



BESMA YACOUBI-LOUESLATI, LOTFI CHERNI, SABEH FRIGI, THOURAYA BAROUDI,  
AMEL BEN AMMAR EL GAAIED

## POLYMORPHISME DU MICROSATELLITE MITOCHONDRIAL D310 DANS LA POPULATION TUNISIENNE

**RÉSUMÉ:** Nous avons analysé le polymorphisme du microsatellite mitochondrial, situé entre les positions 303 et 315 dans une population tunisienne. Les fréquences haplotypiques ont été comparées à celles d'autres populations (Berbères de Sejnène et Takrouna, Bédouins, Portugais, Italiens, Français, Britanniques, Espagnols et Turques). Les résultats obtenus montrent que ce microsatellite mitochondrial est une séquence « hot spot » de polymorphisme à insertions/délétions mononucléotidiques. En effet, il présente un taux de polymorphisme supérieur à 93% dans toutes les populations analysées. Les résultats révèlent aussi que les haplotypes 309.1 315.1 et 315.1 sont les plus fréquents dans toutes les populations considérées alors que l'haplotype de la séquence de référence (CRS) n'a été détecté que dans la population tunisienne, les Berbères de Sejnène et les Britanniques.

**MOTS-CLEFS:** ADN mitochondrial – Polymorphisme – Microsatellite mitochondrial – Tunisie

**ABSTRACT:** In the present study, we have investigated the polymorphism of the mitochondrial microsatellite, situated between 303 and 315 bp positions, in a Tunisian population. The haplotype frequencies of this microsatellite were compared to those of other populations (Berbers from Sejnene and Takrouna, Bedouins, Portuguese, Italians, French, British, Spanish and Turkish). The obtained results reveal this mitochondrial microsatellite as a frequent hot spot of mononucleotide insertions. In fact, his polymorphic rate is superior to 93% in all analysed populations. The results showed that the two haplotypes 309.1 315.1 and 315.1 are the most frequent in all studied populations. The haplotype corresponding to the Cambridge Reference Sequence (CRS) is only detected in the Tunisian population, the Berbers from Sejnene and the British people.

**KEY WORDS:** Mitochondrial DNA – Polymorphism – Mitochondrial microsatellite – Tunisia

### INTRODUCTION

L'analyse de marqueurs polymorphes dans une population donnée permet de décrire sa structure génétique et d'établir des bases de données sur les fréquences des marqueurs génétiques dans différentes populations. Ces données peuvent être utilisées dans les recherches d'association de certaines mutations, allèles ou haplotypes à des pathologies en évaluant le risque relatif.

Le génome mitochondrial contient une majeure partie codante et deux régions non codantes : une petite, de l'ordre

de 30 pb, qui porte l'origine de réplication du brin léger et une, plus importante, appelée région de contrôle ou DLoop qui fait 1124 pb (située entre les positions 16024 et 576) (Anderson *et al.* 1981, Andrews *et al.* 1999). Cette région a fait l'objet de plusieurs études phylogénétiques car elle héberge le plus haut degré de polymorphisme par rapport au reste de la molécule (Aquadero, Greenberg 1983, Cann *et al.* 1984, 1987, Horai, Hoyasaka 1990). Ce polymorphisme se situe essentiellement dans deux régions hypervariables appelées HV1 et HV2 (Vigilant *et al.* 1989). A l'intérieur de la région HV2 existe un microsatellite qui est une répétition

de cytosine interrompue par une thymine (CCCCCTCCCC) située entre les positions 303 et 315 et appelé D310 (Figure 1). Ce microsatellite est impliqué dans la formation d'un hybride ADN-ARN persistant qui permet l'initiation de la réplication du brin lourd (Kang *et al.* 1997, Lee *et al.* 1998). L'analyse du polymorphisme de la région HV2, au niveau somatiques, dans différents types de cancers a révélé qu'il est le siège de mutations (insertions et/ou délétions mononucléotidiques) très fréquentes (Alonso *et al.* 1997, Carew, Huang 2002, Liu *et al.* 2001, Maximo *et al.* 2001, Parella *et al.* 2003, Yu *et al.* 2008). Certaines études suggèrent même l'utilisation potentielle de ce marqueur mitochondrial dans la détection de certains cancers (Parella *et al.* 2001, Nomoto *et al.* 2002). Néanmoins, il est nécessaire de connaître son polymorphisme dans les différentes populations humaines avant d'entreprendre toute étude cas/témoins.

Relativement peu de données sont disponibles sur le polymorphisme de ce microsatellite dans les populations humaines. En effet, la région HV2 qui héberge ce microsatellite est moins étudiée que la région HV1 (Handt 1998) dont la séquence contient des mutations spécifiant les haplogroupes (Bandelt *et al.* 1995, Torroni *et al.* 1996, Macaulay *et al.* 1999, Torroni *et al.* 2001, Bandelt *et al.* 2002).

Dans le présent travail, nous avons analysé le polymorphisme du microsatellite, situé entre les positions 303 et 315, dans la région hypervariable 2 (HV2) de la molécule d'ADN mitochondrial dans la population tunisienne par comparaison à des séquences relatives à ce microsatellite, déjà établies dans les populations suivantes: Berbères de Sejnène et Takrouna (Frigi *et al.* 2006), Bédouins (Di Rienzo, Wilson 1991), Portugais (Pereira *et al.* 2000), Italiens (Tagliabracci *et al.* 2001), Français (Rousselet *et al.* 1998), Britanniques (Piercy *et al.* 1996), Espagnols (Crespillo *et al.* 2000) et Turques (Calafell *et al.* 1996).

## MATERIELS ET METHODES

Le sang périphérique total a été prélevé chez 68 sujets sains tunisiens, issus de familles non apparentées. L'ADN génomique total a été extrait à partir du culot leucocytaire

après une digestion par la protéinase K puis purification sur une colonne (QIAGEN Inc, Chatsworth, CA, USA). La région hypervariable 2 (HV2) de la région non codante de l'ADN mitochondrial a été amplifiée par PCR, en utilisant le couple d'amorces: L16340 (5'AGCCATTTACCGTACATAGCACA3') et H408 (5'TGTTAAAAGTGCATACCGCCA3'). Les amplifiats obtenus ont été purifiés à l'aide du kit de purification Invitrogen puis séquencés automatiquement avec les amorces H et L utilisées pour la PCR.

Chaque séquence ainsi obtenue a été comparée à la version révisée de la séquence de référence de Cambridge (Andrews *et al.* 1999) afin d'identifier les polymorphismes entre les positions 303 et 315. Les séquences, situées entre les positions 303 et 315, ont été par la suite classées en haplotypes sur la base des polymorphismes révélés entre ces positions. Les fréquences haplotypiques ont été calculées par comptage direct. Par ailleurs, afin de comparer les résultats obtenus dans la population tunisienne à d'autres populations nous avons relevé, à partir de la bibliographie, les séquences relatives à ce microsatellite, déjà établies dans les populations suivantes: Berbères de Sejnène et Takrouna (Frigi *et al.* 2006), Bédouins (Di Rienzo, Wilson 1991), Portugais (Pereira *et al.* 2000), Italiens (Tagliabracci *et al.* 2001), Français (Rousselet *et al.* 1998), Britanniques (Piercy *et al.* 1996), Espagnols (Crespillo *et al.* 2000) et Turques (Calafell *et al.* 1996) pour relever les polymorphismes de ce microsatellite.

## RESULTATS

L'analyse des séquences obtenues a permis de caractériser des polymorphismes de répétitions mononucléotidiques entre les positions 303 et 315. Quatre polymorphismes correspondant à l'insertion d'une (ins 1pb), de deux (ins 2pb), de trois (ins 3pb) cytosines et la délétion d'une Adénine, au niveau de ce microsatellite sont révélés chez les Tunisiens considérés dans la présente étude (Tableau 1).

Les deux polymorphismes (ins 1pb) et (ins 2pb) sont les plus fréquents dans toutes les populations analysées. L'insertion de trois cytosines (ins 3 pb) est détectée dans les

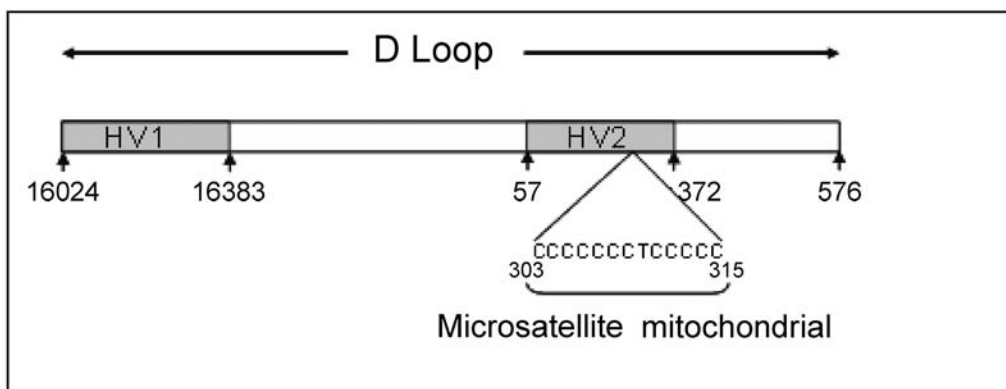


FIGURE 1. Organisation de la région non codante (D-Loop).

TABLEAU 1. Polymorphismes détectés dans le mikrosatellite mitochondrial 303-315.

Populations	ins 1pb (%)	ins 2pb (%)	ins 3pb (%)	ins 4pb (%)	Del 1pb(%)	CRS (%)
Tunisiens * (n=68)	29 (42.64)	28 (41.17)	6 (8.82)	-	2 (2.94)	3 (4.41)
Berbères de Takrouna <sup>a</sup> (n=33)	15 (45.45)	9 (27.27)	9 (27.27)	-	-	-
Berbères de Sejnène <sup>a</sup> (n=47)	24 (51.06)	17 (36.17)	3 (6.38)	-	-	3 (6.38)
Bedouins <sup>b</sup> (n=29)	18 (62.06)	11 (37.93)	-	-	-	-
Italiens <sup>c</sup> (n=83)	29 (34.93)	44 (53.01)	10 (12.04)	-	-	-
Français <sup>d</sup> (n=50)	23 (46)	18 (36)	7 (14)	2 (4)	-	-
Portugais <sup>e</sup> (n=241)	111 (46.05)	110 (45.64)	20 (8.29)	-	-	-
Espagnols <sup>f</sup> (n=118)	60 (50.84)	45 (38.13)	13 (11.01)	-	-	-
Turques <sup>g</sup> (n=29)	11 (37.93)	18 (62.06)	-	-	-	-
Britanniques <sup>h</sup> (n=100)	39 (39)	60 (60)	-	-	-	1 (1)

\*: présente étude; a: Frigi *et al.* 2006; b: Di Rienzo, Wilson 1991; c: Tagliabracci *et al.* 2001; d: Rousselet *et al.* 1998; e: Pereira *et al.* 2000; f: Crespillo *et al.* 2000; g: Calafell *et al.* 1996; h: Piercy *et al.* 1996.

trois populations tunisiennes [Tunisiens (8.82%), Berbères de Takrouna (27.27%) et de Sejnène (6.38%)] ; les Italiens, les Français, les Portugais et les Espagnols. L'insertion de quatre cytosines (ins 4pb) n'a été trouvée que chez deux sujets français (4%). La séquence de ce mikrosatellite, relative à celle de la séquence de référence (CRS), n'est révélée que chez 3 (4.41%) tunisiens, 3 Berbères (6.38%) de Sejnène et un sujet (1%) britannique. Ces résultats montrent que ce mikrosatellite mitochondrial est le siège de polymorphismes très fréquents dans les dix populations analysées. En effet, la plupart des séquences HV2 analysées chez les Tunisiens (95, 59%), chez les Berbères de Séjnène (93,62 %), chez les Britanniques (99%) et toutes les séquences analysées chez le reste des populations présentent un polymorphisme entre les positions 303 et 315.

Sur la base des polymorphismes révélés au niveau de ce mikrosatellite, neuf haplotypes ont été établis (Tableau 2). L'haplotype 309.1 315.1 défini par l'insertion d'une cytosine entre les positions 303 et 309 et d'une cytosine entre les positions 311 et 315 (Figure 2a) et l'haplotype 315.1, caractérisé par l'insertion d'une seule cytosine entre les positions 311 et 315 (Figure 2b) sont les plus fréquents dans toutes les populations testées. L'haplotype associé à la séquence de référence (CRS) n'est détecté que dans la population tunisienne, les Berbères de Sejnène et les

Britanniques. L'haplotype 309.2 315.1, défini par l'insertion de deux cytosines entre les positions 303 et 309 et d'une cytosine entre les positions 311 et 315, est retrouvé à des fréquences relativement faibles dans sept populations [les Tunisiens (8.82%), les Berbères de Sejnène (6.38%) et de Takrouna (27.27%), les Italiens (12%), les Français (14%), les Portugais (7.88%) et les Espagnols (10.16)]. Chacun des deux haplotypes 309.1 et 309.3, définis respectivement par l'insertion d'une et de trois cytosines entre les positions 303 et 309 de la molécule d'ADN mitochondrial, est révélé dans deux populations. Chacun des deux haplotypes 309.2 et 309.3 315.1 est révélé dans une seule population (respectivement les Tunisiens et les Français).

**DISCUSSION**

Le séquençage du mikrosatellite mitochondrial D310 dans plusieurs types de tumeurs a montré qu'il est le siège de nombreuses variations mononucléotidiques. En effet, des polymorphismes du D310 ont été trouvés dans 67% des tumeurs gastriques (Wu *et al.* 2005) ; 71 à 72% des tumeurs du sein (Parella *et al.* 2001, Tseng *et al.* 2006) ; 90% des tumeurs colorectaux (Lee *et al.* 2005) et 100% des hépatocarcinomes (Yin *et al.* 2004). De ce fait certaines études ont

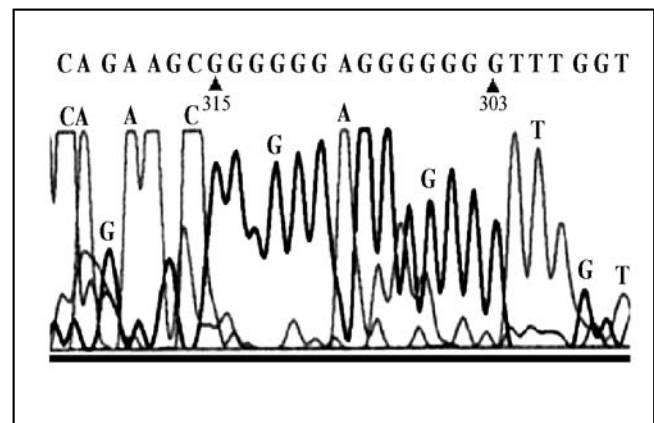
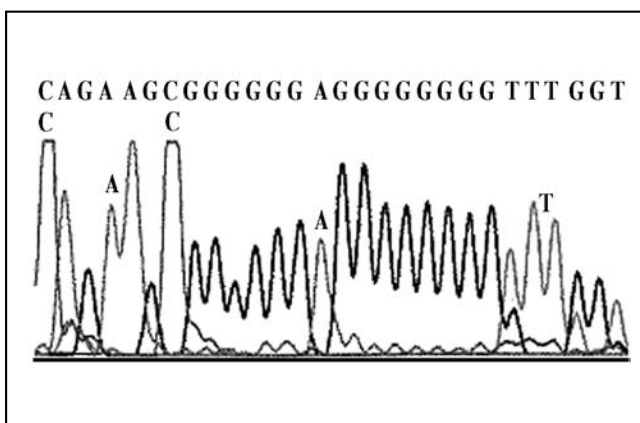


FIGURE 2. Les haplotypes les plus fréquents du mikrosatellite mitochondrial 303-315.

TABLEAU 2. Distribution des haplotypes du microsatellite mitochondrial 303-315 dans les populations étudiées.

Haplotypes	Séquences entre les positions 303 et 315	Présente étude Tunisiens (n=68)	Berbères de Takrouna <sup>a</sup> (n=33)	Berbères de Sejnène <sup>a</sup> (n=47)	Bédouins <sup>b</sup> (n=29)	Italiens <sup>c</sup> (n=83)	Français <sup>d</sup> (n=50)	Portugais <sup>e</sup> (n=241)	Espagnols <sup>f</sup> (n=118)	Turques <sup>g</sup> (n=29)	Britanniques <sup>h</sup> (n=100)
CRS	GGGGGGGAGGGGG	3(4.41)	–	3(6.38)	–	–	–	–	–	–	1(1)
309.1	GGGGGGGAGGGGG	–	–	–	–	1(1.2)	–	1(0.41)	–	–	–
315.1	GGGGGGGAGGGGG	29(42.64)	15(45.45)	24(64.86)	18(62.06)	28(33.73)	23(46)	110(45.64)	60(50.84)	11(37.93)	39(39)
309.2	GGGGGGGGGAGGGGG	2(2.94)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
309.3	GGGGGGGGGAGGGGG	–	–	–	–	–	–	1(0.41)	1(0.84)	–	–
309.1 315.1	GGGGGGGAGGGGG	26(38.23)	9(27.27)	17(36.17)	11(37.93)	44(53.01)	18(36)	110(45.64)	45(38.13)	18(62.06)	60(60)
309.2 315.1	GGGGGGGGGAGGGGG	6(8.82)	9(27.27)	3(6.38)	–	10(12)	7(14)	19(7.88)	12(10.16)	–	–
309.3 315.1	GGGGGGGGGGAGGGGG	–	–	–	–	–	2(4)	–	–	–	–
310 del	GGGGGGGGGGGG	2(2.94)									

a: Frigi *et al.* 2006; b: Di Rienzo, Wilson 1991; c: Tagliabracci *et al.* 2001; d: Rousselet *et al.* 1998; e: Pereira *et al.* 2000; f: Crespillo *et al.* 2000; g: Calafell *et al.* 1996; h: Piercy *et al.* 1996.

même proposé d'utiliser les variations de ce microsatellite mitochondrial comme marqueur pour la détection précoce de certains cancers (Parella *et al.* 2001, Nomoto *et al.* 2002).

Le séquençage du microsatellite mitochondrial D310, au niveau germinale, chez 68 Tunisiens sains, issus de familles non apparentées a montré que c'est une séquence « hot spot » de polymorphismes à insertions/délétions mononucléotidiques. En effet, 95,59% des séquences établies présentent des variations mononucléotidiques entre les positions 303 et 315. Ce haut degré de polymorphisme a été également trouvé dans neuf autres populations (Tableau 1). D'ailleurs, toutes les séquences analysées chez les Berbères de Sejnène, Les bédouins, les Italiens, les Français, les Portugais, les Espagnols, les Turques et les Britanniques (à l'exception d'une seule séquence) présentent des insertions/délétions au niveau de ce microsatellite mitochondrial.

Ces résultats indiquent que le polymorphisme de ce microsatellite, déjà très fréquent au niveau germinale et dans

la plupart des populations étudiées doit être considéré avec prudence avant de l'associer au processus de cancérogenèse et ou l'utiliser comme moyen de détection de la transformation des cellules tumorales.

## REMERCIEMENTS

Nos remerciements s'adressent à tous les tunisiens donateurs qui ont accepté volontairement de participer à cette étude et à toutes les personnes qui ont participé à la collecte des prélèvements sanguins. Ces recherches s'inscrivent dans le cadre du projet de laboratoire de génétique, d'immunologie et de pathologies humaines financé par le Ministère de la recherche, de la technologie et du développement des compétences.

**BIBLIOGRAPHIE**

- ALONSO A., MARTIN P., ALBARRAN C., AQUILERA B., GARCIA O., GUZMAN A., OLIVA H., SANCHO M., 1997: Detection of somatic mutations in the mitochondrial DNA control region of colorectal and gastric tumors by heteroduplex and single-strand conformation analysis. *Electrophoresis* 18: 682–685.
- ANDERSON S., BANKIER A. T., BARRELL B. G., DE BRUIJN M. H. L., COULSON A. R., DROUIN J., EPERON I. C., NIERLICH D. P., ROE B. A., SANGER F., SCHREIER P. H., SMITH A. J. H., STADEN R., YOUNG I. G., 1981: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457–465.
- ANDREWS R. M., KUBACKA I., CHINNERY P. F., LIGHTOWLERS R. N., TURNBULL D. M., HOWELL N., 1999: Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics* 23: 147.
- AQUADERO C. F., GREENBERG B. D., 1983: Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* 103: 287–312.
- BANDELT H. J., ALVES S., GUIMARAÊS P. E. M., SANTOS M. S., BREHM A., PEREIRA L., COPPA A., LARRUGA J. M., SCOZZARI R., TORRONI A., PRATA M. J., AMORIM A., PRADO V. F., PENA D. J., 2002: Phylogeography of the human mitochondrial haplogroup L3e: A snapshot of African prehistory and Atlantic slave trade. *Annals of Human Genetics* 65: 549–563.
- BANDELT H. J., FORSTER P., SYKES B. C., RICHARDS M. B., 1995: Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics* 141: 743–753.
- CALAFELL F., UNDERHILL P., TOLUN A., ANGELICHENA D., KALAY-DJIEVA L., 1996: From Asia to Europe: Mitochondrial DNA sequence variability in Bulgarians and Turks. *Ann. Hum. Genet.* 60: 35–49.
- CANN R. L., BROWN R. L., WILSON A. C., 1984: Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics* 106: 479–499.
- CANN R. L., STONEKING M., WILSON A. C., 1987: Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325: 31–36.
- CAREW J. S., HUANG P., 2002: Mitochondrial defects in cancer. *Molecular Cancer* 9: 1–12.
- CRESPILLO M., LUQUE J. A., PAREDES M., FERNANDEZ R., RAMIREZ E., VALVERDE J. L., 2000: Mitochondrial DNA sequences for 118 individuals from northeastern Spain. *International J. of Legal Medicine* 114, 1-2: 130–132.
- DI RIENZO A., WILSON A. C., 1991: Branching pattern in the evolutionary tree for the human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 1597–1601.
- FRIGI S., YACOUBI B., PEREIRA F., PEREIRA L., AMORIM A., ELGAAIED A., 2006: mtDNA lineages in two Tunisian Berber communities: Comparing diversities between villages and towns. In: A. Amorim, F. Corte-Real, N. Morling (Eds.): *Progress in Forensic Genetics II*. Proceedings of the 21st International ISFG Congress, Ponta Delgada, The Azores, Portugal, 13–16 September 2005. Pp. 121–123. International Congress Series 1288. Elsevier Science, Amsterdam.
- HANDT O., MEYER S. ARNDT V. H., 1998: Compilation of human mtDNA control region sequences. *Nucleic Acids Research* 26, 1: 126–129.
- HORAI S., HAYASAKA N., 1990: Intraspecific nucleotide sequence difference in the major non-coding region of human mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.* 46: 828–842.
- KANG D., MIYAKO K., KAI Y., IRIE T., TAKESHIGE K., 1997: In vivo determination of replication origins of human mitochondrial DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *J. of Biological Chemistry* 272: 15275–15279.
- LEE D. Y., CLAYTON D. A., 1998: Initiation of mitochondrial DNA replication by transcription and R-loop processing. *J. of Biological Chemistry* 273: 30614–30621.
- LEE H. C., YIN P. H., LIN J. C., WU C. C., CHEN C. Y., WU C. W., CHI C. W., TAM T. N., WEI Y. H., 2005: Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1042: 109–122.
- LIU V. W., SHI H. H., CHEUNG A. N., CHIU P. M., LEUNG T. W., NAGLEY P., WONG L. C., NGAN H. Y., 2001: High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Research* 61: 5998–6001.
- MACAULAY V., RICHARDS M., HICKEY E., VEGA E., CRUCIANI F., GUIDA V., SCOZZARI R., BONNE-TAMIR B., SYKES B., TORRONI A., 1999: The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: A synthesis of control region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 232–249.
- MAXIMO V., SOARES P., SERUCA R., ROCHA A. S., CASTRO P., SOBRINHO-SIMÕES M., 2001: Microsatellite instability, mitochondrial DNA large deletions in gastric carcinoma. *Genes, Chromosomes & Cancer* 32: 136–143.
- NOMOTO S., YAMASHITA K., KOSHIKAWA K., NAKAO A., SIDRANSKY D., 2002: Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma. *Clinical Cancer Research* 8: 481–487.
- PARELLA P., SERIPA D., MATERA M. G., RABITTI C., RINALDI M., MAZZARELLI P., GRAVINA C., GALLUCCI M., ALTOMARE V., FLAMMIA G., CASALINO B., BENEDETTI-PANICI P. L., FAZIO V. M., 2003: Mutation of the D310 mitochondrial mononucleotide repeats in primary tumors and cytological specimens. *Cancer Letters* 190: 147–150.
- PARELLA P., XIAO Y., FLISS M., SANCHEZ-CESPEDES M., MAZZARELLI P., RINALDI M., NICOL T., GABRIELSON E., CUOMO C., COHEN D., PANDIT S., SPENCER M., RABITTI C., FAZIO V. M., SIDRANSKY D., 2001: Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates. *Cancer Research* 61: 7623–7626.
- PEREIRA L., PRATA M. J., AMORIM A., 2000: Diversity of mtDNA lineage in Portugal: not a genetic edge of European variation. *Ann. Hum. Genet.* 64: 491–506.
- PIERCY R., SULLIVAN K. M., BENSON N. B., GILL P., 1996: The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification. *International J. of Legal Medicine* 106: 85–90.
- POLYAK K., LI Y., ZHU H., LENGAUER C., WILSON J. K., MARKOWITZ S. D., TRUSH M. A., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1998: Somatic mutation of the mitochondrial genome in human colorectal tumors. *Nature Genetics* 20: 291–293.
- ROUSSELET F., MANGIN P., 1998: Mitochondrial DNA polymorphisms: a study of 50 French Caucasian individuals and application to forensic casework. *International J. of Legal Medicine* 111, 6: 292–308.
- SHARMA H., SINGH A., SHARMA C., JAIN S. K., SINGH N., 2005: Mutations in the mitochondrial D-loop region are frequent in cervical cancer. *Cancer Cell International* 5: 34.
- TAGLIABRACCI A., TURCHI C., BUSCEMI L., SASSAROLI C., 2001: Polymorphism of the mitochondrial DNA control region in Italians. *International J. of Legal Medicine* 114, 4-5: 224–228.
- TORRONI A., HUOPONEN K., FRANCALACCI P., PETROZZI

- M., MORELLI L., SCOZZARI R., OBINU D., SAVONTAUS M. L., WALLACE D. C., 1996: Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144: 1835–1850.
- TORRONI A., RENGÓ R., GUIDA V., CRUCIANI F., SELMITTO D., COPPA A., CALDERON F. L., SIMIONATI B., VALLE G., RICHARDS M., MACAULAY V., SCOZZARI R., 2001: Do the four clades of the mtDNA haplogroup L2 evolve at different rates? *Am. J. Hum. Genet.* 69: 1348–1356.
- TSENG L. M., YIN P. H., CHI C. W., HSU C. Y., WU C. W., LEE L. M. WEI Y. H., LEE H. C., 2006: Mitochondrial DNA mutation and mitochondrial DNA depletion in breast cancer. *Gene Chromosome Cancer* 45: 629–638.
- YIN P. H., LEE H. C., CHAU G. Y., WU Y. T., LI S. H., LIU W. Y., WEI Y. H., LIU T. W., CHI C. W., 2004: Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *British J. of Cancer* 90: 2390–2396.
- YU M., SHI Y., ZHANG F., ZHOU Y., 2008: Sequence variations of mitochondrial DNA D-loop region are highly frequent events in familial breast cancer. *J. of Biomedical Science* 15: 535–543.
- VIGILANT L., PENNINGTON R., HARPENDING H., KOCHER T.D., WILSON A.C., 1989: Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 9350–9354.
- WANG X., 2001: The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development* 15: 2922–2933.
- WU C. W., YIN P. H., HUNG W. Y., LI A. F., LI S. H., CHI C. W., WEI Y. H., LEE H. C., 2005: Mitochondrial DNA mutation and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. *Gene Chromosome Cancer* 44: 19–28.

Besma Yacoubi-Loueslati  
Département de Biologie  
Faculté des Sciences de Tunis  
Université ElManar  
2092 Manar II, Tunis, Tunisie  
E-mail: BYacoubi.Loueslati@fst.rnu.tn

Lotfi Cherni  
Sabeah Frigi  
Thouraya Baroudi  
Amel Ben Ammar El Gaaied  
Laboratoire de Génétique,  
Immunologie et Pathologies Humaines  
Faculté des Sciences de Tunis  
Université ElManar  
2092 Manar II, Tunis, Tunisie