En conduisant une étude coordonnée des mêmes marqueurs génétiques, dans cette population préhistorique et quelques populations modernes, nous pourrions préciser certaines chronologies dans les processus de migrations qui ont généré les populations modernes du pourtour méditerranéen.

Le séquençage de l'ADN mitochondrial et l'analyse de ses variations fournissent un grand nombre d'informations sur les différentes migrations des populations humaines (Stoneking 1993; Vigilant *et al.* 1991). Pour un individu de Taforalt, il a été amplifié et séquéncé un fragment de D-Loop dans l'ADN mitochondrial. Cette séquence s'est révélée être particulièrement polymorphe. Le séquençage de cette région d'ADN doit être complété et élargi à d'autres régions. D'autres individus de Taforalt devront être étudiés.

L'étude de l'ADN ancien est longue et contraignante, tandis que l'analyse des protéines est rapide. De plus l'étude des protéines est facilitée par le fait que le collagène¹ représente 90% des protéines contenues dans le tissu osseux (Triffit 1980). Si les conservations des protéines et de l'ADN anciens suivaient une évolution parallèle, nous aurions le moyen de sélectionner les échantillons susceptibles de contenir de l'ADN.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons dans un premier temps analysé les protéines des échantillons précédemment étudiés pour leur contenu en ADN.

MÉTHODES

Extraction et caractérisation des acides aminés

La poudre d'ossement, dissoute dans une solution de HCl 6N, est mise à hydrolyser pendant 24 heures à 115°C dans des tubes de verre scellés. Après évaporation de HCl, le culot est repris par une solution 4N de HF (précipitation des ions calcium); ensuite l'hydrolysat est

¹ avec une composition en acides aminés où 3 d'entre eux (Gly, Pro, Ala) constituent 50% du total.

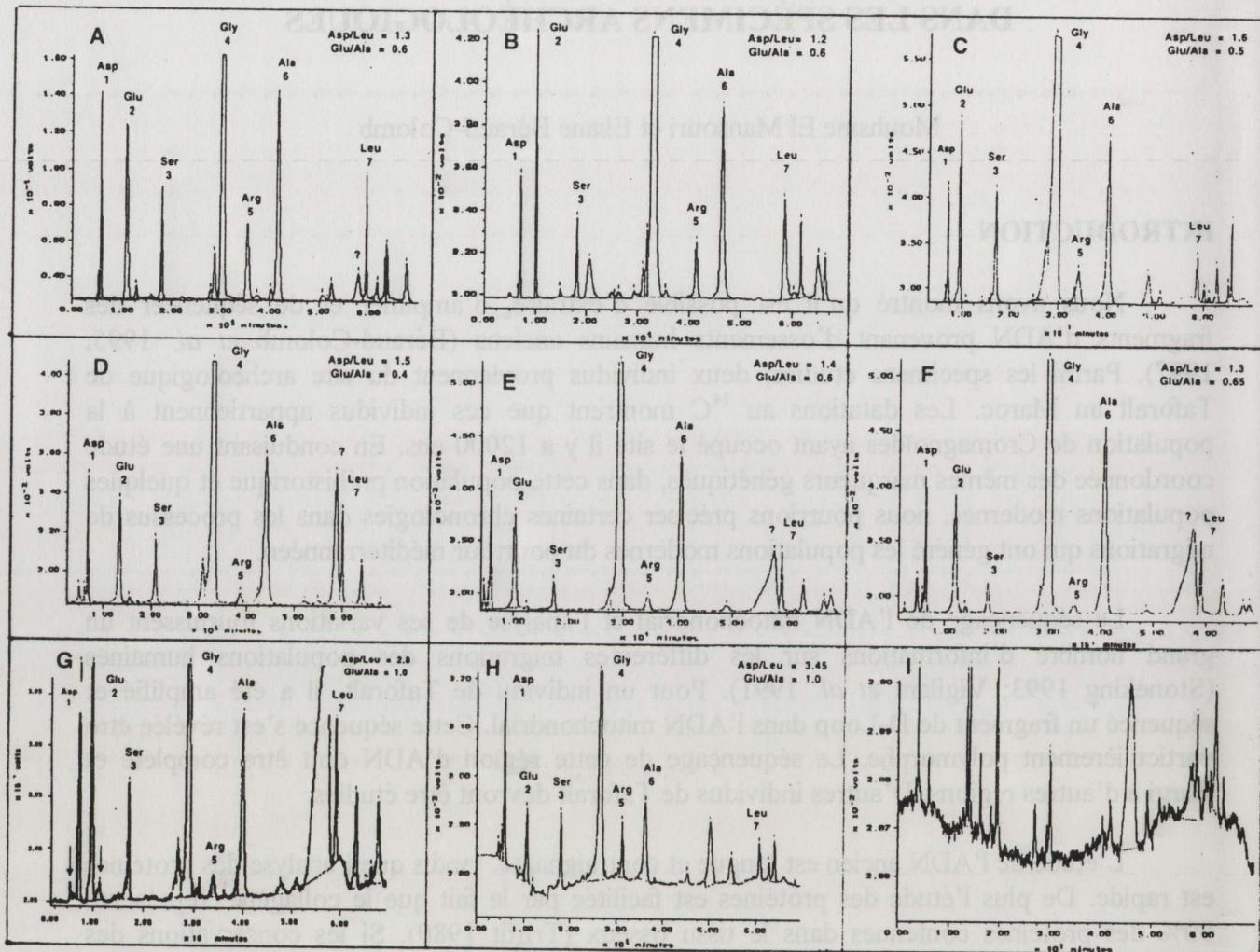


Fig. 1. Chromatogrammes des acides aminés contenus dans un ossement actuel (A), Mat (B), Tiy (C), Vol 2j (D), Camp (E), Gei (F), Taf1 (G), Taf2 (H) and Mal (I).

Les flèches indiquent les pics de D-Asp et D-Glu clairement visibles sur le diagramme (C). 15 acides aminés ont été isolés et les 7 principaux, représentant 60% de la totalité du matériel protéique, ont été identifiés suivant: Asp (1), Glu (2), Ser (3), Gly (4), Arg (5), Ala (6), pic non identifié (?) and Ile (7).

A partir de ces chromatogrammes, la quantité de protéines contenu dans l'échantillon a été calculée (somme des aires des pics d'acides aminés), exprimée en unité arbitraires (a.u/g, Table II).

traité par chromatographie sur résine Dowex afin d'isoler les acides aminés, avant leur analyse par chromatographie liquide à haute pression (HPLC).

La colonne analytique est constituée par une phase "Resolve" C18, 5mm (Waters). La phase mobile correspond à un gradient de concentration méthanol (A), tampon acétate, phosphate de sodium 25 mM pH:7,0 (B). La détection des acides aminés se fait par mesure de la fluorescence émise par le marqueur OPA NAC lié aux acides aminés extemporanément.

Extraction et analyse de l'ADN

Toutes les manipulations se font avec des gants.

La surface des ossements est raclée soigneusement à l'aide d'une lame de bistouri neuve.

L'ossement nettoyé, placé entre deux feuilles de papier aluminium, est scié. A partir de la sciure d'ossement se font la dissolution et l'extraction des composés organiques.

Certaines séries d'extraction sont faites à partir de poudre obtenue par raclage de la partie interne de l'ossement, à l'aide d'une lame de bistouri neuve.

Toutes les solutions: tampon d'extraction, eau distillée sont filtrées extemporanément sur centricon 30.

Pour chaque lot d'extraction, un témoin simulacre complet d'extraction est effectué.

Chaque série de PCR est effectuée à partir d'un prémélange comprenant tous les constituants sauf l'ADN extrait, le blanc de PCR est distribué en dernier.

Les témoins négatifs (extraction et PCR) ainsi que la spécificité de la bande de taille attendue sont contrôlés par southern à l'aide d'un oligo dont la séquence nucléotidique correspond à une partie interne de la séquence du fragment amplifié.

Chaque fois que cela est possible, nous déterminons le sexe de l'individu par l'analyse de l'ADN afin de confirmer l'analyse ostéologique.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'ensemble des profils chromatographiques obtenus est reporté sur la Figure 1. Pour les spécimens *Mat* et *Vol 2j* (B,C) nous obtenons un profil HPLC très similaire à celui de l'os moderne (A, notre référence), comme l'indiquent les rapports Asp/Ile et Glu/Ala, donnés sur les diagrammes. Pour les spécimens *Cam*, *Taf1* et *Taf2* (C,D,E), les profils sont également similaires à la référence, avec toutefois la présence d'un pic supplémentaire qui traîne et que nous pensons être une contamination. Pour les spécimens *Tiy*, *Mal* et *Gei* (G,H,I), les profils

sont très différents de celui de la référence, les rapports Asp/Ile et Glu/Ala sont différents et pour *Mal* les pics n'ont pas été identifiaables.

Nous avons sélectionné trois chromatogrammes, un dans chacun des trois groupes, représentatifs de l'ensemble des diagrammes. Nous avons déterminé la composition totale des acides aminés, sur analyseur Beckman, pour les spécimens correspondants: *Mat*, *Taf1*, *Tiy* (Tableau I). *Taf1* et *Mat* ont une composition en acides aminés très proche de celle de l'os moderne. Pour *Tiy*, les valeurs de Pro et Ala sont très faibles; de plus l'échantillon contient 26% de Cys, un acide aminé en traces indosables dans les autres échantillons. Ces résultats nous permettent de voir que les profils HPLC à eux seuls sont suffisants pour estimer le degré de conservation ou de dégradation des protéines contenues dans l'ossement ancien. Les conditions de gradient d'élution que nous avons mises au point nous permettent de séparer les formes D et L des acides Asp et Glu. Nous avons étudié le taux de racémisation de ces deux acides aminés seulement pour savoir s'il s'agissait réellement de protéines anciennes. Même si l'interprétation des résultats des mesures de racémisation est toujours difficile, une certitude subsiste, la présence de formes D indique avant tout l'ancienneté des protéines. Le Tableau II regroupe pour les huit spécimens, étudiés pour leur contenu en ADN amplifiable, la quantité totale des acides aminés extraits, la taille maximale du fragment d'ADN amplifiable, les taux de racémisation des acides aspartique et glutamique. On peut voir que la quantité totale d'acides aminés² varie considérablement d'un échantillon à l'autre. Cependant, il semble exister un valeur seuil (46 a.u/g) en-deçà de laquelle il n'est pas possible de retrouver de l'ADN amplifiable. A l'exception de *Mal*, les échantillons pour lesquels nous avons pu amplifier des fragments d'ADN ont les taux de protéines les plus élevés. Ces protéines sont identifiaables à des protéines de l'os (profil HPLC); elles sont anciennes (taux de racémisation). Ces résultats non seulement valident les résultats déjà publiés, montrant qu'il est possible d'étudier l'ADN contenu dans des ossements humains anciens, mais aussi démontrent qu'il s'agit d'un bon moyen pour la présélection des échantillons.

Bibliographie

- Béraud-Colomb, E., Roubin, R., Martin, J., Maroc, N., Gardeisen, A., Trabuchet, G. and Goossens, M., 1995,
Human b-globin gene polymorphisms characterized in DNA extracted from ancient bones 12,000 years old. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 1267-1274.
- Béraud-Colomb, E., Roubin, R., Martin, J., Maroc, N., Gardeisen, A., Trabuchet, G. and Goossens, M., 1997,
Letter to the Editor. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 1002.
- Stoneking, M., 1993,
DNA and recent human evolution. *Evolutionary Anthropology* 2, 60-73.

² exprimée en unités arbitraires, somme des aires des pics de HPLC.

Triffit, J.T., 1980,

Fundamental and Clinical Bone Physiology. M.R. Urist Ed., J.B. Lippincott and Co. 45-82.

Vigilant, L., Stoneking, M., Harpending, H., Hawkes, K., Wilson, A.C., 1991, African population and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 253, 1503-1507.

Age	Sex	Sample	TaqI		TaqII		TaqI + II		TaqI + III		TaqII + III		TaqI + II + III	
			1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
10	Male	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
10	Male	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
10	Female	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
10	Female	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
20	Male	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
20	Male	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
20	Female	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
20	Female	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
30	Male	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
30	Male	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
30	Female	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
30	Female	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
40	Male	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
40	Male	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
40	Female	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
40	Female	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
50	Male	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
50	Male	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
50	Female	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
50	Female	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
60	Male	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
60	Male	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
60	Female	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
60	Female	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
70	Male	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
70	Male	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
70	Female	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
70	Female	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
80	Male	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
80	Male	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
80	Female	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
80	Female	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
90	Male	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
90	Male	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
90	Female	Medieval	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48
90	Female	Modern	0.52	0.50	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48	0.50	0.48

Table II. Résumé de l'ensemble des résultats obtenus pour les échantillons de l'âge maximum, la quantité maximale du produit de PCR obtenue (1), taux de racémisation de l'acide aspartique en fonction de la méthode chimique, et le quantité de protéines conservées dans l'essentiel ancien ne dépend pas de l'âge de l'individu.

Malgré la plus importante dégradation de l'ADN dans les échantillons de l'âge maximum (TaqI et TaqII), on observe de quantités de protéines intermédiaires et plus tard, les quantités sont peu élevées après amplification de l'ADN. Le taux de racémisation D/L, esp pour TaqI, (0.025) est également élevé, ce qui indique une dégradation plus importante des protéines que l'ADN, et malgré la conservation de l'acide aspartique dans l'essentiel ancien à une valeur élevée à 0.04, correspondante à la racémisation indiquée par l'acide aspartique dans l'essentiel ancien.

Les trois échantillons Gé, sont de l'âge moyen et peuvent être utilisés pour l'obtention d'un produit d'amplification PCR, ont des valeurs de quantité de protéines très faibles, mais la racémisation D/L est élevée, malgré probablement une dégradation importante des protéines. Bien que l'échantillon Gé pour lequel nous avons obtenu un produit de PCR de 302, soit dans la limite de la détection, il est toutefois possible d'obtenir un résultat.

Tableau I. Comparaison des résultats obtenus pour l'âge maximum des échantillons conservés au moyen de la méthode chimique et celle utilisant la combinaison des deux méthodes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'acide aspartique dans l'essentiel ancien (0.04) pour l'âge maximum. Les échantillons conservés au moyen de la méthode chimique sont ceux qui ont obtenu un résultat dans la limite de détection (0.02).