



RYM KÉFI, ALAIN STEVANOVITCH, ERIC BOUZAID, ELIANE BÉRAUD-COLOMB

DIVERSITÉ MITOCHONDRIALE DE LA POPULATION DE TAFORALT (12.000 ANS BP – MAROC): UNE APPROCHE GÉNÉTIQUE À L'ÉTUDE DU PEUPEMENT DE L'AFRIQUE DU NORD

RÉSUMÉ: Les études anthropologiques et génétiques ont révélé la complexité du peuplement de l'Afrique du Nord. Dans le but de contribuer à une meilleure connaissance de la mise en place des populations dans cette région méditerranéenne, nous nous sommes proposés d'étudier la diversité mitochondriale de la population ibéromaurusienne de Taforalt (12.000 ans – Maroc). L'ADN ancien a été extrait d'une trentaine de spécimens exhumés de la grotte épipaléolithique de Taforalt. Nous avons amplifié et séquencé le fragment HVSI de la région de contrôle de l'ADN mitochondrial. La diversité génétique de la population de Taforalt montre que ce ne sont pas des individus apparentés aux individus subsahariens. L'hypothèse d'une origine sub-soudanaise des hommes ibéromaurusiens est rejetée. Nos résultats vont dans le sens d'une origine locale de la population de Taforalt et d'une continuité génétique en Afrique du Nord.

MOTS CLÉS: ADN ancien – ADN mitochondrial – Ibéromaurusien – Epipaléolithique – Taforalt – Afrique du Nord

MITOCHONDRIAL DNA DIVERSITY OF TAFORALT POPULATION (12,000 YEARS BP, MOROCCO): A GENETIC STUDY OF THE SETTLEMENT OF NORTH AFRICA

ABSTRACT: The population exhumed from the archaeological site of Taforalt in Morocco (12,000 years BP) is a valuable source of information toward a better knowledge of the settlement of Northern Africa region and provides a revolutionary way to specify the origin of Ibero-Maurusian populations. Ancient DNA was extracted from 31 bone remains from Taforalt. The HVSI fragment of the mitochondrial DNA control region was PCR-amplified and directly sequenced. Mitochondrial diversity in Taforalt shows the absence of sub-Saharan haplogroups suggesting that Ibero-Maurusian individuals had not originated in sub-Saharan region. Our results reveal a probable local evolution of Taforalt population and a genetic continuity in North Africa.

KEY WORDS: Ancient DNA – Mitochondrial DNA polymorphism – Ibero-Maurusian – Epipaleolithic – Taforalt – North Africa.

INTRODUCTION

La connaissance du peuplement du Nord de l'Afrique se construit suivant deux approches: l'une à travers l'étude des

spécimens archéologiques et de leur environnement, l'autre à travers l'étude de la diversité moléculaire des différents marqueurs génétiques portés par les individus composant les populations actuelles. Les marqueurs étudiés sont

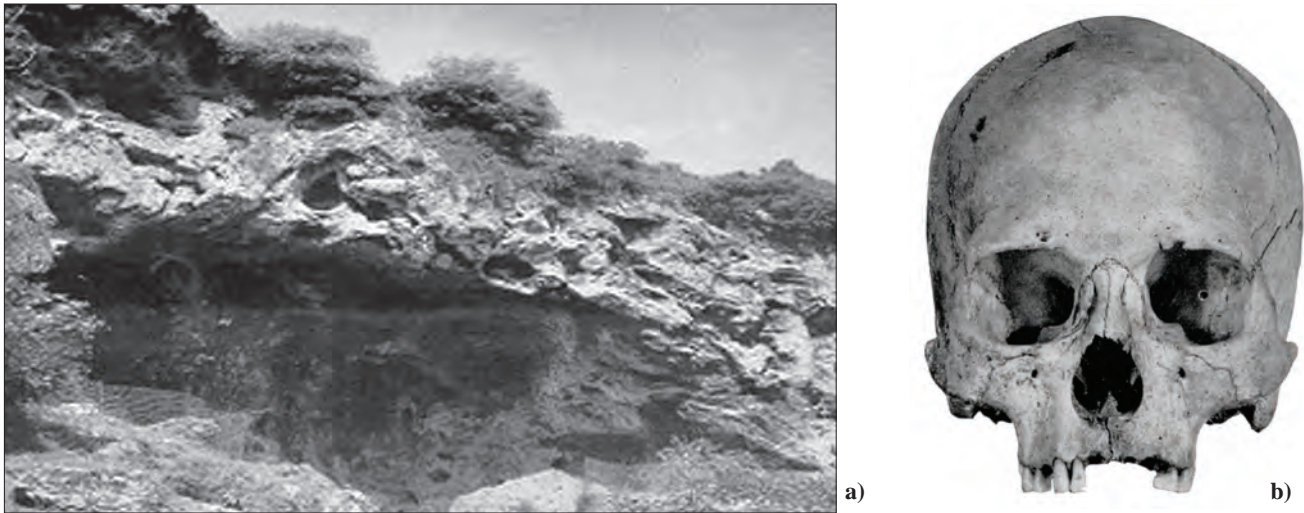


FIGURE 1. 1a: Vue générale de la grotte de Taforalt. 1b: Crâne du spécimen Taf VIII.

l'ADN mitochondrial, le chromosome Y, le système HLA, l'hémoglobine et certains microsatellites, pour ne citer que les principaux.

La plus ancienne présence humaine en Afrique du Nord date de 700.000 ans BP et correspond aux restes osseux de *l'Atlanthropus maurétanicus*. Cet *Homo erectus* fût découvert à Ternifine en Algérie (Arambourg 1963).

Les spécimens des sites de Sidi Abderrahman (200.000 ans BP), Djebel Irhoud (100.000 ans BP), Ain Hanech, Salé, Rabat (160.000 ans BP) et Dar Es-Soltan (-70.000 ans BP, similaires aux *Homo sapiens sapiens* morphologiquement modernes) au Maroc (Camps 1974) pourraient témoigner de la transition de l'*Homo erectus* vers les *Homo sapiens sapiens*.

L'industrie lithique associée aux *Homo erectus* nord africains était celle du Paléolithique Moyen (industries moustériennes et levalloisiennes). Avec l'apparition des *Homo sapiens*, une industrie originale s'était développée: l'Atérien, spécifique de l'Afrique du Nord Ouest (Maroc, Algérie et Tunisie) (Camps 1974, Debenath *et al.* 1986).

Mis en évidence sur les sites de Dar Es-Soltan et de Taforalt (fragments de crâne dans une couche inférieure du site de Taforalt) (Ferembach 1962), l'Homme Atérien présente des caractères morphologiquement modernes mais conserve également des caractères plus archaïques que ceux des hommes de Crô-Magnon. Il présente aussi suffisamment d'homologie avec l'homme moustérien du Djebel Irhoud, pour qu'on puisse considérer une filiation entre eux (Camps 1989). Enfin cet Homme Atérien pourrait être l'ancêtre de l'Homme de Mechta El-Arbi (son successeur géographique vers 20.000 ans BP). Cependant la question reste ouverte.

Diverses origines sont évoquées pour expliquer l'apparition de l'Homme de Mechta El-Arbi, auteur de l'industrie ibéromaurusienne, au Maghreb. Il pourrait être venu soit de l'Europe via l'Espagne, bien qu'aucun jalon n'ait été retrouvé entre la France méridionale et le

détroit de Gibraltar (Camps 1989). Il pourrait aussi être issu de Palestine (Proche-Orient) et provenir d'un foyer commun d'où se seraient développées deux branches: l'une vers l'Europe donnant l'Homme de Crô-Magnon, et l'autre vers le Maghreb, donnant l'Homme de Mechta El-Arbi. Cette dernière théorie, fondée sur des comparaisons morphologiques entre les populations cromagnoïdes et les hommes de Mechta El-Arbi, est défendue par plusieurs auteurs (Vallois, Movius 1952, Balout 1954). La présence des Proto-Crô-Magnons (*Homo sapiens sapiens*) au Proche Orient (sites de Skhul et Qafzeh, datés de 100.000 et 92.000 ans BP) renforce cette hypothèse.

D'autres auteurs suggèrent une origine de l'homme de Mechta El-Arbi en Nubie. En effet, de nombreuses similarités ont été relevées entre les Nubiens de la fin du Pléistocène et les hommes de Mechta El-Arbi. L'industrie microlithique nubienne: Qadan (15.000-11.000 ans BP) est similaire à l'industrie ibéromaurusienne du Maghreb. On peut observer des pratiques funéraires voisines, notamment pour le site de Jebel Sahaba en Basse Nubie (Wendorf 1968). De plus, de nombreux squelettes ibéromaurusiens, tels que ceux de Dar Es-Soltan et Taforalt au Maroc ou Ali-Bacha et Afalou en Algérie, présentent des ressemblances avec les individus de 12.000 ans de Wadi Halfa et Jebel Sahaba de Nubie (Wendorf 1968). Des similitudes sont également observées avec les individus de Nazlet Khater et ceux de Wadi Kubhaniya en Egypte, datant de 25.000 ans BP (Wendorf 1968).

Concernant l'approche génétique du peuplement du Nord de l'Afrique, l'étude des variants de l'ADN mitochondrial des populations actuelles a mis en évidence la présence d'un substrat paléolithique attesté par l'haplogroupe U6. Spécifique des populations nord africaines: l'haplogroupe U6 est daté de 47.000±18.000 ans (Rando *et al.* 1998, Plaza *et al.* 2003).

La structure génétique des populations de l'Afrique du Nord est une mosaïque due à la présence, à côté de

U6, des haplogroupes eurasiatiques (tels que H, U, K, J et T) et des haplogroupes sub-sahariens (L1, L2 et L3A) (Rando *et al.* 1998, Brakez *et al.* 2001, Plaza *et al.* 2003, Fadhlaoui-Zid *et al.* 2004). L'importance de la contribution des apports sub-sahariens dans la composition génétique des populations nord africaines suit un gradient Sud-Nord (Krings *et al.* 1999, Brakez *et al.* 2001). Les populations tunisiennes, algériennes, et marocaines aussi bien berbères que non berbères comportent une majorité d'individus porteurs d'haplogroupes européens (de 56,4% à 88,4%). Les mauritaniens et les Sahraouis comportent à peu près autant d'individus appartenant à des haplogroupes européens que sub-sahariens africains (respectivement 48% et 36,7% d'haplogroupes européens pour 44% et 43,3% d'haplogroupes africains), tandis que les populations touaregs, bien que parlant une langue berbère, sont majoritairement composées d'haplogroupes africains (86,4%). La diminution de la fréquence des haplogroupes sub-sahariens du Sud vers le Nord est également observée chez les populations de la vallée du Nil (Krings *et al.* 1999).

Ce profil est compatible avec des populations nord africaines partageant une origine avec les populations du Proche Orient et de l'Europe (Brakez *et al.* 2001, Plaza *et al.* 2003) ayant par la suite incorporé des séquences sub-sahariennes, par un afflux de gènes trans-sahariens (Brakez *et al.* 2001). Cet apport sub-saharien est probablement récent, voir actuel (Rando *et al.* 1998, Brakez *et al.* 2001).

Nous présentons dans cet article les résultats que nous avons obtenu au cours de l'étude génétique d'une trentaine de spécimens de la population ibéromaurusienne de Taforalt (12.000 ans) (Ferembach 1962). La détermination de la diversité génétique de la population de Taforalt permettra de mieux connaître la composition ancestrale des populations de l'Afrique du Nord et de préciser la chronologie des

migrations. Cette étude génétique contribuera également à éclaircir le schéma des origines des hommes de Mechta El-Arbi qui est un sujet à controverses.

LE SITE ARCHÉOLOGIQUE DE TAFORALT

Le site archéologique de Taforalt est situé dans le massif montagneux de béni-Snassen, à 1 km du village de Taforalt et à 55 km au Nord-Ouest d'Oujda au Maroc. Il s'agit d'une grotte de 30 m d'ouverture et de 28 m de profondeur d'avant en arrière (Roche 1953) (*Figure 1a*).

La grotte de Taforalt a été fouillée de 1951 à 1955 par l'abbé Roche. L'étude stratigraphique de la grotte a mis en évidence 10 niveaux ibéromaurusiens (Epipaléolithique) surmontant un niveau atérien (Roche 1953).

MATÉRIEL

La population ancienne de Taforalt

L'étude anthropologique du site (Ferembach 1962) a mis en évidence l'existence de restes osseux de 86 adultes et de 98 enfants, en bon état de conservation, répartis dans les 40 sépultures de la grotte.

Les sépultures, datées de 12.000 ans, étaient découvertes dans les dix niveaux épipaléolithiques.

Les hommes de Taforalt étaient de type Mechta El-Arbi (*Figure 1b*) et de culture ibéromaurusienne.

Spécimens étudiés

Le *Tableau 1* regroupe les 31 spécimens (fragments des os long, fémur, péroné) prélevés dans la collection de Taforalt, conservée à l'Institut de Paléontologie Humaine à Paris.

Le chiffre romain indique le numéro de la sépulture. La nomenclature des os des spécimens de Taforalt est une vraie énigme. Les chiffres arabes, suivants le numéro de la sépulture (Taf V-5, Taf V-7, Taf V-18...) correspondaient-ils à des individus différents appartenant à la même sépulture? ou s'agit-il des numéros des différents os appartenant à un même individu? C'est un vrai problème, du fait que chaque sépulture renferme au moins deux individus (sépulture I renfermait 9 personnes, 8 personnes ont été exhumées de la sépulture V...).

MÉTHODES

L'étude de la diversité mitochondriale des populations anciennes se fait en deux grandes étapes. Une première étape utilisant des méthodes de biologie moléculaire permet l'obtention d'une séquence d'ADN mitochondrial. La deuxième étape utilise des méthodes de bio-informatique dans le but d'analyser et d'exploiter les informations portées par les séquences d'ADN.

Cependant, l'ADN ancien (ADNa) conservé dans les restes osseux des spécimens archéologiques, présente

TABLEAU 1. Les 31 spécimens étudiés de la population de Taforalt. Le chiffre romain indique le numéro de la sépulture, le chiffre arabe indique le numéro du squelette ou de l'os.

Spécimens		
Taf I	Taf VI-9	Taf XVII-2
Taf I-21	Taf VI-9E	Taf XVII-3
Taf 55-I	Taf VI-10	Taf XVII
Taf 55-I-B		Taf XVII-18
	Taf VIII	
Taf II	TAFVIII-18	Taf XIX
		Taf XIX-a
Taf V-5	Taf XV0	Taf XIX-7
Taf V-7	Taf XVa	
Taf V-18		Taf XXI
Taf V-20	Taf XVI-A2	Taf XXI-6
Taf V-26		
Taf V-27		Taf XXIV
		Taf XXV
		Taf XXV-3

des caractéristiques spécifiques. Son étude nécessite des conditions et des approches particulières, différentes de celles utilisées lors de l'étude de l'ADN extrait des spécimens actuels.

Précautions de laboratoire. L'extraction de l'ADN est faite dans une salle isolée (salle blanche), située dans un laboratoire dans lequel aucune manipulation biologique n'est effectuée. L'accès à cette salle est réservé exclusivement aux expérimentateurs d'ADN ancien. L'expérimentateur doit porter une blouse, des gants, une charlotte et un masque dans toutes les étapes de manipulations. Cet habillement est stérile et changé à chaque fois qu'un nouveau spécimen osseux est traité.

Avant le traitement d'un spécimen, le plan de travail est nettoyé à l'eau de javel, à l'éthanol 70° et au DNA away (une solution détruisant les molécules d'ADN, commercialisée par Molecular Bio Product, Inc.).

Les solutions utilisées lors de l'extraction sont stockées dans une deuxième salle isolée des autres pièces par un système de sas (sas d'entrée des produits livrés, sas de sortie des aliquotes à utiliser). Avant d'être aliquotées, les solutions d'extractions sont testées par PCR afin de s'assurer de l'absence de contamination.

Précaution de laboratoire pour la PCR. Le mélange de PCR (mix) est préparé sous une hôte réservée à cette utilisation, nettoyée avant chaque manipulation à l'eau de javel, au DNA away et exposée aux rayons ultra violets (UV). Le matériel utilisé (micro-pipette, portoir etc...) est réservé à la préparation du mix. Le port de blouse et de gants stériles est indispensable.

Le secteur de manipulation pré-PCR (préparation du mix) est bien isolé (premier étage du bâtiment) du secteur (sous sol du bâtiment) où sont effectuées les manipulations post-PCR: visualisation de bande d'ADN, purification de produits de PCR...

Préparation des spécimens osseux. Deux techniques de préparation de l'os ont été utilisées: le nettoyage au scalpel (Béraud-Colomb *et al.* 1995) et le nettoyage à l'éthanol (Kéfi *et al.* 2003).

Dissolution de la poudre d'os. La poudre d'os (0,5 g) est solubilisée dans un tampon 10 mM Tris-Hcl (pH 8,5), 0,5 M EDTA et 0,1% SDS, contenant de la Protéinase K (0,5 mg/ml) et du DiThioTheitol (DTT, 10 mg/ml).

Le mélange est incubé dans une étuve à 42°C sous rotation lente.

Après 48 heures d'incubation, la solution est centrifugée pendant 10 mn à 3000 rotations par minute (rpm). Le surnageant (appelé SN1) est récupéré et stocké à +4°C.

Le culot de centrifugation est remis en incubation pendant 48 heures à 42°C dans le même tampon. Après centrifugation, le surnageant appelé SN2 est récupéré.

Si la poudre d'os n'est pas totalement dissoute, la même opération est répétée.

Généralement, l'opération s'arrête au SN3 résultant d'une troisième incubation de la poudre d'os dans la solution de dissolution.

Les surnageants SN1, SN2 et SN3 ne sont pas réunis,

l'extraction de l'ADN est réalisée indépendamment sur chaque surnageant.

Les surnageants SN1, SN2 et SN3 sont traités de la même manière.

Extraction et purification de l'ADNa. Le surnageant (SN), résultant de la dissolution de la poudre d'os, est dilué au demi avec de l'eau purifiée stérile, puis on ajoute un volume égal de phénol, après agitation, on centrifuge le mélange pendant 30 mn à 3000 rpm.

La phase supérieure aqueuse, contenant l'ADN, est prélevée, puis mélangée à une solution composée de 50% de phénol et 50% de Chlorodiméthane-Alcool isoamylique (1 volume d'alcool isoamylique pour 24 volumes de chlorodiméthane). Après agitation, on centrifuge pendant 30 mn à 3000 rpm.

Quand les surnageants SN présentent une couleur foncée (une des propriétés de l'extrait de l'ADNa), cette étape (addition du phénol à volume égal) est renouvelée deux à trois fois. Cette opération permet de piéger dans la phase organique, les composés responsables de la coloration foncée de l'extrait. L'élimination de ces composés permet une meilleure amplification de l'ADNa.

Le surnageant est à nouveau prélevé, après addition de chlorodiméthane, agitation et centrifugation, le dernier surnageant est prélevé et stocké à +4°C.

Concentration de l'ADNa. L'ADN contenu dans le dernier surnageant est concentré à l'aide du centricon YM-30.

Le centricon est pourvu d'une membrane filtrante. La membrane retient les molécules de plus de 30 kilos dalton.

Amplification de l'ADNa

1. Choix des amorces. Pour amplifier le fragment HVS1 (hypervariable segment) de l'ADN mitochondrial (ADNmt), trois couples d'amorces (20 à 23 nucléotides) ont été profilés à l'aide du logiciel "Primer Express 1.5".

Les couples d'amorces ont été sélectionnés pour pouvoir amplifier des fragments d'ADNmt de 170 pb à 200 pb. En amplifiant des fragments se chevauchant, ces amorces couvrent le fragment HVS1 de la position 16034 à 16477 (d'après la numérotation d'Anderson *et al.* 1981) soit un fragment de 443 pb.

Les couples d'amorces sont:

Couple 1: 16034/16223 (189pb)

L16034: 5'GGGAAGCAGATTTGGGTACC 3' (de la position 16034 à la position 16053) et H16223: 5'GGG TTGATTGCTGTACTTGCT3'(de la position 16223 à la position 16203).

Couple 2: 16170/16340 (170pb)

L16170: 5'AATCCACATCAAACCCCT3' (de la position 16170 à la position 16189) et H16340: 5'TGTG CTATGTACGGTAAATGGT3' (de la position 16340 à la position 16318).

Couple 3: 16277/16470 (200pb)

L16277: 5'ACCAACAAACCTACCCACCC3' (de la position 16277 à la position 16296) et H16477: 5'CTAC

CCCCAAGTGTATGGGC3' (de la position 16477 à la position 16457).

2. Réaction d'amplification (PCR). Dans des travaux récents (Kéfi *et al.* 2003) nous avons exploité, pour la première fois, les avantages de la technique de PCR quantitative en temps réel pour amplifier l'ADNa.

Le fluochrome utilisé était le Sybr green, c'est une molécule fluorescente aspécifique qui s'intercale dans l'ADN double brin. Excité par les rayons lasers, le Sybr green émet une fluorescence dont l'intensité est proportionnelle aux produits de PCR formés.

Les conditions optimales permettant d'obtenir en une seule PCR (sans avoir recours aux doubles PCR et Nested PCR), un produit d'amplification en quantité suffisante pour être directement séquençé, ont été déterminées.

La PCR est réalisée sur l'appareil: "ABI prism 7700 sequence detection system".

Le programme de PCR utilisé est le suivant: dénaturation à 95°C, 10 minutes, suivi de 44 cycles constitués par deux étapes 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C. Nous utilisons pour un volume de PCR de 50 microlitres, 1,7 unités de Taq gold polymérase (fournisseur: Applied biosystems).

Visualisation des bandes d'ADN. La mise en évidence des produits de PCR se fait par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% en présence de Bromure d'Éthidium (BET).

Purification des produits de PCR. La purification des produits de PCR est faite sur les colonnes du Kit: "Nucléospin Extract"(Macherey Nagel).

Séquençage. Le séquençage est réalisé sur le séquenceur automatique ABI 3100 en utilisant le Kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystem).

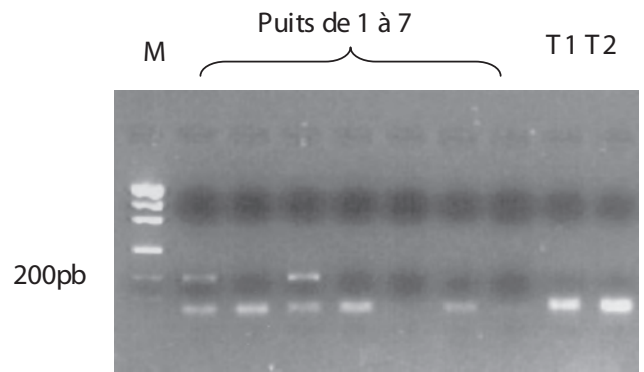


FIGURE 2. Photo de gel d'agarose (2%) visualisant les produits de PCR de quelques spécimens de la population de Taforalt, amplifiés avec le couple d'amorces 16034/16223. M: marqueur de taille. Puits 1 et 3: amplifications positives quantité d'ADN estimée à 10 ng et 15 ng respectivement, par 8 µl de produit de PCR déposés sur le gel. Puits 2: PCR négative. Puits 5: PCR inhibée. T1: témoin (ou blanc) de PCR; T2: témoin d'extraction.

MÉTHODES DE BIOINFORMATIQUE

Les séquences d'ADNa obtenues après la réaction de séquençage sont alignées et comparées à la séquence de référence (CRS) de l'ADN mitochondrial (Anderson *et al.* 1981) par le biais des logiciels "Blast 2 séquences" (Tatusova, Madden 1999) et "ClustalX"(Thompson *et al.* 1994).

Les différents alignements permettent de repérer les mutations définissant l'haplotype de chaque spécimen. Une fois déterminé, l'haplotype permet de classer le spécimen dans l'haplogroupe correspondant.

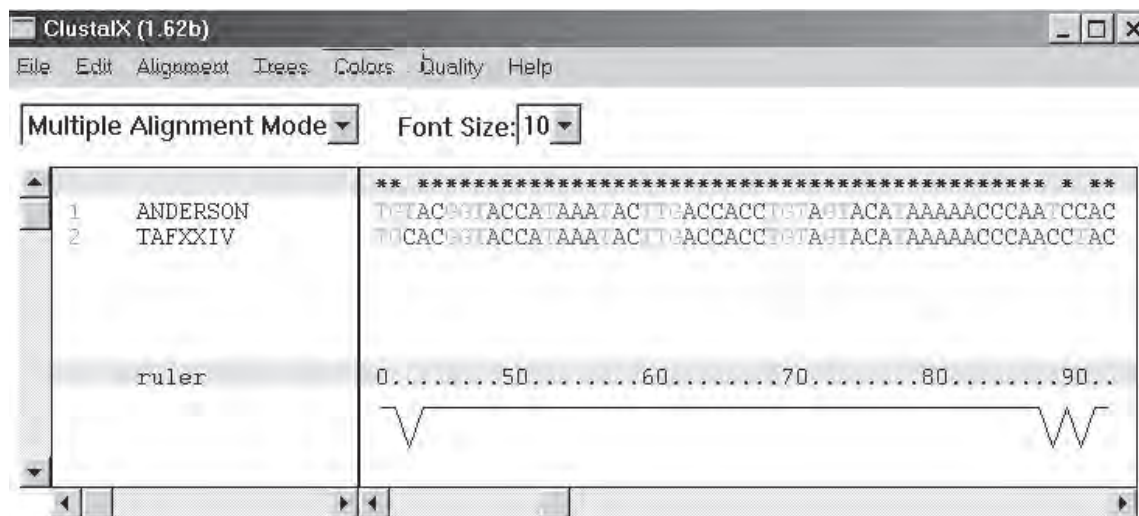


FIGURE 3. Alignement de la séquence du spécimen Taf XXIV avec la séquence de référence Anderson (appelée aussi CRS: Cambridge Reference Sequence, Anderson *et al.* 1981), au moyen du logiciel ClustalX. La présence de "*" indique des similitudes entre les deux séquences. L'absence de "*" indique une mutation dans la séquence du spécimen Taf XXIV par rapport à la référence.

TABLEAU 2. Résultat de l'amplification de quelques spécimens de la population de Taforalt avec le couple d'amorce 16034/16223. Le caractère "-" indique une amplification négative. Le terme "inhibé" indique que la PCR est inhibée. Les chiffres 5, 8, 10 et 15 correspondent à la quantité d'ADN (en nanogramme: ng) évaluée pour 8 µl de produit de PCR déposés sur gel d'agarose.

SPECIMENS																			
Volume		Taf I-21	Taf V 7	Taf V20	Taf V26	Taf V27	Taf VI 9E	Taf VIII	Taf VIII	Taf XV0	Taf XVa	Taf XVI	Taf XIX	Taf XVII	Taf XXV	Taf XIXa	Taf XXI-6	Taf XXIV	
ADN	SN1	SN1	SN1	SN1	SN1	SN1	SN1	SN2	SN1	SN1	SN1	A2-SN1	SN1	SN1	SN1	SN1	SN1	SN2	SN1
2	1	inhibé	inhibé				inhibé	inhibé		10		-	5	inhibé	10	8	8	8	inhibé
0,9																			
0,8		inhibé		inhibé		inhibé	inhibé	inhibé	10	inhibé				10					15
0,7		inhibé		15		inhibé	inhibé	10		inhibé									
0,6		inhibé		10		5	inhibé		10										
0,5		inhibé		15	8	-	20	-											
0,4	15	8	10	-	5	-													
0,3	20	-	-	15															

TABLEAU 3. Résultat de l'amplification de quelques spécimens de la population de Taforalt avec le couple d'amorce 16170/16340. Le caractère "-" indique une amplification négative. Le terme "inhibé" indique que la PCR est inhibée. Les chiffres 5, 8, 10 et 15 correspondent à la quantité d'ADN (en nanogramme: ng) évaluée pour 8 µl de produit de PCR déposés sur gel d'agarose.

SPECIMENS																			
Volume		Taf I-21	Taf V 7	Taf V20	Taf V26	Taf V27	Taf VI 9E	Taf VIII	Taf VIII	Taf XV0	Taf XVa	Taf XVI	Taf XIX	Taf XVII	Taf XXV	Taf XIXa	Taf XXI-6	Taf XXIV	
ADN	SN1	SN1	SN1	SN1	SN1	SN1	SN1	SN2	SN1	SN1	SN1	A2-SN1	SN1	SN1	SN1	SN1	SN2	SN1	
1	inhibé	inhibé		inhibé	inhibé	inhibé		inhibé	inhibé	inhibé	8	inhibé	inhibé	inhibé	inhibé	10	inhibé	inhibé	
0,9	15						inhibé		10	inhibé									
0,8		inhibé	inhibé	inhibé	15	5	inhibé	inhibé		10				15				inhibé	10
0,7	8			inhibé		8	inhibé	5		8			10					10	
0,6		inhibé	inhibé	10		10		10	15										
0,5	5					10	inhibé												
0,4				15			inhibé												
0,3	15	10					inhibé												

TABLEAU 4. Résultat de l'amplification des spécimens Taf VIII-18, Taf XVII-2 et Taf XVII-3 avec les couples d'amorces 16034/16223, 16170/16340 et 16277/16470. Le caractère "-" indique une amplification négative. Les chiffres 20 et 30 correspondent à la quantité d'ADN (en nanogramme: ng) évaluée pour 8 µl de produit de PCR déposés sur gel d'agarose.

Volume ADN	SPECIMENS								
	16034/16223			16170/16340			16277/16477		
	Taf VIII-18 SN1	Taf XVII-2 SN1	Taf XVII-3 SN1	Taf VIII-18 SN1	Taf XVII-2 SN1	Taf XVII-3 SN1	Taf VIII-18 SN1	Taf XVII-2 SN1	Taf XVII-3 SN1
2		-			30				
1µl	30	-	20	20	8		30	30	30
0,9		20							

TABLEAU 5. Polymorphismes du fragment HVSI de l'ADN mitochondrial des spécimens Taf VIII-18, Taf XVII-2, Taf XVII-3 et des deux expérimentateurs.

Spécimens	Début et fin de la séquence	Polymorphismes
Taf XVII-2	16054-16454	16126C-16355T-16362C
Taf XVII-3	16054-16454	16126C-16355T-16362C
Taf VIII-18	16054-16454	16126C-16355T-16362C
Expérimentateur n°1	16054-16400	16295T
Expérimentateur n°2	16054-16454	16126C-16355T-16362C

TABLEAU 6. Nombre de séquences effectuées (24 séquences) par spécimen.

Fragment amplifié	Première extraction		Deuxième extraction	
16034/16223	PCR1	2 séquences	PCR1	2 séquences
	PCR2	2 séquences	PCR2	2 séquences
16170/16340	PCR1	2 séquences	PCR1	2 séquences
	PCR2	2 séquences	PCR2	2 séquences
16170/16340	PCR1	2 séquences	PCR1	2 séquences
	PCR2	2 séquences	PCR2	2 séquences

RÉSULTATS

Amplifications

Sur les 31 spécimens de la population ancienne de Taforalt traités, 26 spécimens contenaient encore de l'ADN amplifiable. Pour chacun de ces spécimens au moins deux extractions indépendantes ont été réalisées et deux PCR, au moins, ont été effectuées sur chacune des extractions; ceci pour chaque couple d'amorces.

Les résultats des différents essais d'amplification réalisés avec les couples d'amorces 16034/16223, 16170/16340 et 16277/16477 sont réunis dans les Tableaux 2 et 3 et quelques essais sont visualisés dans la Figure 2.

Pour toutes les PCR réussies, les quantités d'ADN des amplifications estimées varient de 5 à 15 ng par 8 µl de produit de PCR déposé sur gel d'agarose. Exception faite pour les trois spécimens Taf VIII-18, Taf XVII-2 et Taf XVII-3 pour lesquels la quantité d'ADN estimée est de 20 à 30 ng (par 8 µl de produit de PCR déposé sur gel d'agarose) (Tableau 4). Ces quantités sont deux fois supérieures aux quantités habituellement obtenues en amplifiant l'ADN. De plus, les produits de PCR

ont été obtenus dès la première tentative de réaction d'amplification. Ces résultats ressemblent à ceux observés lors de l'amplification de l'ADN actuel, ils laissent penser à une contamination avec l'ADN actuel.

L'analyse des séquences de ces trois spécimens: Taf VIII-18, Taf XVII-2 et XVII-3 et la comparaison de ces séquences avec celles des manipulateurs (Tableau 5) a confirmé l'hypothèse d'une contamination avec l'ADN actuel.

Au total, sur 26 spécimens amplifiés, l'obtention de produits de PCR non contaminés a été réalisée pour 23 spécimens (les 23 spécimens possèdent des séquences différentes de celles des expérimentateurs).

Séquençage et détermination de la diversité mitochondriale de la population ancienne de Taforalt

Un minimum de 24 séquençages de produit de PCR ont été effectués pour chaque spécimen (Tableau 6). L'alignement des séquences des différents spécimens (Figure 3) avec la séquence de référence CRS (Cambridge Reference sequence, Anderson *et al.* 1981), a permis de repérer les mutations caractérisant chaque spécimen et de classer celui-ci dans un haplogroupe.

TABLEAU 7. Diversité mitochondriale des 23 spécimens de la population ancienne de Taforalt.

Spécimens	Début et fin de la séquence	Polymorphismes	Haplogroupes
Taf I-21	16054-16454	CRS	
Taf II	16054-16454	CRS	
Taf V 5	16054-16317	CRS	
Taf V 7	16081-16404	CRS	
Taf V 20	16054-16317	CRS	
Taf XVa	16054-16317	CRS	H ou U?
Taf XV0	16054-16317	CRS	
Taf XVII	16054-16317	CRS	
Taf XIX	16054-16317	CRS	
Taf XXI-6	16054-16317	CRS	
Taf XXV *	16190-16317	CRS	
Taf 55-IB	16105-16317	16239 T	
Taf VI-10	16054-16317	16124T/C-16239T	H?
Taf V 26	16054-16317	16204C-16226T	
Taf XVIa2-19	16054-16317	16189C-16261T	
Taf 55-I	16054-16454	16126C-16355T	
Taf V 18	16054-16317	16126C-16304C	JT?
Taf XXV 3	16054-16317	16126 C	
Taf XXIV	16054-16317	16126C-16172C-16174T	JT ou U6?
Taf VI9E	16054-16317	16172C-16174T	U6?
Taf V 27	16054-16317	16298T/C	V?
Taf XIX a	16054-16317	16179T-16298T/C	
Taf VIII	16054-16317	16223T	L3, M ou N?

TABLEAU 8. Polymorphismes observés pour les spécimens Taf V-18 et Taf XXIV.

Spécimens	Polymorphismes	
	Première extraction	Deuxième extraction
Taf V-18	16126C-16304C-16311C (2 PCR différentes)	16126C-16304C (2 PCR différentes)
	16129A-16172C-16174T	
Taf XXIV	(PCR 1)	16126C-16172C-16174T
	16129A-16174T (PCR 2)	(2 PCR différentes)

Le *Tableau 7* regroupe les polymorphismes observés pour les 23 spécimens, les mutations dans ce tableau sont vérifiées plusieurs fois sur les différentes séquences. Les mutations ne sont considérées comme étant authentiques que lorsqu'elles sont retrouvées sur des PCR indépendantes de deux extractions différentes d'ADNa réalisées sur le même spécimen.

Dans certains cas nous avons observé pour le même individu, des séquences différentes à partir de PCR ou d'extractions indépendantes.

En ce qui concerne le spécimen Taf V-18 par exemple, les mutations 16126C-16304C-16311C sont repérées sur

les séquences de deux produits de PCR indépendants, obtenues à partir d'une première extraction, alors que pour la deuxième extraction, la mutation 16311C n'est pas retrouvée. Ainsi la séquence considérée pour le spécimen Taf V-18 est la suivante: **16126TC-16304C**.

La non reproductibilité de certaines mutations est observée aussi dans le cas du spécimen Taf XXIV (*Tableau 8*). En effet, la mutation 16129A n'est observée qu'une seule fois, elle est donc exclue.

La détermination des séquences des spécimens de Taforalt pourrait-elle résoudre le problème de la nomenclature des sujets de cette population ancienne? Les

restes osseux nommés Taf V-5, Taf V-7, Taf V-18, Taf V-20, Taf V-26, Taf V-27 appartiennent-ils au même individu? Ou s'agit-il d'individus différents?

Taf V-5, Taf V-18 et Taf V-27 possèdent des séquences mitochondriales différentes (Tableau 7). Il s'agit donc d'individus distincts. Ainsi, le chiffre arabe indique le numéro du sujet inhumé dans la sépulture. Ceci est confirmé par l'analyse des séquences de Taf XXV-3 et Taf XXV. Ces derniers possèdent des polymorphismes différents (Tableau 7), il s'agit donc de deux sujets différents.

La sépulture V renfermait un homme, une femme et six enfants (Ferembach 1962). Quatre enfants sont âgés de quelques mois à 1 an. Les deux autres sont âgés de 1 à 2 ans et de 5 à 16 ans. Les spécimens Taf V-5, Taf V-7 et Taf V-20 ont la même séquence mitochondriale. Inhumés dans la même sépulture, ces trois spécimens pourraient avoir un lien de parenté suivant la lignée maternelle. Pour l'étude de la diversité mitochondriale de la population de Taforalt, nous adoptons les mêmes critères de sélection que ceux que nous utilisons dans l'étude des populations actuelles, nous excluons donc les individus apparentés. Ainsi nous tenons compte d'une seule séquence parmi celles des trois spécimens: Taf V-5, Taf V-7 et Taf V-20. Nous avons alors les séquences de 21 spécimens au lieu de 23.

Les séquences de ces 21 spécimens représentent 13 haplotypes différents.

42,8% (9/21) de la population de Taforalt présentent une séquence identique à la séquence de référence CRS (Cambridge Reference Sequence, Anderson *et al.* 1981). Ces spécimens pourraient être classés dans les haplogroupes H ou U. Quatre spécimens (19%) de la population de Taforalt possèdent la mutation 16126C. Ces haplotypes pourraient appartenir à l'haplogroupe JT. Les polymorphismes observés pour les spécimens Taf 55-IB, Taf V26, Taf VI-10 et Taf XVI a2-19 (4/21–19%) orientent la classification de leurs haplotypes dans l'haplogroupe H.

Deux spécimens de la population de Taforalt: Taf XXIV et Taf VI9E (9,5%) portent dans leur séquence la mutation 16172C. Taf XXIV et Taf VI9E pourraient être classés dans l'haplogroupe U6 (Maca-Meyer *et al.* 2003). Le spécimen Taf VIII possède une séquence qui diffère de la séquence de référence par la substitution 16223T. L'haplotype de ce spécimen pourrait appartenir aux haplogroupes L3, M ou N. Deux spécimens (9,5%) de la population de Taforalt pourraient être classés dans l'haplogroupe V.

Nous avons observé la présence de trois cas d'hétéroplasmie (Taf VI-10, Taf V-27, Taf XIX). Ces hétéroplasmies concernent les positions 16298 et 16124 où nous observons clairement la superposition de la courbe du nucléotide T avec la courbe du nucléotide C (voir chromatogramme de la Figure 4).

DISCUSSION

La population de Taforalt est une des populations clef dans la compréhension du peuplement du Nord de l'Afrique. En effet, datés à 12.000 ans par datation au ^{14}C , les individus composant cette population sont exclusivement des hommes de type Mechta El-Arbi, épipaléolithiques ayant développé au Maghreb la culture ibéromaurusienne. La connaissance de la diversité génétique de cette population constitue donc un lien important entre les études archéologiques des populations anciennes et les études génétiques des populations actuelles de l'Afrique du Nord. En effet, cette étude devrait permettre de préciser la chronologie des migrations Sud-Nord.

L'analyse de la diversité de l'ADN mitochondrial de 21 spécimens parmi 30 prélevés dans la population de Taforalt révèle l'existence de 13 haplotypes différents. Cette diversité haplotypique est voisine de celle des populations européennes du pourtour méditerranéen et des populations



FIGURE 4. Chromatogramme (Logiciel Chromas) correspondant à la séquence du spécimen Taf VI-10 et concernant le fragment 16034–16223.

maghrébines à l'exception des populations algériennes (les berbères mozabites et les non berbères) qui sont de diversité haplotypique moindre. La diversité haplotypique de la population de Taforalt est inférieure à celle des populations du Proche Orient.

Les 21 spécimens analysés suffisent pour donner une bonne idée des caractéristiques de la population de Taforalt. Aucun de ces spécimens n'est apparenté aux spécimens sub-soudanais actuels (absence de l'haplogroupe L, regroupant les haplotypes typiquement africains subsahariens). L'hypothèse d'une origine au Sud du Sahara des ibéromaurusiens n'est donc pas soutenue par nos résultats, montrant plutôt un peuplement de type méditerranéen dans le Nord de l'Afrique au moins jusqu'à 12.000 ans. Nos résultats soutiendraient des travaux basés sur des analyses dentaires, morphométriques cranio-faciale et post-craniale montrant des divergences entre les populations ibéromaurusiennes et leurs contemporains au Soudan (Bermudez de Castro 1991, Irish 2000). La présence d'une composante subsaharienne dans les populations nord africaines actuelles serait due à des migrations postérieures à 12.000 ans BP.

Toutes les séquences des spécimens de Taforalt présentent des haplotypes appartenant à des haplogroupes eurasiatiques. Parmi les haplogroupes majoritaires, H est considéré comme originaire du Proche Orient, émergence de cet haplogroupe datée à 35.000 ans, tandis que l'haplogroupe JT, originaire du Proche Orient également, aurait un âge égal à 50.000 ans; enfin l'haplogroupe U6 originaire du Nord de l'Afrique est proposé comme étant contemporain de l'haplogroupe JT.

La présence d'individus porteurs d'un ADN mitochondrial appartenant à l'haplogroupe U6 montre chez Taforalt la persistance à 12.000 ans BP d'une composante ancestrale d'origine nord africaine. Ce résultat confirme à la fois l'émergence nord africaine de U6 et une probable évolution in situ d'une population ancêtre de Taforalt.

Les présences de JT et H traduiraient les flux migratoires paléolithiques venant du Moyen Orient. Cependant, l'haplogroupe H pourrait indiquer une composante d'origine strictement européenne dans la population de Taforalt, résultant d'un flux migratoire plus tardif.

Parmi les populations actuelles du Nord de l'Afrique étudiées à ce jour, la population berbère du Nord du Maroc présente des similitudes avec la population ancienne de Taforalt. En effet, les berbères du Nord du Maroc possèdent le taux le plus faible d'haplogroupe de type subsaharien (3,2%). De plus, tous les haplogroupes observés chez Taforalt sont retrouvés chez cette population actuelle, même l'haplogroupe J/T. Ce dernier, rarement représenté dans les populations actuelles, est absent dans les populations nord africaines à l'exception de la population berbère du Nord du Maroc (1,6%).

Ces observations conduisent à penser à une continuité génétique entre la population ibéromaurusienne de Taforalt et la population actuelle occupant la même aire géographique: la population berbère du Nord du Maroc.

Nos résultats renforcent des études anthropologiques qui suggèrent que l'homme de type Mechta El-Arbi n'ait pas disparu complètement. Les caractères méchoïdes sont retrouvés chez 8% des sépultures protohistoriques et puniques, chez 3% des populations actuelles du Maghreb et en pourcentage plus élevé chez les populations des îles Canaries (Ferembach 1962, Camps 1989). Nos résultats donnent du poids aux études dentaires, lithiques et craniométriques qui suggèrent une continuité régionale en Afrique du Nord depuis le pléistocène terminal (Lubell *et al.* 1984, Irish 2000).

CONCLUSION

Nous avons abordé dans cet article une thématique novatrice qui est l'étude de la diversité génétique de la population épipaléolithique de Taforalt. L'hypothèse d'une origine sub-soudanaise des ibéromaurusiens est rejetée. Une origine nord africaine locale est plus probable.

L'étude des polymorphismes de l'ADN mitochondrial d'autres populations anciennes tels que la population ibéromaurusienne d'Afalou (Algérie) et des populations capsienes préciserait encore nos connaissances du peuplement de l'Afrique du Nord.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur le Professeur Henry de Lumley et Madame le docteur Dominique Grimaud-Hervé pour avoir mis à notre disposition tous les spécimens de la population de Taforalt dont les résultats sont présentés dans cet article. Ce travail a été financé par l'Inserm et aussi par le CNRS, dans le cadre de l'appel d'offre OHLL.

Rym Kéfi bénéficie d'une bourse financée par le CNRS.

Eric Bouzaid bénéficie d'une bourse financée par la Région PACA.

RÉFÉRENCES

- ANDERSON S., BANKIER A. T., BARRELL B. G., DE BRUIJN M. H., COULSON A. R., DROUIN J., EPERON I. C., NIERLICH D., ROE B. A., SANGER F., SCHREIER P. H., SMITH A. J., STADEN R., YOUNG I. G., 1981: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- ARAMBOURG C., 1963: Le gisement de Ternifine II - l'Atlantrophe mauretanicus. *Archives de l'IPH*, 32: 37-190.
- BALOUT L., 1954: Les hommes préhistoriques du Maghreb et du Sahara. Inventaire descriptif et critique. *Lybica* 2: 215-422.
- BERAUD-COLOMB E., ROUBIN R., MARTIN J., MAROC N., GARDEISEN A., TRABUCHET G., GOOSSENS M., 1995: Human beta-globin gene polymorphisms characterized in DNA extracted from ancient bones 12 000 years old. *Amer. J. of Hum. Genetics* 57: 1267-1274.
- BERMUDEZ DE CASTRO J. M., 1991: La denture de la population Mésolithique d'Afrique du Nord et l'hypothèse "Afro-Européen sapiens". *L'Anthropologie* 95: 201-218.

- BRAKEZ Z., BOSCHE, IZAABEL H., AKHAYAT O., COMAS D., BERTRANPETIT J., CALAFELL F., 2001: Human mitochondrial DNA sequence variation in the Moroccan population of the Souss area. *Annals of Hum. Biology* 28: 295–307.
- CAMPS G., 1974: *Les civilisations préhistoriques de l'Afrique du Nord et du Sahara*. Drouin, Paris. 366 pp.
- CAMPS G., 1989: *L'origine des Berbères*. <http://www.mondeberbere.com/histoire/camps/origines.htm>
- DEBENATH A., RAYNOL J. P., TEXIER J. P., FEREMBACH D., 1986: Stratigraphie, habitat, typologie et devenir de l'Atérien marocain: données récentes. *L'Anthropologie* 90: 233–246.
- FEREMBACH D., 1962: *La nécropole épipaléolithique de Taforalt (Maroc oriental), Etude des squelettes humains*. CNRS édition, Casablanca. 175 pp.
- FADHLAOUI-ZID K., PLAZA S., CALAFELL F., BEN AMOR M., COMAS D., BENNAMAR EL GAAIED A., 2004: Mitochondrial DNA heterogeneity in Tunisian Berbers. *Annals of Hum. Genetics* 68, 3: 222–233.
- IRISH D. J., 2000: The Iberomaurusian enigma: North African progenitor or dead end? *J. of Hum. Evol.* 39, 4: 393–410.
- KÉFI 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. Paleovol.* 2 :125–132.
- KRINGS M., SALEM A., BAUER K., GEISERT H., MALEK A., CHAIX L., SIMON C., WELSBY D., DIRIENZO A., UTERMANN G., SAJANTILA A., PÄÄBO S., STONEKING M., 1999: mtDNA analysis of Nile River Valley populations: A genetic corridor or a barrier to migration? *Amer. J. of Hum. Genetics* 64, 4: 1166–1176.
- LUBELL D., SHEPPARED P., JACKES M., 1984: Continuity in the Epipaleolithic of northern Africa with emphasis on the Maghreb. In: F. Wendorf, A. E. Close (Eds.): *Advances in World Archaeology* 3. Pp. 143–191. Academic Press, New York.
- MACA-MEYER N., GONZALEZ A. M., PESTANO J., FLORES C., LARRUGA J. M., CABRERA V. M., 2003: Mitochondrial DNA transit between West Asia and North Africa inferred from U6 phylogeography. *BMC Genet.* 4, 1: 15.
- PLAZA S., CALAFELL F., HELALA, 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 Hum. Genetics* 67, 4: 312–328.
- RANDO J. C., PINTO F., GONZALEZ A. M., HERNADEZ M., LARRUGA J. M., CANRERA V. M., BANDEL T. H.-J., 1998: Mitochondrial DNA analysis of northwest African populations reveals genetic exchanges with European, near-eastern, and sub-Saharan populations. *Annals of Hum. Genetics* 62: 531–550.
- ROCHE J., 1953: La grotte de Taforalt. *L'Anthropologie* 57: 375–380.
- TATUSOVA A., MADDEN T. L., 1999: Blast 2 sequences – a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett.* 1999, 174: 247–250.
- THOMPSON J. D., HIGGINS D. G., GIBSON T. J., 1994: Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4675–4680.
- VALLOIS H. V., MOVIUS H. L., 1952: Catalogue des hommes fossiles. *XIX^e Congrès géologique international*, Alger. 154 p.
- WENDORF F., 1968: A Nubian final paleolithic graveyard in Jebel Sahaba, Sudan. In: F. Wendorf (Ed.): *The Prehistory of Nubia* 2. Pp. 954–995. SMU Press, Dallas.

Rym Kéfi
Eric Bouzaid
Eliane Béraud-Colomb
U600 INSERM – FRE2059 CNRS
Laboratoire d'Immunologie
Hôpital de Sainte-Marguerite
BP 29, 13274 Marseille Cedex 09, France

Alain Stevanovitch
Laboratoire de Police Scientifique
de Marseille
97 Boulevard Camille Flammarion
13248 Marseille Cedex 4, France

Correspondance:
Eliane Béraud-Colomb
U600 INSERM – FRE2059 CNRS
Laboratoire d'Immunologie
Hôpital de Sainte-Marguerite
BP 29, 13274 Marseille Cedex 09, France
E-mail: beraud@marseille.inserm.fr