



HAL
open science

Diagnostiquer un état de santé bucco-dentaire par une double approche macroscopique et métagénomique : application à une population rurale française du XVIIIe siècle

Claire Willmann

► To cite this version:

Claire Willmann. Diagnostiquer un état de santé bucco-dentaire par une double approche macroscopique et métagénomique : application à une population rurale française du XVIIIe siècle. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30001 . tel-02930274

HAL Id: tel-02930274

<https://theses.hal.science/tel-02930274>

Submitted on 4 Sep 2020

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Claire WILLMANN

Le 10 janvier 2020

**Diagnostiquer un état de santé bucco-dentaire par une double
approche macroscopique et métagénomique : application à une
population rurale française du XVIIIe siècle**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **ANTHROPOBIOLOGIE**

Unité de recherche :

AMIS - Laboratoire d'Anthropologie Moléculaire et Imagerie de Synthèse

Thèse dirigée par

Rémi ESCLASSAN et Catherine THEVES

Jury

Mme Sylvie MONTAL, Rapporteur

M. Michel SIGNOLI, Rapporteur

M. Michel RUQUET, Examineur

M. Philippe POMAR, Examineur

M. Rémi ESCLASSAN, Directeur de thèse

Mme Catherine THEVES, Co-directrice de thèse

Remerciements

Cette thèse est le résultat d'une collaboration multidisciplinaire fructueuse entre anthropologues, archéologues et chirurgiens-dentistes.

Je suis heureuse de pouvoir ici exprimer ma reconnaissance et ma gratitude à tous ceux qui y ont contribué.

A mon jury

A Monsieur **Philippe Pomar**, doyen, professeur des universités et praticien hospitalier.
Université Toulouse III, Paul Sabatier.

Je vous remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury, malgré vos obligations hospitalières et universitaires vous m'avez toujours prêté une oreille attentive. Merci également de m'avoir fait partager votre expérience hospitalière en Prothèse Maxillo-Faciale lorsque j'étais interne.

A Madame **Sylvie Montal**, rapporteur, professeur des universités et praticien hospitalier.
Université de Montpellier.

Je vous remercie très chaleureusement d'avoir accepté si spontanément de faire partie de ce jury de thèse. Merci également pour votre disponibilité et pour le temps que vous avez pris afin de me donner votre retour en tant que rapporteur.

A Monsieur **Michel Signoli**, rapporteur, professeur des universités, directeur d'unité Anthropologie Bio-culturelle, Droit, Ethique et Santé (ADES). Université d'Aix Marseille.
C'est un honneur pour moi de pouvoir vous compter parmi les membres de ce jury multidisciplinaire. Admirative de vos recherches, je tenais à vous exprimer ma gratitude pour votre implication et votre enthousiasme vis-à-vis de ce travail.

A Monsieur **Michel Ruquet**, examinateur, professeur des universités et praticien hospitalier.
Université d'Aix Marseille.

Merci d'avoir pris le temps de lire ce manuscrit et d'avoir accepté si spontanément de faire partie de ce jury multidisciplinaire.

A Madame **Elodie Cabot**, anthropologue INRAP (Institut National de Recherches Archéologiques Préventives).

Merci pour ton aide extrêmement précieuse, ton sérieux et ta gentillesse. Sans toi, ce travail n'aurait pas été possible.

A Monsieur **Xavier Mata**, ingénieur de recherche, laboratoire Anthropologie Moléculaire et Imagerie de synthèse (AMIS), UMR 5288 CNRS. Université Toulouse III, Paul Sabatier.

Merci pour ta disponibilité, ton soutien, ton aide et ta bienveillance qui dure depuis maintenant six ans.

A mes directeurs de thèse

A Madame **Catherine Thèves**, co-directrice de thèse, chargée de recherche, laboratoire Anthropologie Moléculaire et Imagerie de synthèse (AMIS), UMR 5288 CNRS. Université Toulouse III, Paul Sabatier.

Merci pour tes conseils avisés, ton sérieux et ton écoute toujours attentive. Merci de m'avoir fait confiance dès le master 1 et de m'avoir accueillie au laboratoire. Je suis très heureuse de t'avoir rencontrée et j'espère que nous pourrons continuer à collaborer par la suite.

A Monsieur **Rémi Esclassan**, directeur de thèse, maître de conférence des universités et praticien hospitalier. Université Toulouse III, Paul Sabatier.

Merci pour ton aide, ta disponibilité et tes nombreux encouragements durant ces années de thèse et celles qui les ont précédées. Merci de m'avoir fait connaître l'équipe du laboratoire AMIS.

« C'est le temps que tu as perdu pour ta rose qui fait ta rose si importante »

Antoine de Saint-Exupéry

Merci à Gabriel, ma famille, mes amis de m'avoir aidée à faire pousser cette rose-là. Je vous souhaite le meilleur.

Table des matières

Liste des figures	7
Liste des tableaux	9
Liste des abréviations	10
Glossaire	11
Introduction générale	13
Partie 1 : Etude bibliographique	18
Chapitre 1: Paléogénétique et paléogénomique	18
1.1) Introduction aux molécules anciennes	18
1.2) Les données chimiques reconnues de l'ADN ancien	21
1.2.1) Dégradation des échantillons	21
1.2.2) Présence d'inhibiteurs	22
1.3) Caractéristiques de la molécule d'ADN ancien et données démontrées par les techniques NGS	23
1.3.1) Lésions à l'origine de fragments ADN de petites tailles	24
1.3.2) Lésions entraînant une erreur de lecture et de séquençage	30
1.4) Contaminations	32
1.4.1) Contamination intrinsèque	33
1.4.2) Contamination lors des fouilles archéologiques	33
1.4.3) Contamination au laboratoire	33
1.5) Méthodes de décontamination	35
1.6) Critères d'authenticité pour le travail en ADN ancien	36
1.7) Les nouvelles techniques de séquençage. Principales étapes dans le séquençage New Generation Sequencing (NGS)	39

1.7.1) Préparation des échantillons	40
1.7.2) Extraction de l'ADN	40
1.7.3) Construction de librairies	41
1.7.4) Indexation de librairies double/ simple index	41
1.7.5) Approches de séquençage NGS	43
1.7.6) Séquençage utilisant la technologie Illumina	48
1.8) Analyse bio-informatique	50
1.8.1) Traitement des données brutes	52
1.8.2) Traitement des données secondaires	53
Chapitre 2 : Dent, parodonte, plaque et tartre dentaire. Pathologies bucco-dentaires.	59
2.1) La dent et le parodonte: caractéristiques	59
2.1.1) La dent	59
2.1.2) Le parodonte	61
2.2) Ecosystème buccal et pathologies bucco-dentaires	62
2.2.1) La plaque dentaire	62
2.2.2) Le tartre	64
2.3) Les pathologies bucco-dentaires	67
2.3.1) Maladie carieuse	67
2.3.2) Maladie parodontale ou parodontopathie	69
2.3.3) Lésion Inflammatoire Péri-radriculaire d'Origine Endodontique (LIPOE)	73
Chapitre 3 : Pathologies bucco-dentaires et sujets anciens	76
3.1) Méthodes d'investigations	76

3.1.1) Le tartre	76
3.1.2) Les caries	78
3.1.3) Les parodontopathies	81
3.1.4) Lésion inflammatoire péri-radriculaire d'origine endodontique (LIPOE)	84
3.2) Microbiomes retrouvés dans les pathologies bucco-dentaires chez les sujets archéologiques, la métagénomique "buccale".	89
3.2.1) Etat de l'art	89
3.2.2) Recommandations et critères à respecter concernant le travail en ADN ancien microbien	95
Partie 2 : Archéologie	98
Chapitre 1 : Contexte historique	98
1.1) La Vendée pendant la Révolution	100
1.2) L'Armée catholique et royale	101
1.3) La virée de Galerne	104
1.4) La Bataille du Mans	106
1.5) Le bilan humain des combats	108
Chapitre 2 : Données archéologiques et génétiques	110
2.1) Présentation générale des fosses	110
2.2) Présentation générale des sujets	117
Partie 3 : La méthodologie	121
3.1) Matériel	121
3.2) Méthode	122
3.2.1) Etat sanitaire bucco-dentaire dans cette population ancienne : étude générale morphologique et macroscopique.	122

3.2.2) Etude macroscopique et radiologique de six sujets centrée sur les maxillaires, mandibules et dents échantillonnées.	123
3.2.3) Décontamination et préparation des dents et des os, extraction de l'ADN ancien des échantillons.	125
3.2.4) Préparation des librairies et séquençage haut débit.	127
3.2.5) Analyse des séquences.	128
Partie 4 : Résultats et discussion	132
4.1) Tableau récapitulatif des résultats obtenus	134
4.2) La publication scientifique	136
Valorisation scientifique	155
Conclusion et perspectives	157
Annexes	160
Analyse de l'authenticité des séquences d'ADN endogènes anciennes (humaines et bactériennes) des échantillons avec mapDamage.	160
Liste des génomes bactériens utilisés pour le mapping	176
Statistiques concernant l'alignement des reads issus des échantillons dentaires par rapport à 11 génomes bactériens de référence.	177
Bibliographie	179

Liste des figures

Figure 1 : Graphique représentant l'augmentation du nombre d'articles portant sur l'ADN ancien entre 1984 et 2018	18
Figure 2 : Ruptures simple brin par hydrolyse.....	24
Figure 3 : Répartition selon la longueur.....	25
Figure 4 : Fréquence des bases nucléotidiques	26
Figure 5: Formation de dérivés hydantoïne.	28
Figure 6: Différents types de cross-links	29
Figure 7: Lésion hydrolytique des bases azotées	30
Figure 8: Distribution de la fréquence des substitutions.....	31
Figure 9: L'ADN endogène.....	32
Figure 10 : Préparation et indexation de librairie.....	42
Figure 11: Technique shotgun.....	44
Figure 12 : Capture ciblée des séquences d'intérêt	46
Figure 13: Amplification spécifique	48
Figure 14: Protocole Illumina	50
Figure 15: Traitement des données post-séquençage NGS.....	51
Figure 16 : Exemple de fichier Fastq.	52
Figure 17 : Représentation d'un fichier SAM/BAM	53
Figure 18: Différences dans la reconstruction de profils	57
Figure 19: Coupe transversale schématique d'une dent humaine	60
Figure 20: Coupe histologique	61
Figure 21: Tartre dentaire.....	65
Figure 22 : tartre dentaire	65
Figure 23 : Carie et plaque dentaire..	67
Figure 24: Gingivite	70
Figure 25 : Schéma d'un site atteint par une parodontite	70
Figure 26: Zones de récession parodontale.....	71

Figure 27: Radiographie rétroalvéolaire	74
Figure 28 : Recueil d'un échantillon de tartre dentaire.....	77
Figure 29 : Caries occluso-mésiale et occluso-distale	78
Figure 30 : Radiographie rétro-alvéolaire d'une carie dentaire	79
Figure 31 : Forte abrasion	80
Figure 32 : Déhiscence osseuse.....	82
Figure 33 : Eruption dentaire continue.....	82
Figure 34 : Cavités de granulome/kyste.....	86
Figure 35 : Fenestration osseuse non pathologique	86
Figure 36 : Caractéristiques d'un granulome	88
Figure 37 : Changements au niveau du microbiome oral	90
Figure 38 : Reconstruction du génome de <i>Tannerella forsythia</i>	92
Figure 39 : Regroupement UPGMA* des distances de Bray-Curtis*	94
Figure 40 : Carte de la Vendée Militaire.....	101
Figure 41 : Henri de la Rochejaquelin	102
Figure 42 : Carte représentant le parcours de la virée de Galerne	104
Figure 43 : Théâtre des opérations de la bataille du Mans.....	107
Figure 44 : Site archéologique et emplacement des fosses.....	110
Figure 45 : Charniers 8 et 9 en cours de fouilles.....	111
Figure 46 : Fiche de démontage individuelle vierge.....	112
Figure 47 : a) Boutons à queue en verre et métal retrouvés dans la fosse	113
Figure 48 : a) Entaille profonde résultant d'un coup tranchant	116
Figure 49: Examen macroscopique et radiologique du sujet 213	133
Figure 50 : Poster présenté	156

Liste des tableaux

Tableau 1 : Cooper et Poinar (2000). Ancient DNA: do it right or not at all.....	34
Tableau 2 : Classification et photos, Kerr 1988.....	82
Tableau 3 : Recommandations de Warinner et collègues.....	95
Tableau 4 : Principales caractéristiques des fosses.....	113
Tableau 5 : Recrutement funéraire des fosses.....	116
Tableau 6 : Récapitulatif des sujets échantillonnés.....	123
Tableau 7 : Récapitulatif des signes infectieux bucco-dentaires observés au niveau macroscopique et des bactéries mises en évidence par séquençage shotgun	133

Liste des abréviations

A : adénine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNa : acide désoxyribonucléique ancien

ARN : acide ribonucléique

ARNr : acide ribonucléique ribosomique

C : cytosine

CBCT: Cone Beam Computed Tomography

EDTA: ethylenediaminetetracetic acid

G : guanine

LIPOE : Lésion Inflammatoire Péri-radriculaire d'Origine Endodontique

NGS: Next Generation Sequencing

OTU: Operative Taxonomic Unit

Pb : paires de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEA : Pellicule Exogène Acquise

PEC : primer extension capture

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

T : thymine

Glossaire

Les termes définis dans le glossaire sont rappelés par un astérisque (*) dans le texte lors de leur première apparition.

ADN mitochondrial : ADN présent dans les mitochondries, sous forme de chromosome circulaire.

Attrition : usure due au frottement dent contre dent.

Brin forward : brin sens, orienté 5'>3', c'est le brin répliqué par l'ARN polymérase.

Brin reverse : brin anti-sens, orienté 3'>5', servant de brin matrice à l'ARN polymérase pendant la réplication.

Diagenèse : processus physico-chimiques intervenants après la mort de l'organisme et entraînant des modifications de structure et de composition.

Distances de Bray-Curtis : variable utilisée pour définir la dissimilarité entre deux échantillons au niveau des espèces présentes sur chacun des deux échantillons. Elle varie de 0 : les deux échantillons ont la même composition, à 1 : les deux échantillons n'ont aucune espèce en commun.

Fichier Fastq : fichiers informatiques permettant de représenter les séquences et leurs scores de qualité.

Fragments d'ADN à bouts cohésifs : extrémités simples brins complémentaires appartenant à des fragments d'ADN doubles brins et pouvant s'apparier.

Gènes de ménage : il s'agit de gènes nécessaires au fonctionnement des cellules, ils sont non régulés et exprimés par toutes les cellules.

Gènes orthologues : il s'agit de deux séquences génétiques identiques présentes chez deux espèces différentes.

Haplotype : groupe d'allèles situés sur un même chromosome et transmis ensemble. Les haplotypes sont regroupés en différents haplogroupes en fonction des polymorphismes qu'ils présentent. En génétique des populations humaines, on étudie souvent les haplogroupes mitochondriaux (maternels) et le chromosome Y (paternels) pour retracer des lignées de population.

Human Microbiome Project : Projet initié par le National Institutes of Health (NIH) visant à identifier et caractériser l'ensemble des micro-organismes (microbiotes) vivant en association avec les humains.

In silico : recherches réalisées grâce à des modèles informatiques.

OTU : Operative Taxonomic Unit, désignant un groupe d'organismes présentant des similarités de séquences ADN pour un gène donné.

Septum (pl : septa) interdentaire : paroi fine et pointue d'os alvéolaire séparant les racines de deux dents voisines.

Transposon : séquence d'ADN mobile capable de se déplacer de façon autonome sur un même brin d'ADN ou un autre brin.

UPGMA : (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) algorithme destiné à la construction d'un arbre phylogénétique.

Introduction générale

Les pathologies bucco-dentaires comptent actuellement parmi les maladies infectieuses les plus répandues au monde touchant à la fois les pays développés et les pays en voie de développement (1, 2). Ainsi, les caries dentaires touchent de 60% à 90% des enfants et la quasi-totalité des adultes (91%-92% en Europe et aux Etats-Unis), représentant la première cause de douleurs et de pertes dentaires au niveau de la cavité buccale (1, 3, 4). De plus, les caries profondes atteignant la pulpe sont la première cause d'infections péri-apicales. Quant aux parodontites chroniques sévères, elles touchent de 5% à 20% de la population à travers le monde, entraînant inflammation, récession osseuse et gingivale, parfois en lien avec d'autres maladies chroniques, comme le diabète par exemple (2, 5).

Les populations du passé étaient également victimes de ces affections, visibles au niveau macroscopique et radiologique sur les collections dentaires archéologiques (6). En effet, les dents et plus particulièrement l'émail dentaire, de par leur structure fortement minéralisée, conservent les stigmates des processus carieux ayant affecté les sujets de leur vivant (7). Les os des maxillaires, bien que moins résistants, permettent également d'évaluer l'état parodontal des sujets anciens ainsi que la présence éventuelle de processus infectieux endo-osseux.

L'anthropologie dentaire trouve son origine dans une subdivision de l'anthropologie physique. Elle se base sur l'observation morphologique (macroscopique et microscopique), pouvant être aujourd'hui complétées par des techniques d'imagerie (radiographie, scanner).

Les dents présentent une variabilité importante liée à la fois à des critères génétiques et environnementaux (8, 9).

La morphologie, la taille des couronnes et des racines, ainsi que la formule dentaire sont sous contrôle génétique (9). Leur étude permet d'appréhender les relations inter populationnelles ainsi que les dynamiques évolutives (8). Les facteurs environnementaux vont avoir quant à eux

une influence sur l'usure, la présence de tartre, de pathologies (caries, abcès, parodontopathies) ou certaines modifications de l'émail et de la dentine par exemple (9). Ces éléments permettent d'avoir accès au type d'alimentation, à l'état de santé ainsi qu'aux stress environnementaux (9). Les dents peuvent également présenter des modifications volontaires, renseignant alors sur certaines caractéristiques culturelles des populations (10).

Les prémices de la discipline remontent à 1870 quant J.H. Mummery (1809-1885) propose le premier travail archéologique sur une grande quantité de dents anciennes, regroupant 442 sujets préhistoriques et historiques issus des cinq continents. Il enregistre l'usure, l'attrition*, la formule dentaire et répertorie les caries et leur localisations (11). Il constate des différences concernant l'atteinte carieuse des différentes populations mais les attribue à une mauvaise santé générale du sujet et à une pénurie alimentaire durant l'enfance, sans établir de rapport avec la consommation de carbohydrates (12).

Le terme « d'anthropologie dentaire » apparaît pour la première fois en 1900 dans le titre d'un article de Buschan mais c'est Dahlberg dans les années 1940 qui va donner son élan à l'anthropologie dentaire actuelle en adaptant, entre autre, les concepts de morphogenèse dentaire des mammifères à la dentition humaine (13).

Dans les années 1950, les études se concentrent sur la compréhension des caractères héréditaires à l'origine des variations morphologiques corono-radiculaires ainsi que sur les variations possibles de la formule dentaire (12). Ainsi les travaux de Pedersen (1949), sur les Eskimos de l'est du Groenland, et de Moorrees (1957) sur les Aleuts, en font les deux populations les mieux décrites du point de vue bucco-dentaire (14, 15). Les échelles d'évaluations s'harmonisent grâce notamment aux moulages en plâtre proposés par Dahlberg (1956), permettant de comparer les mesures effectuées à des standards, et aux travaux de Murphy (1959), qui mets au point une échelle précise d'évaluation de l'attrition basée sur l'exposition dentinaire (12, 16).

L'ouvrage « Dental Anthropology », publié en 1963 et regroupant une série d'articles, définit pour la première fois l'anthropologie dentaire comme une discipline à part entière de l'anthropologie physique et en décrit les champs d'investigation (17). On constate à ce moment-là un essor de la discipline qui s'intensifie encore avec l'arrivée de l'informatique dans les années 1980. Beaucoup de travaux s'orientent alors vers des modèles de peuplement et sur l'adaptabilité de la dent et du microbiome oral face à l'environnement (stress, changements de régimes alimentaires et modes de subsistance par exemple) (18-23).

Grâce à l'avènement de la paléogénétique, à partir des années 1980 (voir 1.1) puis à son développement dans les années 2006-2010, avec notamment les techniques de séquençage haut débit, Next Generation Sequencing (NGS, voir 1.1 pour plus de détails), les connaissances en anthropologie dentaire se sont enrichies d'informations précises concernant le régime alimentaire des populations anciennes, leurs modes de vie et les pathogènes dentaires qui leurs étaient associés. Ainsi, en 2013 et 2014, dans deux études pionnières, Adler et al. et Warriner et al. ont proposé une approche de recherche très nouvelle, considérant le tartre ancien comme un support fossile, permettant un enregistrement biologique du mode de vie, de l'alimentation et de l'état de santé d'un individu mais aussi d'une population (24, 25). Ces deux études presque concomitantes ont mis en évidence pour la première fois des changements dans la composition du microbiome buccal humain en rapport avec les grands changements de mode de vie ayant eu lieu au cours de l'histoire de l'Homme (24, 26). Une diminution de la diversité bactérienne ainsi qu'une augmentation du nombre de taxa associés aux caries et aux maladies parodontales ont été observées entre les populations de chasseurs-cueilleurs et les populations du Néolithique, ces dernières consommant plus de céréales et donc plus de glucides que les précédentes. Une autre modification dans la composition du microbiome oral se serait produite au moment de la révolution industrielle, correspondant à l'introduction de sucres raffinés et transformés mécaniquement dans l'alimentation (24). Les études d'Adler et Warinner, pointant

de possibles changements de composition ou de diversité du microbiome oral, ont ouvert la voie à une “archéologie microbienne du tartre” (24, 26, 27).

Dans ce contexte, je me suis intéressée à partir de mon master 1 aux pathologies bucco-dentaires chez les sujets archéologiques et aux modes de vie et d'alimentation des populations du passé, ainsi qu'à la transmission et à l'évolution des pathogènes oraux au cours du temps. En complément de la vision clinique odontologique inhérente à mon métier, il m'a paru intéressant pour un chirurgien-dentiste de connaître l'histoire des maladies que nous traitons au quotidien. Quels facteurs ont influencé la composition du microbiome oral humain? Peut-on parler de coévolution des pathogènes bucco-dentaires en réponse aux changements successifs ayant eu lieu au cours des temps? Notre mode de vie a-t-il favorisé la prolifération d'agents pathogènes?

Cette thèse s'inscrit donc dans une approche pluridisciplinaire alliant la paléogénomique, l'odontologie et l'archéologie pour essayer de comprendre comment les pathogènes bucco-dentaires ont pu affecter les populations anciennes et ont évolué avec elles. Ce travail a été réalisé au laboratoire d'Anthropologie Moléculaire et d'Imagerie de Synthèse (AMIS, UMR 5288 CNRS) à Toulouse, en partenariat avec la faculté de chirurgie dentaire de Toulouse, l'Institut Français pour la Recherche Odontologique (IFRO) ainsi que l'Institut National de Recherches Archéologiques Préventives (INRAP), Grand-Ouest. Il a donné lieu à une publication internationale dans la revue Plos One en mai 2018 : « Oral health status in historic population: Macroscopic and metagenomic evidence ».

Les objectifs de ce travail étaient d'abord d'identifier, dans un échantillon d'une population du XVIIIe siècle de l'Ouest de la France, les sujets présentant des pathologies bucco-dentaires spécifiques : caries dentaires; parodontopathies et Lésions Inflammatoires périradiculaires d'Origine Endodontique (LIPOE). Nous avons ensuite voulu caractériser la flore orale de ces sujets au niveau taxonomique puis déterminer s'il était possible, à partir d'une dent saine, de

mettre en évidence la présence de bactéries pathogènes orales impliquées dans les LIPOE, les caries et les parodontopathies.

Ce manuscrit s'articule autour de quatre grandes parties: la première partie fait le point sur la paléogénétique, la paléogénomique et les pathologies bucco-dentaires. La deuxième partie resitue le contexte historique ainsi que les découvertes archéologiques réalisées sur le site du Mans lors de fouilles préventives réalisées en 2009-2010, support du matériel étudié dans cette thèse (28). La troisième partie détaille la mise au point et la réalisation des protocoles expérimentaux. La dernière partie présente les résultats obtenus, leurs interprétations et discussions ainsi que la publication scientifique.

Partie 1 : Etude bibliographique

Chapitre 1: Paléogénétique et paléogénomique

1.1) Introduction aux molécules anciennes

La paléogénétique s'intéresse à la détection et l'analyse des molécules d'ADN* anciennes, ces molécules ADN étant les bases constitutives du génome de tous les êtres vivants sur Terre, plus ou moins conservées et présentes dans les échantillons archéologiques. Les premières études paléogénétiques remontent au milieu des années 1980 quand Higuchi et collègues (1984) parviennent à cloner et séquencer un fragment d'ADN mitochondrial* de 229 paires de bases (pb) issu d'un spécimen de musée, *Equus quagga*, une sous espèce éteinte de zèbre (29). Ces travaux pionniers ont ouvert la voie à la discipline qui compte actuellement 4826 articles (source PubMed au 25/05/2019), et est en progression constante (**figure 1**).

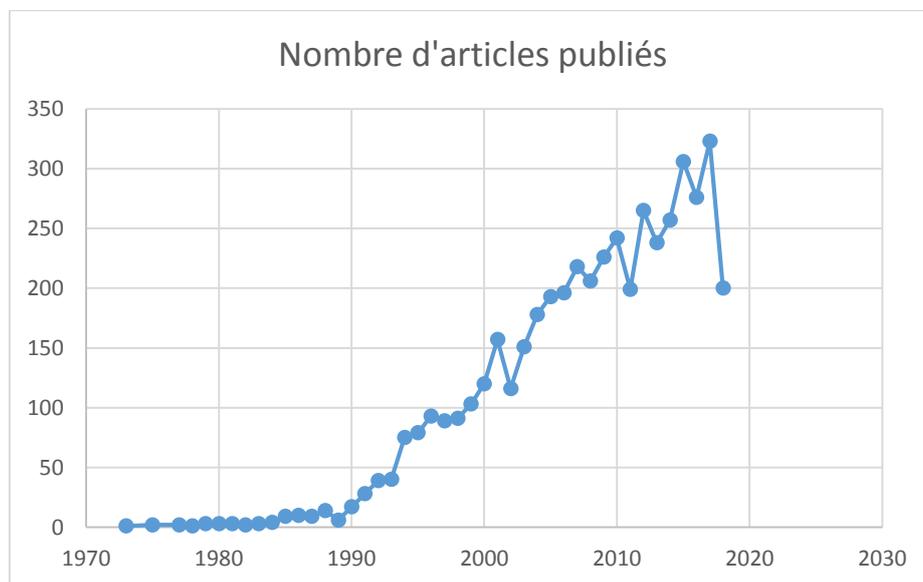


Figure 1 : Graphique représentant l'augmentation du nombre d'articles portant sur l'ADN ancien entre 1984 et 2018. Source PubMed avec la requête « ancient [All Fields] AND "dna"[MeSH Terms] OR adna [All Fields] ».

L'avènement de la Polymerase Chain Reaction (PCR), mise au point par Mullis (30) a été à l'origine de l'essor de la génétique en permettant l'amplification de molécules ADN, c'est à

dire la reproduction à l'identique de la succession des bases constitutives d'une séquence sur un gène, la rendant ainsi détectable et lisible. En ce qui concerne l'application de la PCR sur des restes anciens, elle a été utilisée pour la première fois par Pääbo en 1988 (31) signant ainsi l'acte de naissance de la paléogénétique (nommée ainsi car elle s'intéresse aux gènes anciens). Au fur à mesure des études, des expériences et des erreurs inhérentes à une nouvelle ère de recherche et à l'acquisition de données, les paléogénéticiens ont montré qu'un échantillon dit "ancien" présentait des concentrations faibles de molécules ADN ainsi que des fragments ADN de petites tailles. Ces propriétés sont liées à la dégradation au cours du temps et à l'enfouissement (32) et nécessitent des protocoles stricts pour éviter les contaminations lors des manipulations (33, 34). La PCR devient rapidement la technique de choix en ADN ancien (ADNa) et est appliquée à l'étude de tissus humains, animaux et à des fossiles de plantes ou d'insectes âgés de plusieurs milliers d'années (34). Cependant, elle demeure controversée dans certains domaines comme l'étude des pathogènes humains par exemple (35, 36). Par ailleurs, la reconstruction de génomes nucléaires humains ou bactériens complets (soit 3000 à 4 milliards de paires de bases) reste hors de portée avec ces techniques car elles sont trop demandeuses en termes d'échantillon, de temps et de coût.

Dès 2005, les premières approches techniques de séquençage haut débit « Next Generation Sequencing » (NGS) ont permis de dépasser ces limitations et d'analyser simultanément des milliards de séquences en parallèle et en quelques jours, ouvrant le champ de la paléogénomique ou métagénomique (nommée ainsi parce qu'elle n'accède plus seulement aux gènes, mais au génome) (37-39). De plus, des méthodes d'extraction et de traitement des molécules ADN ont été développées pour améliorer l'accès aux molécules d'ADNa des échantillons archéologiques. Du fait du séquençage (lecture base par base de la molécule ADN) par NGS de millions voire de milliards de molécules ADN, des outils bio-informatiques ont dû être mis au point et constamment améliorés pour traiter les données, appelées Big Data. Certains sont de

plus optimisés pour prendre en compte les caractéristiques spécifiques de données d'ADN ancien (40). En 2008, Miller et collègues ont reconstruit pour la première fois le génome nucléaire d'une espèce éteinte datant d'environ 20 000 ans : le mammouth à poil laineux (41). Dans cette étude, 80% des séquences identifiées provenaient de mammouth et couvraient environ 70% du génome (41). Le premier séquençage d'un paléo-génome nucléaire humain date de 2010 (42). Il s'agit d'un Esquimau, de culture Saqqaq, qui vivait au Groenland il y a environ 40 000 ans. Les séquences obtenues couvrent 79% du génome (42). En 2010, Green et collègues ont publié les premières séquences issues de Neandertal composées de plus de 4 milliards de nucléotides provenant de trois individus différents et ont ouvert la voie à l'étude des hominidés archaïques (37, 43). Jusqu'ici limitées au Pléistocène supérieur, les frontières temporelles de la paléogénomique ont été repoussées en 2013, lorsque Orlando et collègues ont séquencé un génome de cheval à partir d'un échantillon osseux datant du Pléistocène moyen (560 000 à 780 000 ans) préservé dans le permafrost (44). La même année, Dabney et collègues ont publié le génome mitochondrial complet d'un ours des cavernes daté d'environ 400 000 ans (21). En 2014, Meyer et collègues ont reconstruit le génome mitochondrial quasi complet d'un hominidé archaïque de Sima de los Huesos (430 000 ans) et ont publié en 2016 des séquences d'ADN nucléaire de ce même sujet (45, 46). La paléogénomique a également permis de caractériser les génomes d'agents pathogènes anciens comme *Yersinia pestis*, responsable de la Peste Noire ou d'analyser des écosystèmes entiers tels que le microbiome oral (25, 47). En 2013 et 2014, Adler et Warinner ont mis en évidence des pathogènes bucco-dentaires anciens préservés dans le tartre dentaire de sujets fossiles et ont reconstruit les microbiomes oraux commensaux et pathogènes présents chez ces sujets ainsi que leur évolution en fonction des grandes transitions de modes de vie de l'Homme moderne (24, 25).

1.2) Les données chimiques reconnues de l'ADN ancien

L'étude de l'ADN ancien présente des difficultés liées à la fois à l'état de conservation des échantillons, la présence d'inhibiteurs et de contaminants exogènes (34, 48, 49).

1.2.1) Dégradation des échantillons

Les processus de dégradation de l'ADN ancien sont inévitables, du fait de la mort biologique de l'organisme, de son enfouissement, etc... Cependant certains facteurs environnementaux influent sur la conservation du corps en accélérant ou ralentissant ces processus. Quel que soit le milieu, la conservation sera meilleure si les variations physico-chimiques sont les plus faibles possibles. Les types de dommages subis par l'ADN ancien varieront également en fonction du milieu de conservation (34, 50).

Un milieu froid diminue l'activité des enzymes endogènes et exogènes. Ainsi l'ADN sera mieux conservé dans un environnement de type permafrost ou des grottes d'altitude où il sera également préservé du rayonnement UV (44, 50-53).

Tant que les tissus ne seront pas complètement déshydratés, les réactions d'hydrolyse vont se poursuivre. Un milieu sec va limiter le phénomène de fragmentation tandis qu'un milieu humide sera permissif pour les réactions d'hydrolyse et la putréfaction (50, 54). De plus, la dessiccation après la mort ou l'adsorption de l'ADN à une matrice minérale peuvent limiter les processus de dégradation enzymatiques et microbiens (55, 56).

Les milieux hypoxiques comme les tourbières diminuent les réactions d'oxydation ainsi que l'activité des micro-organismes aérobies. Elles possèdent également des concentrations de minéraux importantes et un pouvoir tampon élevé (57, 58)

1.2.2) Présence d'inhibiteurs

Les molécules d'ADN ancien peuvent être co-extraites avec des substances inhibitrices interférant avec la PCR, empêchant toute amplification. Certaines de ces substances sont dérivées des composants du sol : acide humique, acide fulvique, tannins. D'autres sont dérivées de l'organisme lui-même : résidus porphyriques, collagène I, urée, etc (50, 59-61).

1.3) Caractéristiques de la molécule d'ADN ancien et données démontrées par les techniques NGS

Schématiquement, on peut séparer les dommages de l'ADN ancien en deux groupes : les lésions à l'origine de fragments de petite taille et les lésions à l'origine d'erreurs de séquençage (62). Certaines de ces lésions moléculaires comme la dépurination, la désamination des cytosines et les ruptures de brin constituent une « signature » *post-mortem* permettant d'attester de l'ancienneté des échantillons (40). Cette « signature » est retrouvée dans tous les types d'échantillons anciens (résidus squelettiques, tartre dentaire, plantes, etc.) dans des proportions variables en fonction du milieu de conservation (26, 63). Chez le sujet vivant, l'intégrité de l'ADN est maintenue par des processus enzymatiques de réparation, venant contrebalancer les agressions subies. Après la mort, ces processus de réparation cessent, laissant le champ libre aux lésions (55).

1.3.1) Lésions à l'origine de fragments ADN de petites tailles

- **Hydrolyse des liaisons phosphodiester**

La molécule ADN est structurée base après base grâce à des liaisons phosphodiester entre les sucres (désoxyribose) et les phosphates. Après la mort, on assiste rapidement à des phénomènes d'autolyse avec rupture des membranes cellulaires et libération dans le milieu d'enzymes lysosomiques dont les nucléases, appartenant à la famille des hydrolases (50, 55). Les liaisons phosphodiester vont être hydrolysées, aboutissant à des clivages dans la molécule (endonucléases) et à la réduction de la taille des fragments (exonucléases) (**figure 2**).

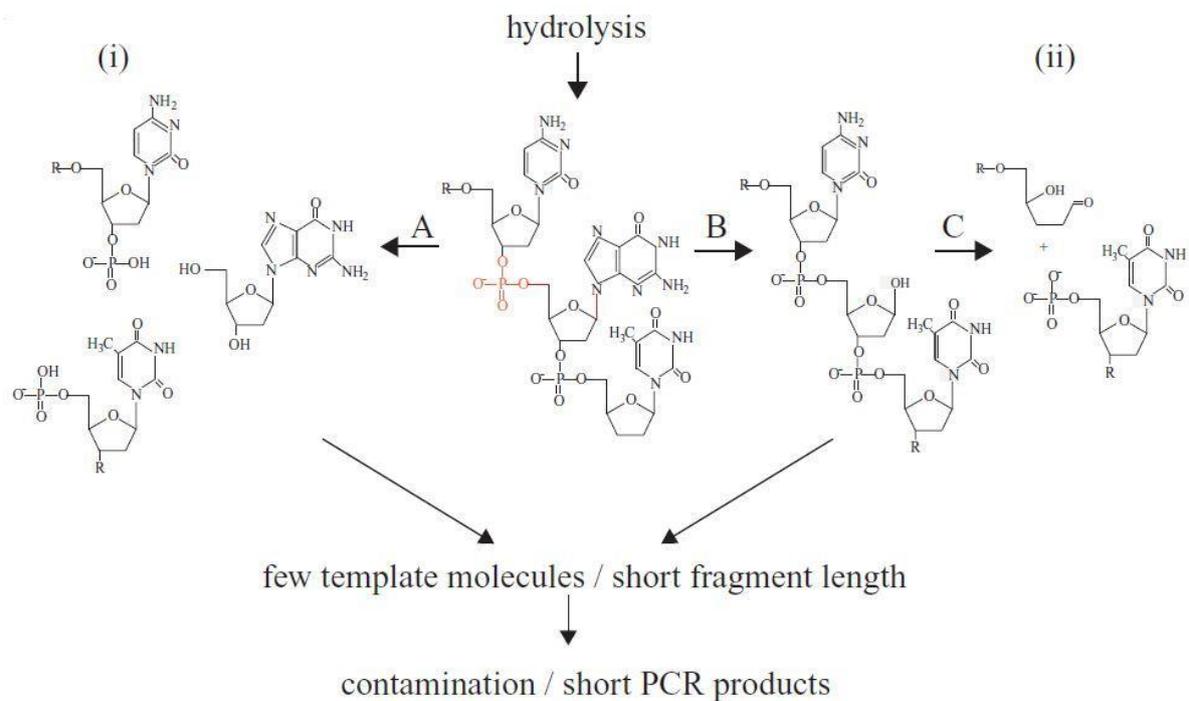


Figure 2 : Ruptures simple brin par hydrolyse (i) rupture directe des liaisons phosphodiester (A) ; (ii) dépurination générant un site abasique (B) suivie de la rupture de la chaîne osidique (C). (D'après Cooper 2004).

Ce phénomène de dégradation est accentué par la putréfaction induite par certains micro-organismes saprophytes et invertébrés présents dans l'environnement (50, 54, 64). Ces processus entraînent des ruptures simples et doubles brins et réduisent ainsi la quantité d'ADN disponible dans les échantillons ainsi que sa taille. Ainsi, la majorité des molécules anciennes

se situe entre 40 et 100 paires de bases, certaines pouvant atteindre 500 paires de bases (**figure 3**) (40, 50, 55, 65).

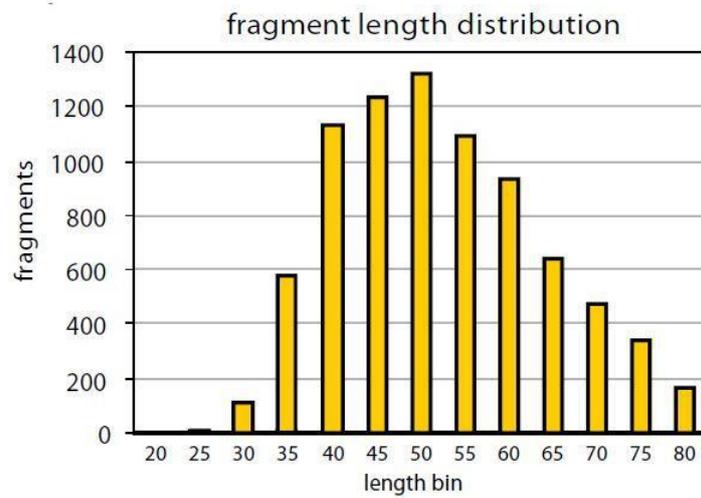


Figure 3 : Répartition selon la longueur des fragments d'ADN mitochondrial, séquencés par NGS, d'un sujet appartenant au groupe des premiers humains modernes (30 000 ans) (D'après Krause 2010).

- **Hydrolyse des liaisons N-glycosidiques et dépurination**

Les réactions d'hydrolyse peuvent également toucher les liaisons N-glycosidiques entre nucléotide et désoxyribose générant ainsi des sites abasiques et effaçant une partie de l'information génétique. La dépurination est plus fréquente que la dépyrimidination. Ces sites créent une instabilité structurelle dans la molécule d'ADN et potentialisent les ruptures simples brins (51).

Dépurination (figures 2 et 4)

Sur un échantillon d'ADN ancien, on observe que les purines sont sous-représentées aux endroits adjacents aux ruptures de brins (50, 55, 64, 66-69). Pour les échantillons datant de moins d'un siècle, on observe préférentiellement une perte des adénines alors que pour des échantillons beaucoup plus anciens, les guanines seront préférentiellement perdues, ce qui suggère deux dynamiques indépendantes dans le processus de dépurination (**figure 4**) (63).

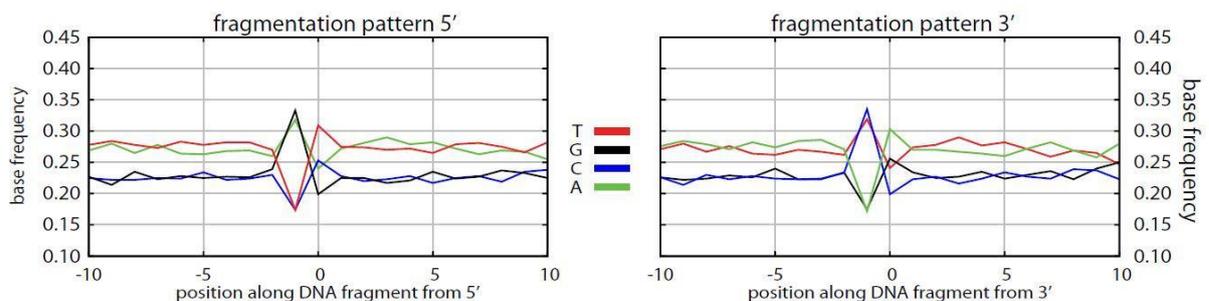


Figure 4 : Fréquence des bases nucléotidiques présentes aux extrémités 5' et 3' des brins dans une librairie NGS construite à partir de fragments ADN mitochondriaux d'un sujet appartenant au groupe des premiers humains modernes. Les purines sont retrouvées en plus grand nombre aux extrémités 5' et les pyrimidines aux extrémités 3', indiquant une rupture préférentielle des brins au niveau des bases puriques (Krause 2010).

- **Blocage de la Taq polymérase**

La Taq polymérase est une enzyme qui permet in vivo la réplication de l'ADN et qui est utilisée in vitro dans les techniques de PCR et de séquençage. Des lésions de type modifications nucléotidiques et cross-links empêchent la progression de la Taq Polymérase le long du brin matrice (51).

Oxydation des pyrimidines

Elle est induite par des radicaux libres oxygénés ($\cdot O_2$; $\cdot OH$) et par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), générés entre autres par les radiations de l'environnement lors de la mort cellulaire ou de l'organisme entier (55). Ces radicaux peuvent former des lésions bloquantes pour la Taq polymérase en produisant des dérivés hydantoïne (5-hydroxy-5-méthylhydrantoïne ; 5-hydroxyhydantoïne) et favoriser la création de séquences chimères lors de l'amplification par PCR, un phénomène appelé « jumping PCR » (**figure 5**) (34, 51, 62, 70). Ce déficit marqué de pyrimidines s'observe dans l'ADN ancien et il est estimé qu'une base sur 10 est ainsi oxydée (50).

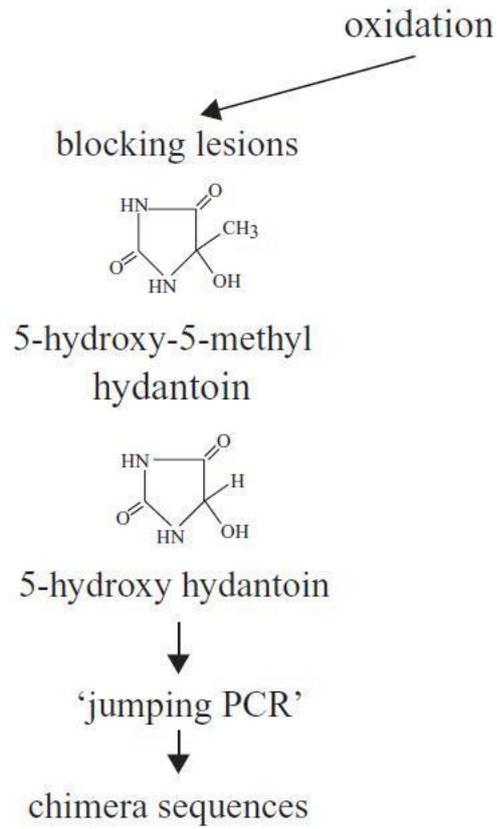


Figure 5: Formation de dérivés hydantoïne bloquant l'amplification par la polymérase et favorisant la création de séquences chimères par « jumping PCR » (Cooper 2004).

Cross-links (figure 6)

Ils peuvent se produire entre les brins d'un même ADN (alkylation) ou de plusieurs ADN différents et /ou protéines (réaction de Maillard) (51, 55, 64).

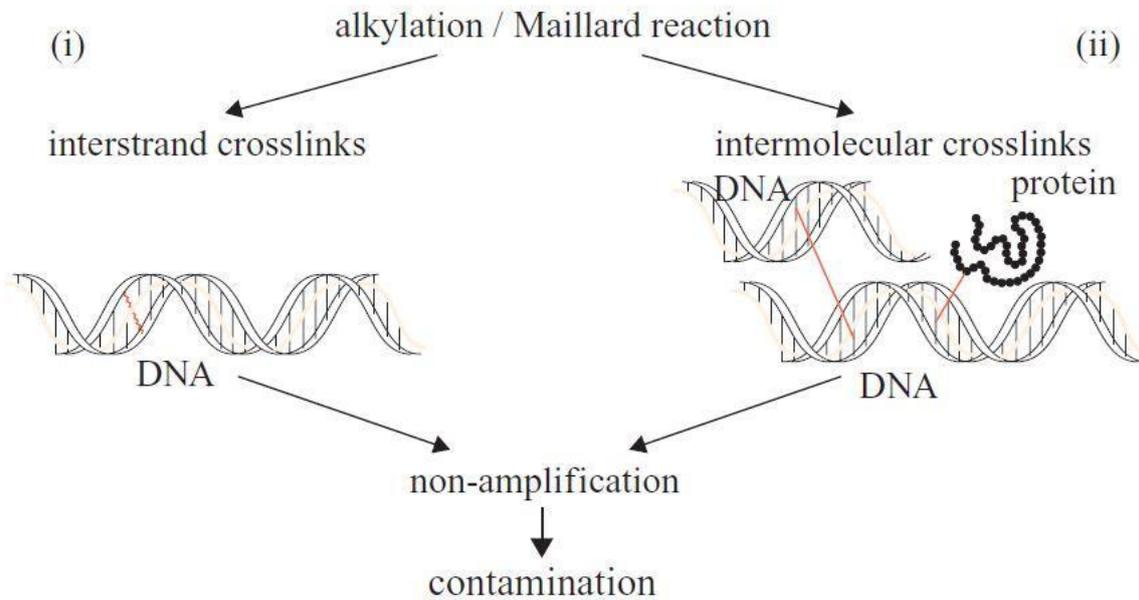


Figure 6: Différents types de cross-links : (i) cross-link entre les brins d'un même ADN par alkylation ; (ii) cross-links entre molécules dus à la réaction de Maillard. (Cooper 2004).

1.3.2) Lésions entraînant une erreur de lecture et de séquençage par la suite.

- **Désamination**

Il s'agit de la perte par hydrolyse du groupement amine des bases adénine et cytosine, formant respectivement des molécules d'hypoxanthine et d'uracile (**figure 7**) (71). La désamination est à l'origine d'erreurs dans l'incorporation des nucléotides lors de l'amplification d'ADN par une polymérase (55). Les cytosines sont les bases les plus touchées par ce phénomène (66, 71).

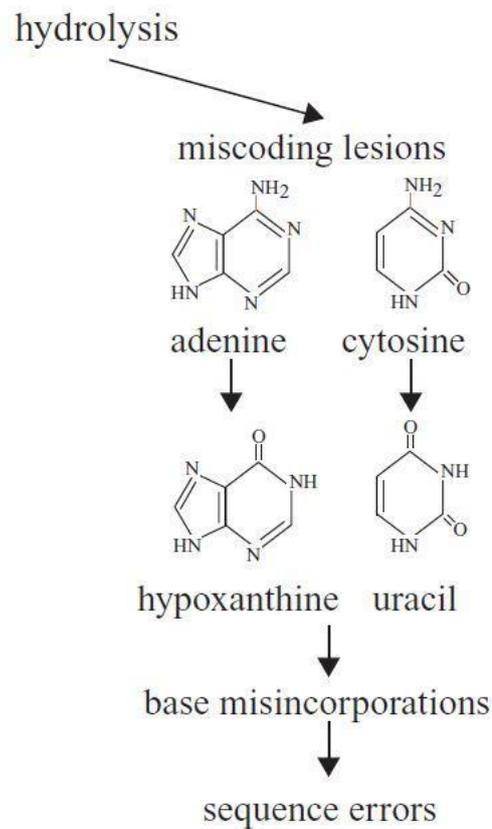


Figure 7: Lésion hydrolytique des bases azotées adénine et cytosine transformées respectivement en hypoxanthine et uracile et entraînant une erreur lors de l'amplification par une polymérase (Cooper 2004).

Désamination des cytosines

Avec la dépurination et les coupures de brins, la désamination des cytosines fait partie des lésions les plus fréquentes affectant l'ADN ancien (26). Ce phénomène se produit préférentiellement au niveau des extrémités 3' et 5' de la molécule, deux fois plus fréquemment sur l'ADN simple brin que sur l'ADN double brin (**figures 7 et 8**) (40, 48, 51, 68). L'accumulation de cytosines désaminée entraîne une transition C > T dans la séquence finale, une transition G > A sur le brin complémentaire et ainsi une erreur de codage (34, 68). Ce phénomène est utilisé comme critère d'authenticité pour attester de l'ancienneté des séquences, le taux de désamination des cytosines augmentant avec l'âge de l'échantillon. Il est également modulé par la température : une température élevée favorisant le processus (72).

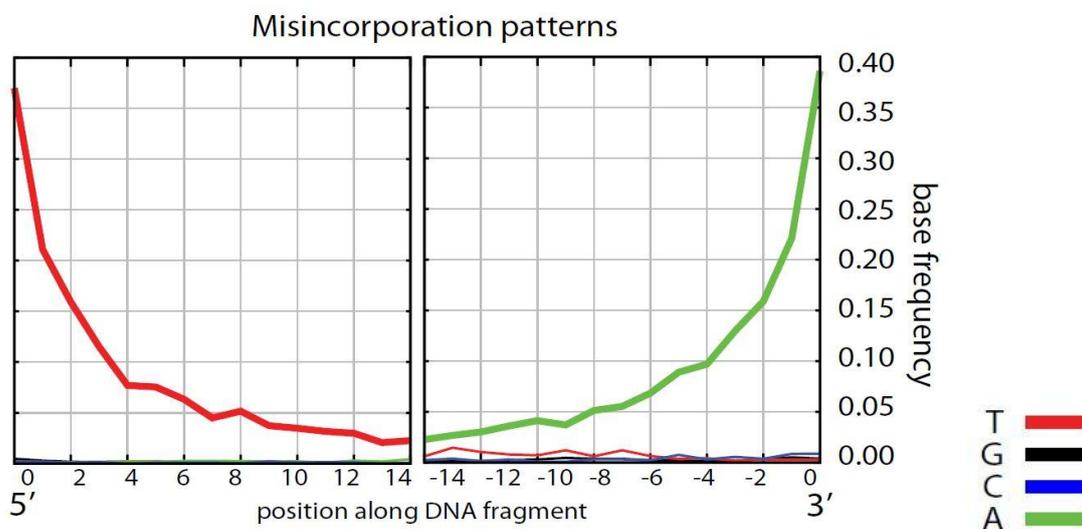


Figure 8: Distribution de la fréquence des substitutions sur des fragments d'ADN ancien mitochondrial, issus d'une librairie NGS, d'un sujet appartenant au groupe des premiers humains modernes (Krause 2010).

1.4) Contaminations

Dans un échantillon ancien, la fraction subsistante d'ADN endogène représente généralement 1% à 6% de l'ADN total de l'échantillon, 94% à 99% provenant donc de contaminants extérieurs selon le support biologique utilisé (37, 62). Green et collègues (2006) ont montré lors de l'amplification et du séquençage NGS de l'ADN nucléaire néandertalien, que le pourcentage de séquences endogènes issu de l'échantillon est seulement de 6%, le reste des séquences correspondant à des bactéries du sol, liées à l'enfouissement ou à des séquences dégradées ne pouvant être identifiées (**figure 9**). De ce fait, tout apport d'ADN moderne exogène, mieux préservé, est susceptible d'entrer en compétition avec les fragments anciens lors de l'amplification (50).

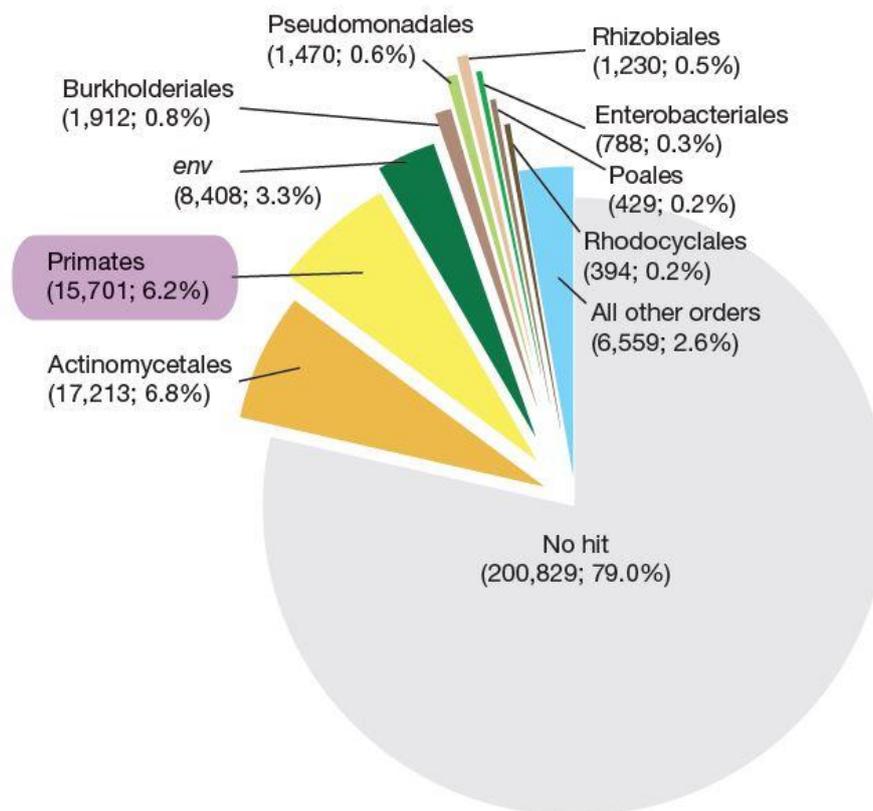


Figure 9: L'ADN endogène de l'échantillon (ici primates) représente seulement 6% de l'ADN total extrait (Green 2006).

1.4.1) Contamination intrinsèque

Il s'agit d'ADN de contaminants présents dans le sol lors de l'enfouissement du corps et co-extraits avec l'échantillon ancien de façon inévitable : bactéries, virus environnementaux, autres restes humains ou animaux (62).

1.4.2) Contamination lors des fouilles archéologiques

La surface poreuse des os et de la dentine représente la porte d'entrée principale pour des contaminants extérieurs comme les sécrétions provenant des mains des fouilleurs ou du lavage des échantillons après leur mise au jour (34, 73). Il peut également s'agir de fragments de peau ou de microbes dans l'air expiré, lors de la manipulation et du stockage. Une façon d'éviter ces contaminations est le port de gants et de masques durant les fouilles ainsi que l'absence de lavage des pièces archéologiques (34, 74).

1.4.3) Contamination au laboratoire

Les réactifs et le matériel de laboratoire peuvent être contaminés chez le fournisseur lors de leur fabrication par de l'ADN humain, animal ou microbien moderne (34, 75). Les réactifs, spécialement les désoxynucléotides ou les tampons, contiennent en infime quantité de petites molécules ADN, dérivées de sous-produits animaux (73, 76). De même, citons le cas de colonnes de purification contaminées par de l'ADN murin (77).

Une contamination inter-échantillon peut avoir lieu lorsque des molécules issues de la préparation d'un échantillon précédent restent en suspension dans l'air ou sur les surfaces des équipements du laboratoire (instruments, robinets, hottes...) et contaminent un échantillon en cours de traitement. Ces contaminations peuvent être indétectables jusqu'au séquençage car elles sont aléatoires et les témoins négatifs ne sont pas nécessairement affectés (62).

La contamination « carry-over » quant à elle, concerne la contamination des surfaces ou d'un échantillon par des produits amplifiés issus des PCR précédentes (34).

Enfin, les échantillons peuvent être contaminés par les manipulateurs. Pour réduire au minimum ce type de contamination, le personnel du laboratoire porte une combinaison complète ainsi que des gants et un masque. De plus, l'ADN de tous les manipulateurs est séquencé pour pouvoir être comparé, le cas échéant, avec le profil retrouvé sur l'échantillon ancien (74).

1.5) Méthodes de décontamination

Reconnaissant les caractéristiques des molécules ADN anciennes, il est alors nécessaire de mettre en place des règles lors de la manipulation des échantillons: réaliser les extractions et préparer la phase de pré-amplification dans un laboratoire d'ADN ancien dédié. Il doit être séparé physiquement du laboratoire moderne dans lequel sera réalisée l'amplification, idéalement dans deux bâtiments différents. Les déplacements du personnel doivent se faire uniquement du laboratoire ancien vers le laboratoire moderne et jamais en sens inverse (26, 34). Le travail de laboratoire est effectué avec des vêtements de protection (combinaison, masque, deux paires de gants, lunettes de protection) et les surfaces de travail sont régulièrement décontaminées avec des oxydants tels l'eau de Javel et irradiées au Ultra-Violet (34, 75, 78). Les réactifs sont également décontaminés sous UV (75). Le laboratoire est placé sous pression positive avec filtration de l'air. Les contaminations sont surveillées grâce à des blancs et des contrôles négatifs dans toutes les expériences. Ces règles de bonne pratique ont d'abord été élaborées pour la recherche sur le génome humain ancien mais se révèlent tout aussi importantes dans la recherche sur les microbiomes anciens (voir partie 3.2) (26, 34, 78).

1.6) Critères d'authenticité pour le travail en ADN ancien

Ces critères ont été établis afin de garantir la fiabilité des résultats obtenus lors du travail en ADN ancien. L'article faisant référence dans le domaine est celui de Cooper et Poinar (2000) (33). Les auteurs donnent une série de consignes à respecter pour limiter le risque d'erreurs liées à la contamination, à la faible quantité d'ADN présente dans les échantillons et aux dégradations (**tableau 1**).

Les manipulations sur l'ADN ancien doivent être effectuées dans un laboratoire dédié et isolé physiquement du bâtiment où sont réalisées les amplifications. Des blancs (d'extraction et de PCR) doivent être réalisés et traités comme les échantillons pour vérifier l'absence de contamination. Plus le nombre de cycles de PCR est important, plus les produits d'amplification doivent être petits, des amplicons de plus de 500 paires de base sont inhabituels. Les résultats doivent être reproductibles à partir des mêmes extraits ADN ou d'extraits ADN différents d'un même sujet. La contamination intra-laboratoire ne peut être écartée que lorsque différents échantillons d'un même spécimen sont extraits et séquencés dans des laboratoires indépendants. Des preuves indirectes de la présence d'ADN dans un échantillon ancien peuvent être obtenues en évaluant la quantité totale, la composition et l'étendue relative de la diagenèse*. Le nombre de copies de l'ADN cible doit être évalué par PCR compétitive. Lorsque le nombre de séquences de départ est faible (<1 000), il peut être impossible d'exclure la possibilité d'une contamination sporadique, en particulier pour les études sur l'ADN humain. Dans les études sur les restes humains où la contamination est particulièrement problématique, la preuve que des cibles ADN similaires survivent dans la faune associée est essentielle. Les restes faunistiques constituent également de bons témoins négatifs pour les amplifications par PCR d'ADN humain.

Physically isolated work area. To avoid contamination, it is essential that, prior to the amplification stage, all ancient DNA research is carried out in a dedicated, isolated environment. A building in which large amounts of the target DNA are routinely amplified is obviously undesirable.

Control amplifications. Multiple extraction and PCR controls must be performed to detect sporadic or low-copy number contamination, although carrier effects do limit their efficacy. All contaminated results should be reported, and positive controls should generally be avoided, as they provide a contamination risk.

Appropriate molecular behaviour. PCR amplification strength should be inversely related to product size (large 500- to 1000-base pair products are unusual). Reproducible mitochondrial DNA (mtDNA) results should be obtainable if single-copy nuclear or pathogen DNA is detected. Deviations from these expectations should be justified; e.g., with biochemical data. Sequences should make phylogenetic sense.

Reproducibility. Results should be repeatable from the same, and different, DNA extracts of a specimen. Different, overlapping primer pairs should be used to increase the chance of detecting numts or contamination by a PCR product.

Cloning. Direct PCR sequences must be verified by cloning amplified products to determine the ratio of endogenous to exogenous sequences, damage-induced errors, and to detect the presence of numts. Overlapping fragments are desirable to confirm that sequence variation is authentic and not the product of errors introduced when PCR amplification starts from a small number of damaged templates.

Independent replication. Intra-laboratory contamination can only be discounted when separate samples of a specimen are extracted and sequenced in independent laboratories. This is particularly important with human remains or novel, unexpected results.

Biochemical preservation. Indirect evidence for DNA survival in a specimen can be provided by assessing the total amount, composition, and relative extent of diagenetic change in amino acids and other residues.

Quantitation.* The copy number of the DNA target should be assessed using competitive PCR. When the number of starting templates is low (<1,000), it may be impossible to exclude the possibility of sporadic contamination, especially for human DNA studies.

Associated remains.* In studies of human remains where contamination is especially problematic, evidence that similar DNA targets survive in associated faunal material is critical supporting evidence. Faunal remains also make good negative controls for human PCR amplifications.

*For important discoveries, additional criteria are also essential.

Tableau 1: D'après Cooper and Poinar (2000). Ancient DNA: do it right or not at all.

1.7) Les nouvelles techniques de séquençage. Principales étapes dans le séquençage New Generation Sequencing (NGS)

Durant la dernière décennie, les NGS ont été appliquées à l'ADN ancien, ouvrant de nouvelles perspectives à la paléogénétique qui deviendra la paléogénomique : reconstruction de génomes d'organismes anciens ou éteints, compréhension des paléoclimats, démographie des populations anciennes ou étude d'agents pathogènes (38, 42, 43, 68). L'approche paléogénomique est mieux adaptée à l'ADN ancien que les approches fondées sur la PCR (paléogénétique) car elle n'est pas affectée par les variations de longueur des séquences des fragments (26). Une des avancées majeures est la possibilité de séquencer des millions de petites séquences («reads» en anglais) en parallèle, augmentant ainsi la quantité de données générées et réduisant les coûts (62). La technologie de NGS la plus utilisée actuellement dans le domaine est celle d'Illumina avec les appareils de séquençage MiniSeq, MiSeq, HiSeq et NextSeq, ces derniers ayant pratiquement remplacé les autres séquenceurs issus de technologies différentes (62, 65, 79, 80). Trois principales approches sont envisageables en fonction de la cible ou de l'information recherchée et de la nature des échantillons archéologiques : le shotgun, la capture et le métabarcoding (26, 63, 81, 82). Concernant l'analyse des microbiomes, ces techniques permettent l'identification taxonomique de l'ensemble des espèces bactériennes dans un environnement donné ou le ciblage spécifique d'un pathogène (83).

Parmi les critères de qualité les plus importants dans l'authentification de reads générés par NGS à partir de séquences anciennes retenons :

-**la profondeur**, exprimée en « x », il s'agit du nombre de reads couvrant une portion donnée d'un génome de référence. La profondeur permet d'évaluer la précision de l'analyse.

-**la couverture**, exprimée en pourcentage. Il s'agit de la proportion du génome de référence couverte au moins une fois par un read. Une couverture et une profondeur importante permettent l'identification précise et fiable de génomes de microbes anciens.

1.7.1) Préparation des échantillons

Avant tout traitement, il est conseillé de prendre des photos des échantillons et d'enregistrer les signes pathologiques qui peuvent y être associés, car les protocoles entraînent souvent la destruction de tout ou partie de la pièce archéologique. Par exemple, avant d'échantillonner une dent, on notera sa localisation sur l'arcade, l'usure, la présence de tartre et de pathologies bucco-dentaires (84). L'échantillon est ensuite décontaminé au laboratoire d'ADN ancien (voir chapitre 1.5) de façon chimique (hypochlorite de sodium, EDTA...) et/ou physique (rayons UV, abrasion mécanique avec un instrument stérile...). Puis la partie d'intérêt de l'échantillon (dent entière, pulpe dentaire, ciment, tartre...) est prélevée, en fonction de l'ADN ciblé (endogène humain et/ou microbien) et réduite en poudre par broyage. Le cryobroyage de l'échantillon sous azote liquide à -196°C permet de prévenir la dégradation potentielle de l'échantillon due à l'échauffement pendant cette étape (25, 85).

1.7.2) Extraction de l'ADN

Les méthodes de NGS débutent toutes avec l'extraction de l'ADN : il existe actuellement un nombre croissant de méthodes d'extraction, adaptées soit au support biologique qui contient les molécules (os, dent, bois, sédiment, etc.) soit aux techniques employées post PCR. Par exemple, pour des échantillons dentaires, osseux ou de tartre, l'extraction passera par une étape de décalcification de la matrice. Les techniques d'extraction, en faisant varier le temps, la température, les tampons utilisés, cherchent à maximiser les quantités d'ADN endogène extraites tout en minimisant les inhibiteurs co-extraits (62). Elles doivent également permettre d'obtenir des fragments de taille compatible avec la suite des analyses, être reproductibles et donner une représentation fidèle de la diversité microbienne (86). Des blancs d'extractions doivent obligatoirement être traités en même temps que les échantillons, afin de vérifier l'absence de contaminations à cette étape (voir chapitre 1.6) (33).

1.7.3) Construction de librairies

Les techniques de séquençage haut débit nécessitent de créer des librairies à partir des fragments d'ADN extraits des échantillons anciens, avant séquençage. Cela consiste à réparer et à ajouter aux fragments d'intérêt des petites séquences synthétiques qui permettront le séquençage et le traitement des données générées (voir ci-après). La conversion de l'ADN en librairie rend possible le séquençage de fragments très courts car le fait de rajouter une séquence synthétique au début du fragment crée moins de perte d'informations liée à la fixation de la polymérase lors de la phase de synthèse. De plus, les librairies permettent d'immortaliser le contenu ADN de l'échantillon, car la préparation nécessite quelques cycles d'amplification par PCR (26, 39, 87).

1.7.4) Indexation de librairies double/ simple index

Il existe plusieurs techniques d'indexation des librairies selon la cible, l'état de conservation de l'ADN et la technicité de séquençage. L'indexation permet d'identifier spécifiquement les molécules appartenant à la librairie lors des analyses en aval. Dans le cadre de ce travail, nous avons employé une technique d'index unique, c'est-à-dire l'ajout d'un seul index aux fragments d'ADN de l'échantillon selon le protocole de Meyer et Kircher (2010) (80). La même librairie pourra être utilisée à la fois pour le shotgun et la capture (62, 88).

L'ADN de l'échantillon présente souvent des coupures décalées avec des fragments à bouts cohésifs.* Il va être réparé pour générer des fragments à bouts francs et les extrémités 5' vont être phosphorylées, rendant possible la ligation des adaptateurs puis des index. Les fragments sont ensuite dénaturés et une amplification PCR réduite (quelques cycles seulement) permet d'enrichir la librairie en séquences d'intérêt (**figure 10**) (62, 89). Concernant le protocole Illumina, on retrouvera sur le fragment d'ADN ancien : un site de liaison de la polymérase qui sera utilisé lors du séquençage, un index et une région complémentaire de chaque

oligonucléotide (petit fragment d'ADN composé de quelques bases seulement) de la flow cell (89). La flow cell est une surface de verre dans laquelle une portion de la librairie va être déposée pour le séquençage. Elle est recouverte de sillons, contenant chacun deux types d'oligonucléotide. L'hybridation à la surface est rendue possible par le premier des deux types d'oligonucléotides présent sur la librairie construite, complémentaire de celui de la flow cell (voir chapitre 1.7.6).

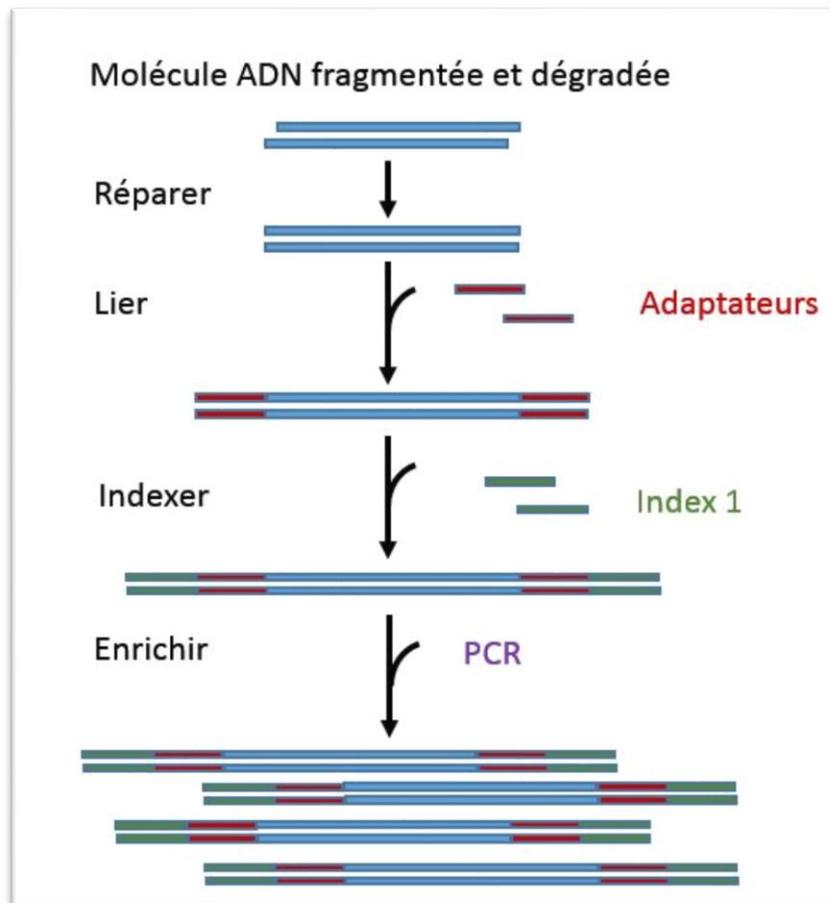


Figure 10 : Préparation et indexation de librairies. (Modifié d'après Meyer et Kircher 2010).

1.7.5) Approches de séquençage NGS

Il existe trois principales approches de séquençage utilisées en recherche sur les molécules anciennes, ayant des buts et des cibles différentes et réalisables avec la technologie Illumina.

- **Shotgun**

Toutes les molécules ADN de la librairie sont séquencées.

Dans cette approche, l'analyse de l'ADN est non ciblée et appliquée à l'ensemble d'un échantillon issu d'un environnement donné, sans sélection préalable (**figure 11**) (26). Elle permet d'évaluer la composition taxonomique d'un échantillon d'ADN ancien, la quantité et la longueur moyenne des fragments d'ADN endogènes ainsi que la contamination par de l'ADN moderne. Elle est utilisée pour la caractérisation des microbiomes et comme outil de screening en paléogénomique (26, 90). Cette technique permet, par exemple, d'avoir une vision d'ensemble de toutes les espèces présentes dans le microbiome oral.

Les séquences obtenues sont identifiées par « matching » et comparaison avec des bases de données existantes. Au niveau statistique, cette méthode nécessite une grande puissance pour reconnaître spécifiquement les reads obtenus. La technique shotgun nécessite également une grande profondeur de séquençage pour caractériser la variabilité génétique: le nombre total de bases séquencées doit excéder largement la longueur totale de l'ADN cible pour qu'une même région soit séquencée plusieurs fois. Le shotgun est la technique de NGS la plus facile et la plus rapide à mettre en œuvre sur des échantillons bien préservés, contenant de grandes quantités d'ADN endogène. Cependant, elle est coûteuse quand il s'agit de séquencer des échantillons pauvres en ADN endogène cible. Actuellement, la plateforme de séquençage la plus employée est Illumina (26, 62, 65, 90).

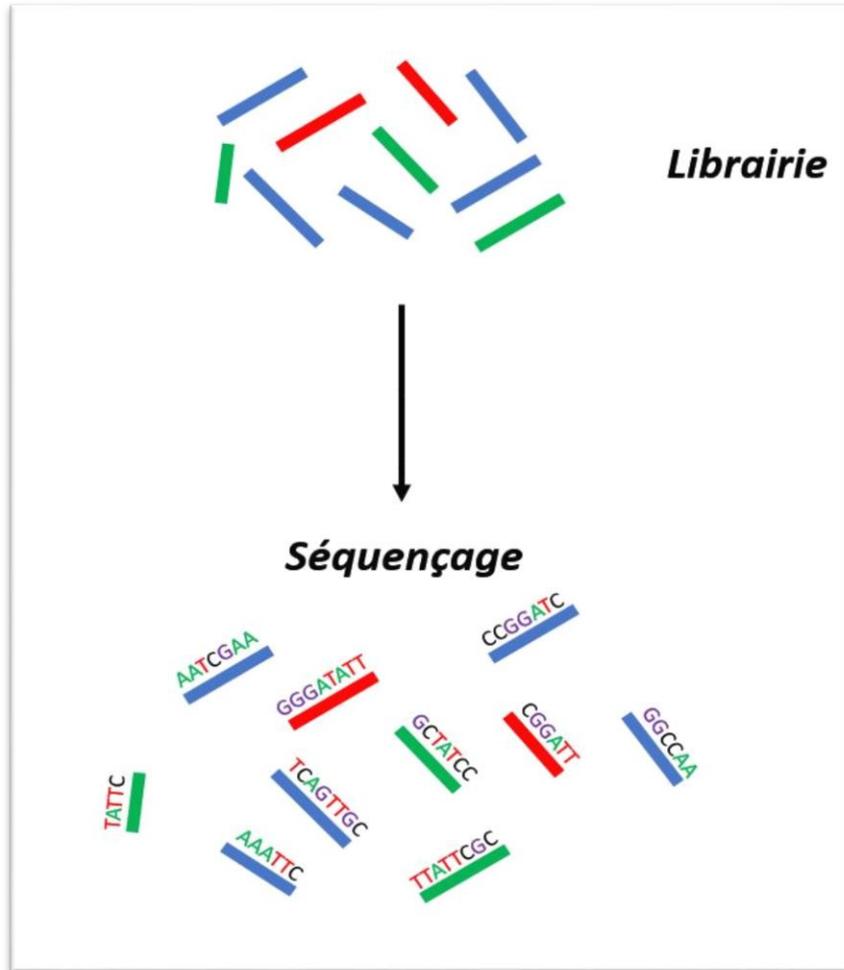


Figure 11: Technique shotgun, toutes les molécules ADN de la librairie sont séquencées.

- **Capture**

Ciblage, capture et séquençage spécifique d'un génome prédéfini présent dans les librairies.

Le développement de la capture ou “ targeted enrichment ” a permis d'augmenter le nombre d'échantillons anciens pouvant être analysés en paléogénomique, car, exception faite des sujets remarquablement bien préservés, la majorité de l'ADN retrouvé dans les échantillons anciens est exogène (environnemental et contamination *post-mortem*). C'est une méthodologie qui utilise des amorces (ou sondes) conçues de façon à s'hybrider spécifiquement à une séquence d'ADN endogène cible connue et qui permet d'enrichir l'échantillon en cet ADN cible avant le séquençage (65, 91). En augmentant la proportion de molécules d'intérêt, on peut, par exemple, détecter des mutations avec une forte couverture. Initialement utilisée pour cibler le génome mitochondrial humain, cette technique est aussi désormais employée pour l'analyse des génomes de pathogènes (92-94). Elle permet également de diminuer la quantité de matériel nécessaire qui sera détruite dans le cadre de l'analyse ainsi que la charge de travail (26, 95). Un des inconvénients de cette méthode est la nécessité de disposer d'un génome de référence, moderne ou ancien, à partir duquel on pourra construire des sondes permettant une hybridation spécifique.

Des sondes oligonucléotidiques ou « baits » (« hameçons ») complémentaires d'une portion du génome cible, sont fabriquées en laboratoire et couplées à une bille magnétique (**figure 12**). Ces sondes vont s'hybrider de façon spécifique avec le génome d'intérêt puis un aimant va être placé contre la paroi du tube contenant la librairie, attirant ainsi les sondes couplées aux billes magnétiques et « capturant » dans le même temps le génome d'intérêt. Ces complexes vont ensuite être retenus par l'aimant tandis que les séquences non ciblées de la librairie vont être éluées (62, 65, 91). Ces techniques ont été utilisées pour capturer les génomes des pathogènes anciens *Yersinia pestis* et *Vibrio cholerae* par exemple (47, 62, 93, 96). Au niveau de la sphère

orale, on peut, par exemple, cibler le pathogène bucco-dentaire *Porphyromonas gingivalis* et rechercher une maladie parodontale chez un sujet archéologique.

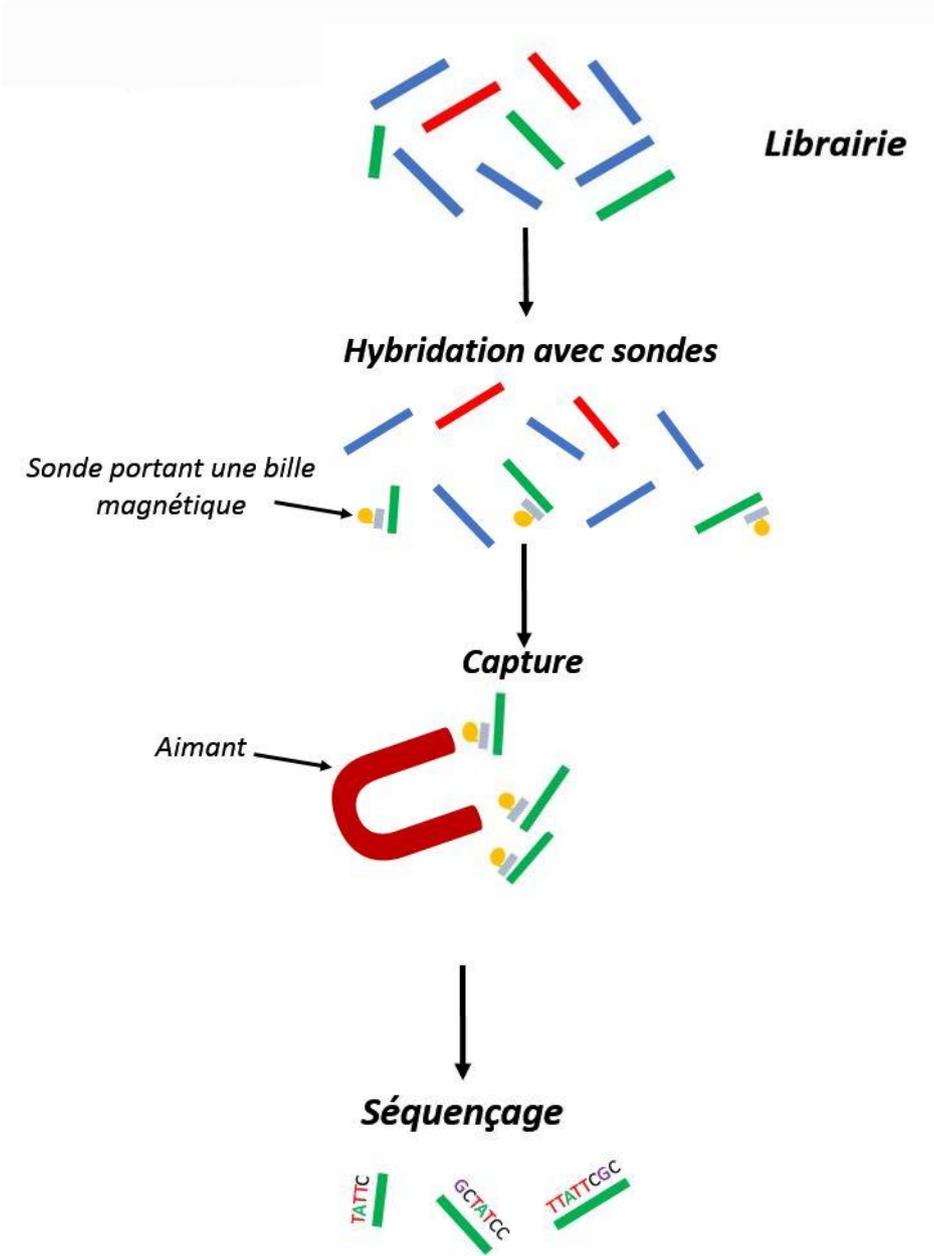


Figure 12 : Capture ciblée des séquences d'intérêt de la librairie grâce à des sondes couplées à des billes magnétiques.

- **Metabarcoding**

Les librairies sont construites suite à l'amplification ciblée de régions spécifiques.

Cette technique utilise des amorces universelles spécifiques de régions très conservées de l'ADN cible, conçues pour amplifier plusieurs taxa simultanément. Entre ces régions très conservées, l'ADN cible présente des régions hypervariables appelées « barcodes », spécifiques d'un ou plusieurs taxa particuliers et permettant de les différencier entre eux. Pour être informatifs, les « barcodes » doivent présenter de grandes différences inter-espèces et une très faible variation au sein d'un même taxon (97).

En ce qui concerne les bactéries, la méthodologie repose sur l'amplification spécifique de trois régions hypervariables codant pour l'ARNr 16S de la petite unité ribosomique (98, 99). Les amorces universelles (primers 16S) vont se lier aux régions conservées de ce gène, communes à l'ensemble des bactéries de l'échantillon, et permettre l'amplification des régions hypervariables ou barcodes spécifiques à une bactérie ou un groupe de bactéries donné (**figure 13**). Le metabarcoding, permet, par exemple, d'avoir accès à la diversité bactérienne du microbiome oral et de comparer cette diversité bactérienne entre individus actuels, par le passé et/ou en fonction de leurs modes de vie.

Cette méthode a cependant un certain nombre de limitations, principalement liées aux étapes de PCR, qui peuvent introduire des erreurs pendant l'amplification, des contaminations, des erreurs d'incorporation nucléotidique et générer des séquences chimériques (faux positifs) ou amplifier préférentiellement certains taxa plus abondants au détriment de certains autres plus rares ou ayant des séquences avec moins d'affinité pour la polymérase (faux négatifs) (98, 100). De plus, les relations taxonomiques au niveau des barcodes ne reflètent pas obligatoirement les relations taxonomiques entre les espèces et ne permettent pas toujours une assignation

taxonomique précise. Pour cela, il faudrait utiliser des bases de données taxonomiques comparatives de plus haute qualité (42, 90).

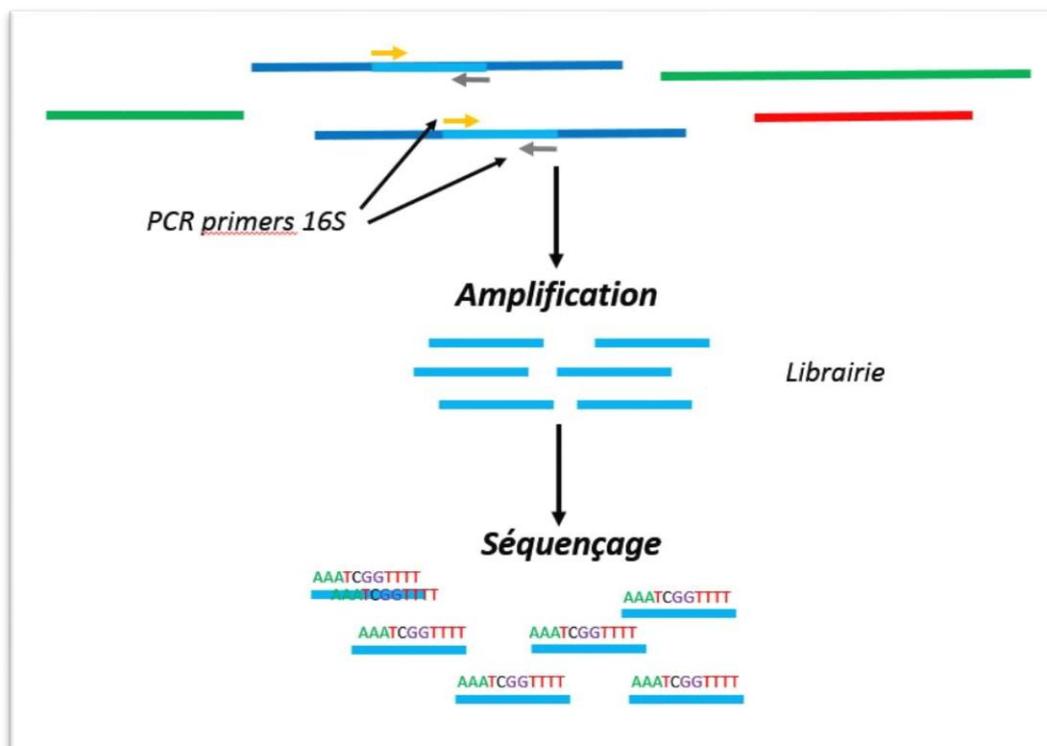


Figure 13: Amplification spécifique de régions hypervariables codants pour l'ARNr 16S bactérien ou "barcodes".

1.7.6) Séquençage utilisant la technologie Illumina

Le protocole Illumina, décrit ci-après est celui utilisé dans la publication (**figure 14**).

i) Génération des clusters

Il s'agit du processus par lequel chaque fragment d'ADN, hybridé sur la flow cell grâce aux adaptateurs, va être amplifié. Une polymérase synthétise la séquence complémentaire du fragment hybridé, puis la molécule double brin ainsi formée est dénaturée et le fragment

d'origine, non retenu sur la flow cell, est éliminé par lavage. Les séquences sont amplifiées de façon clonale par une amplification dite « en pont » : le fragment restant sur la flow cell se replie et le deuxième adaptateur s'hybride sur le deuxième type d'oligonucléotide de la flow cell. La polymérase synthétise le brin complémentaire formant une molécule en pont. Ce pont est ensuite dénaturé, générant deux molécules simples brins, attachées à la flow cell. Le processus se répète et se produit simultanément pour des millions de clusters. Le résultat est une amplification clonale des séquences d'ADN initiales. Après l'amplification en pont, les séquences reverse* sont clivées et éliminées par lavage, laissant uniquement les séquences forward* sur la flow cell.

ii) Séquençage

Le séquençage commence à la production du premier read. A chaque cycle, un nucléotide fluorescent complémentaire du brin matrice (ici le brin forward) est ajouté à la séquence en construction. Après chaque incorporation nucléotidique, les clusters sont excités par une source lumineuse et un signal de fluorescence caractéristique de chaque nucléotide est émis. La longueur d'onde ainsi que l'intensité du signal permettent de déterminer la base incorporée. Il s'agit d'un séquençage par synthèse, le nombre de cycles détermine la longueur du read. Pour un cluster donné, tous les brins identiques sont lus simultanément et des dizaines de milliers de clusters sont donc séquencés en parallèle. Quand l'élongation du premier read est terminée, le produit néosynthétisé est éliminé. Puis l'amorce pour l'index est introduite et s'hybride au brin matrice, le read correspondant à l'index est généré de la même façon que précédemment. Quand l'élongation est terminée, ce read est éliminé. Le brin matrice se courbe alors et s'apparie avec le deuxième oligonucléotide sur la flow cell. Le fragment complémentaire du brin matrice est synthétisé à partir du deuxième oligonucléotide de la flow cell formant un pont double brin. Puis les fragments sont dénaturés pour les linéariser. Le brin matrice forward original est clivé

et éliminé, laissant en place le brin reverse seulement. La synthèse du deuxième brin débute et les étapes de séquençage sont répétées comme pour le fragment forward initial.

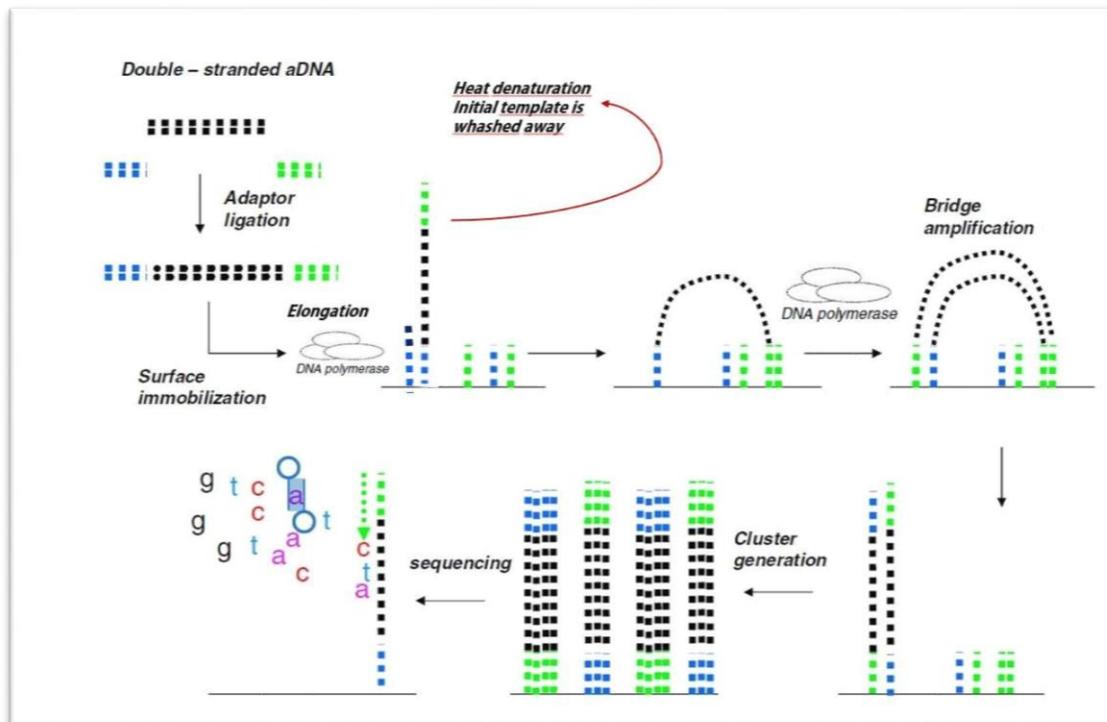


Figure 14: Protocole Illumina. Les fragments d'ADN ancien indexés sont convertis en librairie puis amplifiés « en pont » sur la surface de la flow cell. Un séquençage par synthèse basé sur l'utilisation de nucléotides fluorescents est ensuite réalisé (D'après Rizzi 2012, modifié).

1.8) Analyse bio-informatique

De nombreuses stratégies peuvent être employées pour l'analyse des données post-séquençage NGS (**figure 15**). Les séquences issues de librairies différentes sont triées grâce aux combinaisons d'index uniques introduits lors de la préparation des échantillons. La qualité des données brutes est évaluée puis les séquences sont nettoyées (trimming/ collapse) pour obtenir des données secondaires (voir ci-après) (101-104). Lors de l'étude d'un microbiome contenant le génome de l'hôte tel qu'un humain ou un animal, les séquences de l'hôte seront d'abord

identifiées pour simplifier l'analyse (105). Certains outils bioinformatiques ou pipelines permettent de réaliser à la fois plusieurs de ces opérations.

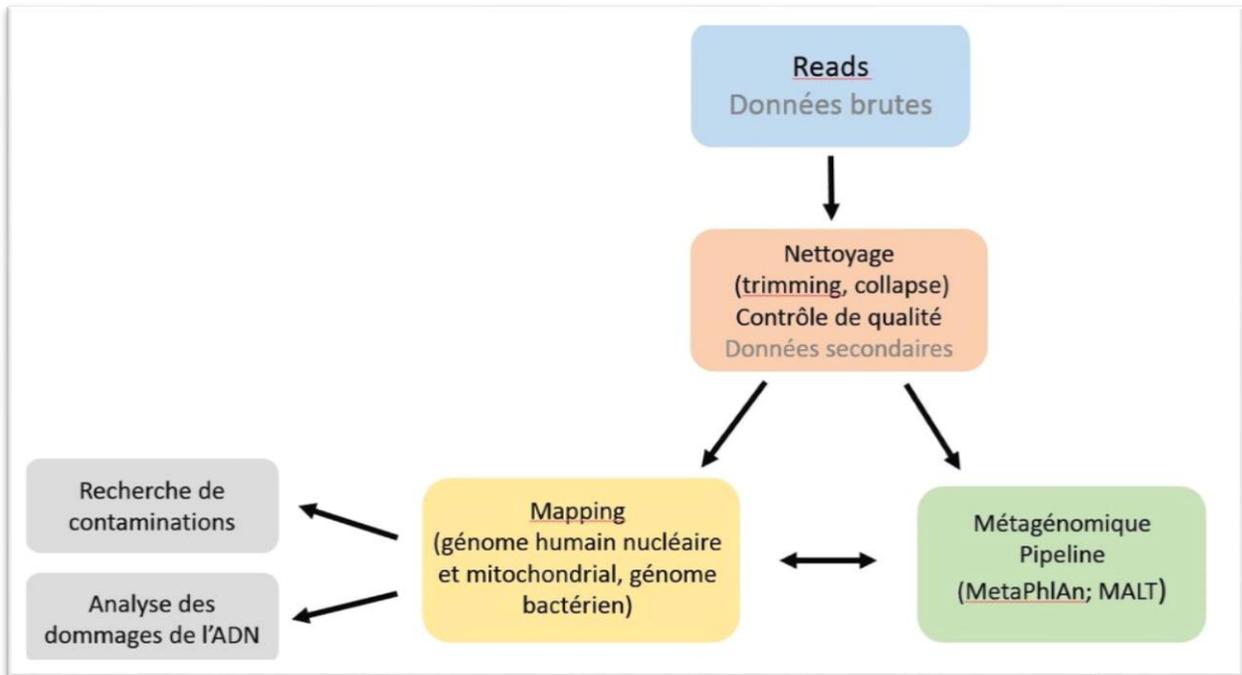
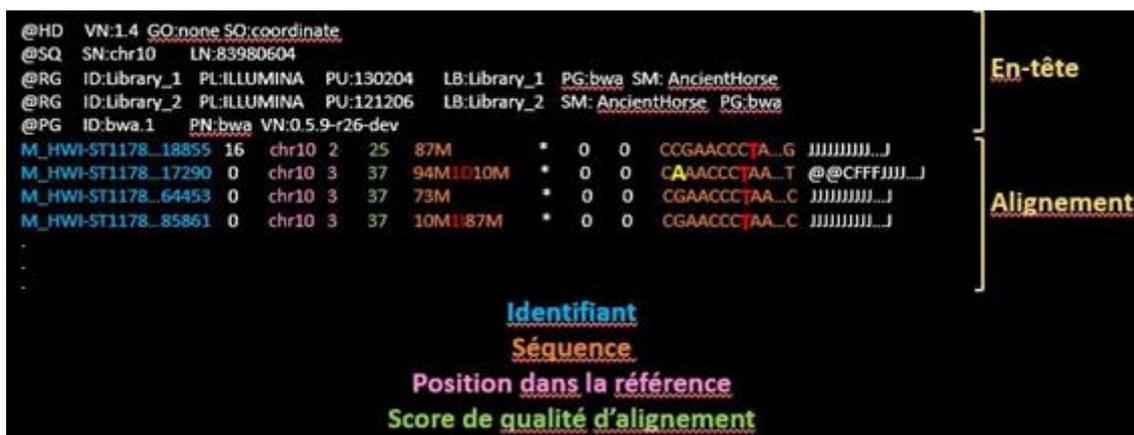


Figure 15: Traitement des données post-séquençage NGS.

1.8.2) Traitement des données secondaires

i) Mapping

Les reads peuvent être alignés sur le génome de référence de Homo sapiens (hg19), le génome mitochondrial humain et/ou des génomes de référence bactériens en fonction du travail effectué. **BWA** (Burrow-Wheeler Alignment tool) est parmi les outils les plus utilisés pour l'alignement de reads sur une séquence de référence. Le processus d'alignement est divisé en deux étapes : une première étape du « mapping » : des coordonnées sont établies pour chaque read en fonction de leur position sur un génome de référence dans un format spécifique. Puis une étape de génération de l'alignement des reads pour fournir un fichier de sortie au format standard SAM/BAM (Sequence Alignment Map/ Binary Alignment Map) et une évaluation de la qualité de l'alignement (**figure 17**) (107, 108). Les fichiers SAM sont des fichiers compacts, facilement manipulables et toujours formatés de la même façon ce qui favorise les échanges et l'analyse de résultats entre équipes. Les fichiers BAM sont la version binaire compressée des fichiers SAM. La conversion des fichiers SAM en BAM se fait avec un programme type **SAMtool** (109).



```
@HD VN:1.4 GO:none SO:coordinate
@SQ SN:chr10 LN:83980604
@RG ID:Library_1 PL:ILLUMINA PU:130204 LB:Library_1 PG:bwa SM:AncientHorse
@RG ID:Library_2 PL:ILLUMINA PU:121206 LB:Library_2 SM:AncientHorse PG:bwa
@PG ID:bwa.1 PN:bwa VN:0.5.9-r26-dev
M_HWI-ST1178_18855 16 chr10 2 25 87M * 0 0 CCGAACCCTA_G JJJJJJJJJ_J
M_HWI-ST1178_17290 0 chr10 3 37 94M1010M * 0 0 CAAACCCTAA_T @@CFFJJJJ_J
M_HWI-ST1178_64453 0 chr10 3 37 73M * 0 0 CGAACCCTAA_C JJJJJJJJJ_J
M_HWI-ST1178_85861 0 chr10 3 37 10M1187M * 0 0 CGAACCCTAA_C JJJJJJJJJ_J
```

En-tête

Alignement

Identifiant

Séquence

Position dans la référence

Score de qualité d'alignement

Figure 17 : Représentation d'un fichier SAM/BAM représentant la séquence, sa position sur le génome de référence ainsi que le score de qualité de l'alignement obtenu.

Lors des étapes de PCR, certaines séquences peuvent être préférentiellement amplifiées et donc surreprésentées, pouvant entraîner des biais dans les analyses statistiques, par exemple pour la recherche de variants génétiques. Des outils comme **MarkDuplicates** permettent de détecter et marquer les doublons parmi les reads alignés et de générer un fichier SAM où ils sont définis comme provenant d'un seul fragment d'ADN initial puis éliminés.

ii) Analyse des dommages de l'ADN après alignement

Les séquences d'ADN ancien peuvent être identifiées en se basant sur la signature spécifique que constituent les dommages de l'ADN (voir chapitre 1.3) (110, 111). **MapDamage2** permet d'observer et de quantifier les erreurs d'incorporations nucléotidiques dues à la désamination des cytosines ainsi que la position des cassures dans les fragments. Les données peuvent être visualisées sous forme de tableaux récapitulatifs et de graphiques et comparées à un profil type de dégradation des molécules d'ADN ancien. L'ensemble des analyses peut être effectué globalement, par chromosome ou par brin d'ADN afin de détecter d'éventuelles incohérences.

iii) Recherche de contaminations après alignement

La contamination par de l'ADN moderne est toujours possible malgré les protocoles stricts employés au laboratoire et est systématiquement recherchée dans le cadre de bonnes pratiques de travail en ADN ancien. Pour détecter et évaluer cette contamination, il existe des outils comme **mt-DNA server** (utilisé dans l'article publié) axé sur l'identification de l'hétéroplasmie mitochondriale (variation de séquence intra-individuelle $>$ ou $=$ 1%). En cas de contamination causée par plusieurs séquences d'ADN mitochondrial différentes, les profils obtenus mènent aux différents haplogroupes et les variants hétéroplasmiques sont divisés en profils majeurs et mineurs de contamination (112).

iv) Analyse métagénomique

Elle permet de déterminer les proportions taxonomiques des différents fragments d'ADN endogène (humain et microbiote) et exogènes (contaminants environnementaux) présents dans l'échantillon. Elle est effectuée par des ensembles de logiciels, appelés « pipelines » ayant accès à des bases de données métataxonomiques de référence. Les pipelines permettent de regrouper les reads en clusters correspondant à une identité taxonomique définie.

Bases de données métataxonomiques

La façon dont une base de données de référence est construite a une forte influence sur la sensibilité et la spécificité de l'analyse métagénomique, ainsi que sur les biais potentiels qui peuvent apparaître. Les bases de données peuvent être divisées en trois catégories :

- « single *locus* »

Elles sont basées sur des gènes codant pour l'ARNr 16S ou d'autres gènes qui montrent des orthologues* chez toutes les espèces représentées dans la base de données. Les bases de données regroupant des gènes codant pour l'ARNr 16S sont les plus nombreuses et les plus complètes par rapport au « multi *loci* » ou « whole genome ». Cependant, le gène codant pour l'ARNr 16S étant très conservé, il existe en général une diversité inter-espèce insuffisante pour distinguer deux taxa proches. De plus, une classification taxonomique fiable nécessite un nombre important de reads. Or pour une approche shotgun, seulement 0,2 à 0,6% en moyenne des reads microbiens produits s'alignent sur le gène codant pour l'ARNr 16S (ceci est dû à la longueur courte du gène par rapport à la taille moyenne du génome microbien) (26).

- « multi-*loci* »

Il s'agit d'une extension de l'approche précédente appliquée à plusieurs gènes, en général des gènes de ménage*. Il existe plus de bases de données de ce type que pour le « whole genome »

et les différences entre les séquences peuvent être plus importantes que pour les gènes codants pour l'ARNr 16S, permettant une identification taxonomique plus précise. Il est de plus possible de sélectionner des gènes présents en copies uniques dans le génome (26).

· « whole genome »

Il s'agit d'une approche globale utilisant des génomes complets comme bases de données. Chaque fragment d'ADN amplifié, même présent en faible quantité, peut donc être assigné à un taxon connu et cette méthode maximise les distinctions fines entre différents taxa. Ces bases de données sont bien moins complètes que celles de l'ARNr 16S mais en progression constante. Ceci peut entraîner des faux négatifs (espèces inconnue car absente de la base de données) ou de faux positifs (espèce assignée au taxon le plus proche). De plus, des transferts horizontaux ou des recombinaisons de gènes peuvent fausser l'assignation. Il faudra également tenir compte de la taille des génomes lors de l'analyse afin d'éviter qu'un génome plus grand (donc produisant plus de reads) paraisse plus abondant (26).

- **Utilisation de pipelines**

Chaque pipeline fonctionnant différemment, les résultats générés entre différents pipelines peuvent varier (26). Le choix d'utiliser un programme de classification taxonomique ou un autre, basé ou non sur l'alignement de séquences, peut avoir des répercussions sur l'identification (106). De même, d'une base de données à l'autre, l'affectation taxonomique et, par conséquent, les taux de faux positifs et de faux négatifs peuvent être très différents, d'où l'utilité de confirmer les résultats entre pipelines (**figure 18**) (113).

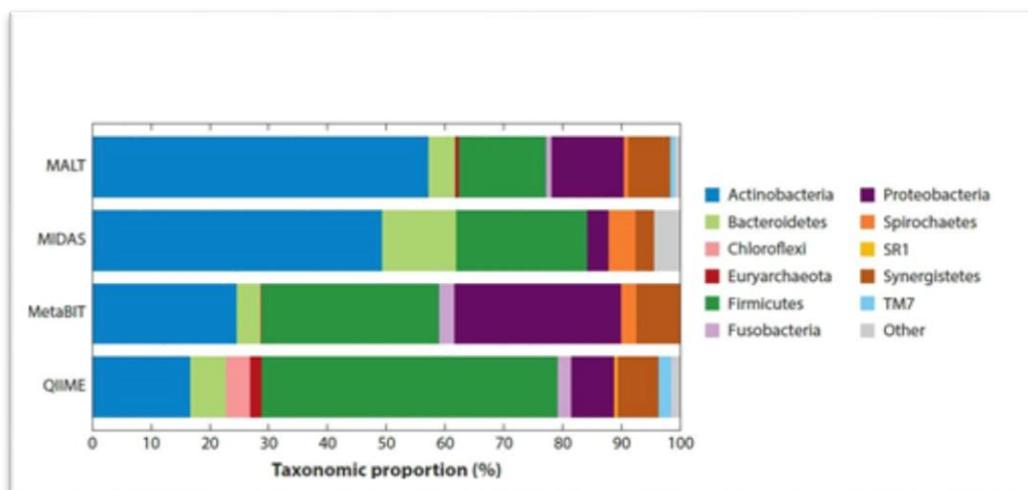


Figure 18: Différences dans la reconstruction de profils taxonomiques bactériens obtenus en utilisant différents pipelines : MALT ; MIDAS ; MetaBIT ; QIIME (Warinner 2017).

Parmi les pipelines existants, nous avons choisi de présenter ceux utilisés pour traiter les données générées lors de l'étude des pathogènes bucco-dentaires des sujets du Mans (voir partie 3) : MetaPhlAn et MALT, basés sur des types d'alignement et des bases de données différentes.

- MetaPhlAn (Metagenomic Phylogenetic Analysis)

MetaPhlAn est un pipeline permettant de caractériser la composition des communautés microbiennes selon une approche « multi *locus* ». Il effectue des assignations taxonomiques basées sur des gènes marqueurs à copie unique, propres à chaque espèce. La base de données MetaPhlAn2 contient 17 000 génomes de référence (~13 500 bactériens et archées, ~3 500 viraux et ~110 eucaryote) (114, 115). Pour ses algorithmes d'alignement, MetaPhlAn intègre **MEGABLAST** ou **Bowtie 2** (utilisé dans les analyses réalisées sur les sujets du Mans), cependant, d'autres algorithmes d'alignement peuvent également être intégrés (26, 116). Il s'est montré très précis pour l'assignation taxonomique dans les échantillons modernes issus de séquençage NGS (114, 115, 117, 118).

- MALT (MEGAN alignment tool)

MALT est une extension de MEGAN 6 (MEGenome Analyser) (119, 120). Il s'agit d'un pipeline d'alignement et d'analyse de séquences produites par NGS, exploitant les bases de données « whole genome ». MALT utilise l'algorithme **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) basé sur l'alignement de séquences similaires (nucléiques et/ou protéiques) (121). L'alignement se fera sur les bases des données les plus complètes telles que "the Nucleotide collection" (nt). Il est possible d'obtenir des résultats très complets, mais l'inconvénient de cet outil vient de la taille de ses bases de données et de la mémoire nécessaire à son fonctionnement.

Chapitre 2 : Dent, parodonte, plaque et tartre dentaire. Pathologies bucco-dentaires.

2.1) La dent et le parodonte: caractéristiques

2.1.1) La dent

La dent est un organe de la cavité buccale dont la couronne fait saillie dans la bouche et dont les racines sont enchâssées dans l'os alvéolaire maxillaire ou mandibulaire. Les dents permettent de broyer ou de couper les aliments lors de la mastication et, pour les dents antérieures, participent également à la phonation et à l'esthétique du visage.

Histologiquement, la dent est constituée de plusieurs tissus (**figure 19**) :

-**L'émail** recouvre la partie coronaire et représente le tissu le plus dur de l'organisme. Son épaisseur est maximale au niveau des surfaces dédiées à la mastication et minimale au niveau du collet (zone de transition entre émail et ciment). Il est composé de cristaux d'hydroxyapatite reliés entre eux par une matrice organique. L'émail est une structure acellulaire, d'origine ectodermique, non innervée et non vascularisée (122).

-**La dentine**, recouverte dans sa partie externe par l'émail, au niveau de la couronne, et par le ciment au niveau de la racine de la dent. Sa partie interne est au contact du tissu pulpaire. C'est un tissu d'origine mésenchymateuse, moins minéralisé que l'émail mais plus minéralisé que l'os ou le ciment, contenant des cristaux d'hydroxyapatite ainsi qu'une matrice organique extracellulaire principalement collagénique. La dentine présente des similitudes avec l'os : c'est un tissu perméable, traversé par des tubulis (ou canalicules) dentinaires allant de la jonction amélo-dentinaire jusqu'au tissu pulpaire. Ces tubulis contiennent le prolongement cytoplasmique des odontoblastes ainsi que le fluide dentinaire, issu du tissu pulpaire. Contrairement à l'os, la dentine n'est pas vascularisée (123, 124).

-**La pulpe**, située dans la partie la plus centrale de la dent et protégée par la dentine ainsi que l'émail ou le ciment. Il s'agit d'un tissu d'origine mésenchymateuse, non minéralisé, il est composé majoritairement de cellules : fibroblastes, mais aussi cellules immunitaires ainsi qu'un front d'odontoblastes à sa périphérie. Il s'agit d'un tissu richement innervé et vascularisé (124).

-**Le ciment**, tissu conjonctif minéralisé composé d'hydroxyapatite, d'une matrice organique principalement collagénique et de substance fondamentale (chondroïtine sulfate). Il recouvre la partie radiculaire de la dent et permet l'ancrage des fibres desmodontales sur la racine. Il existe deux types de ciment : le ciment acellulaire en contact avec la dentine et le ciment cellulaire en contact avec le desmodonte (125). De ce fait, le ciment appartient également au parodonte.

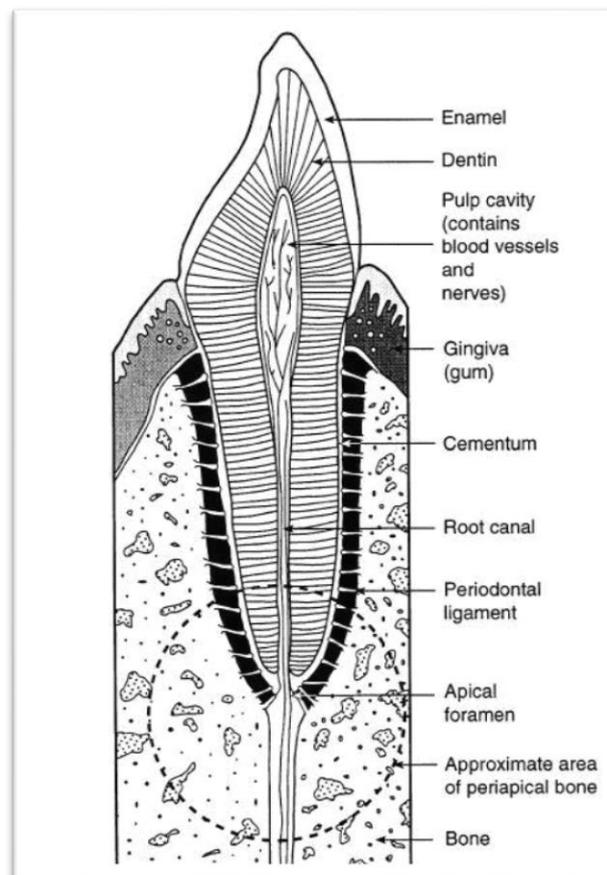


Figure 19: Coupe transversale schématique d'une dent humaine et de ses tissus de soutien (D'après Dias&Tayles 1997).

2.1.2) Le parodonte

Il désigne les structures situées autour de la dent (peri= autour et odonte=dent). Sa fonction principale est de servir de support à la dent ainsi que de « l'attacher » à l'os de la mâchoire. Il constitue une unité développementale, biologique et fonctionnelle (126, 127).

Le parodonte est composé de quatre structures (**figure 20**) (128):

-**Le cément**, (voir partie 2.1.1)

-**La gencive attachée**, constituée principalement de collagène organisé en fibres, de fibroblastes et de cellules immunitaires, elle assure l'herméticité et la protection du parodonte profond (cément, desmodonte et os alvéolaire) (125).

-**Le desmodonte ou ligament alvéolodentaire**, tissu conjonctif non minéralisé qui s'étend entre l'os alvéolaire et le cément radiculaire. Il permet d'amortir les forces masticatoires et participe aussi, entre autres, à la cicatrisation des tissus parodontaux (125).

-**L'os alvéolaire**, permettant de recouvrir les racines dentaires et constitué d'os compact au niveau des alvéoles contenant les dents entre lesquelles se trouve de l'os spongieux (125).

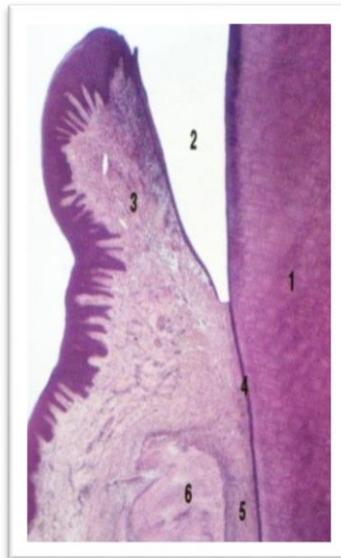


Figure 20: Coupe histologique montrant les quatre éléments du parodonte (gencive attachée, cément, desmodonte, os alvéolaire). 1 : dentine ; 2 : émail ; 3 : gencive ; 4 : cément ; 5 : desmodonte ; 6 : os alvéolaire (D'après Charon 2009).

2.2) Ecosystème buccal et pathologies bucco-dentaires

Le corps humain abrite des communautés microbiennes complexes avec lesquelles il vit en symbiose. Les bactéries présentes dans ces ensembles dépassent en nombre nos propres cellules d'un facteur dix (129). Au niveau buccal, ces bactéries peuvent s'organiser en biofilms et former plaque dentaire et tartre ou bien être à l'état planctonique dans la salive (130, 131).

2.2.1) La plaque dentaire

La plaque dentaire a été définie comme une entité structurale spécifique mais très variable constituée de micro-organismes et de leurs produits noyés dans une matrice intercellulaire très organisée (132). Il s'agit d'un véritable film biologique constitué d'une grande variété de micro-organismes impliqués dans une large gamme d'interactions physiques, métaboliques et moléculaires. Cette organisation fournit aux bactéries qui y participent un habitat plus large et leur confère une résistance accrue aux agents antimicrobiens et aux défenses de l'hôte (132).

La formation de la plaque dentaire peut être décomposée en quatre étapes :

- **La pellicule exogène acquise (PEA)**

La PEA est un film organique qui se forme naturellement et spontanément sur les surfaces dentaires en contact avec la salive et/ou le fluide gingival.

Son épaisseur varie de 0.1 à 1 μm . Elle ne contient pas d'éléments cellulaires ni bactériens.

Elle est constituée à 98% de glycoprotéines salivaires. D'autres composantes comme des mucines, des immunoglobulines (IgA; IgG), des enzymes (amylases, peroxydases, lysozyme), et des agglutinines de haut poids moléculaire participent à sa formation. Ces composants vont être adsorbés sur les surfaces dentaires constituées d'hydroxyapatite chargée négativement (125, 133, 134).

- **Adhésion des bactéries pionnières à la PEA**

Les bactéries pionnières, aérobies strictes, sont les premières à venir se fixer sur la PEA en deux à huit heures. Il s'agit en majorité d'espèces du genre *Streptocoque* : *mitis* ; *oralis* ; *sanguinis* et du genre *Neisseria*. On retrouve également des bactéries du genre *Actinomyces*, anaérobies. La fixation irréversible des bactéries présentes à l'état planctonique dans la cavité buccale aux éléments de la PEA se fait grâce à des facteurs d'adhérence bactériens nommés adhésines permettant des liaisons type ligand/récepteur fortes et sélectives. Les bactéries pionnières vont ensuite se multiplier et servir de support pour d'autres bactéries dites colonisatrices secondaires ou tardives, en l'absence de brossage (125, 133, 135).

- **Adhésion des bactéries colonisatrices secondaires**

Les bactéries colonisatrices secondaires vont se lier aux bactéries pionnières par co-agrégation homotypique ou hétérotypique grâce aux adhésines.

Plus la plaque dentaire croît en épaisseur, plus l'oxygène s'y raréfie. Des espèces bactériennes anaérobies vont pouvoir rejoindre le biofilm: *Fusobacterium nucleatum* ; *Prevotella intermedia* ; *Capnocytophaga*... On pourra alors observer des structures spécifiques dites en « épi de maïs » ou en « écouvillon » dues à la fixation de cocci sur des bactéries filamenteuses.

A ce stade de développement, les bactéries présentes sécrètent une matrice extracellulaire composée de polymères osidiques (glycanes ; fructanes), de lipides provenant essentiellement de bactéries lysées et de protéines salivaires dégradées. Les bactéries vont peu à peu se trouver intégrées dans cette matrice qui va former un réseau tridimensionnel et permettre des échanges et des communications entre les différentes couches du biofilm (125, 133, 136, 137).

- **Adhésion des bactéries colonisatrices tertiaires**

Si le biofilm n'est pas désorganisé pendant environ 7 jours, d'autres bactéries vont s'y agréger. Il s'agit de bactéries dites colonisatrices tertiaires qui sont pour la plupart des anaérobies strictes qui vont exploiter l'environnement formé par les couches préexistantes du biofilm. Parmi ces bactéries, on retrouve des pathogènes comme *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* et *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, impliqués dans les parodontopathies (voir partie 2.3.2) (138). Dans un biofilm bactérien mature, le nombre d'espèces différentes peut atteindre 19 000 (125, 133).

2.2.2) Le tartre

Le tartre représente de la plaque dentaire minéralisée composée de phosphates de calcium et recouverte de plaque jeune non minéralisée (**figure 21**). Les premières parties de la plaque dentaire à se minéraliser sont les parois cellulaires bactériennes puis le cytoplasme. Le centre des cellules bactériennes ne se minéralise en général pas et persiste en tant que lacune dans la matrice minéralisée (139). Les bactéries minéralisées sont mortes mais recouvertes de bactéries vivantes (139). Le tartre est formé de couches successives de cristaux en forme d'aiguilles ou de lamelles orientées au hasard. La formation de ces cristaux commence 38 h après la dernière séance de détartrage/polissage si la plaque dentaire n'a pas été perturbée, par le brossage par exemple. Le tartre minéralisé est présent sur les surfaces dentaires dès le 12^e jour (60 à 80% du contenu minéral déjà présent) (125). Le tartre est situé préférentiellement sur les dents en regard de l'abouchement des ostiums des glandes salivaires principales car les minéraux nécessaires sont contenus dans la salive. Ainsi on en retrouvera en plus grandes quantités au niveau des faces linguales des incisives mandibulaires (en regard de l'ostium des glandes salivaires sublinguales et sous-mandibulaires) et au niveau de la face vestibulaire de la première molaire maxillaire (en regard de l'ostium de la glande parotide (**figure 21**))(139). Le tartre peut être

supra-gingival ou sous-gingival (140). Chez le sujet vivant, la coloration du tartre varie du brun pâle au jaune ou au brun foncé. Chez le sujet archéologique, en raison de la diagenèse, le tartre est souvent de couleur marron clair et ressemble à une pellicule de terre séchée, friable (**figure 22**) (139).



Figure 21: Tartre dentaire sur les faces linguales des incisives mandibulaires chez un sujet vivant (flèche noire). (Singh 2017).



Figure 22 : tartre dentaire sur les faces linguales des incisives mandibulaires chez un sujet archéologique de Vilarnau (IXe-XVe siècle) (R. Esclassan©).

- **Composition**

Le tartre dentaire est constitué essentiellement de minéraux :

-Sels inorganiques : principalement calcium, phosphore et magnésium organisés en structures cristallines dont l'apatite représente la forme la plus abondante.

-Traces d'autres minéraux : potassium, aluminium, zinc...

-Matières organiques : protéines, graisse, eau, lipides, débris alimentaires...

Certains auteurs ont démontrés que la composition minérale du tartre dentaire était similaire à celle de l'os (24, 125).

2.3) Les pathologies bucco-dentaires

Nous détaillons ici les processus infectieux menant à trois groupes de pathologies bucco-dentaires d'origine bactérienne : la carie, les parodontopathies et les Lésions Inflammatoires Péri-radiculaires d'Origine Endodontique (LIPOE)

2.3.1) Maladie carieuse

La carie dentaire compte parmi les maladies chroniques les plus répandues au monde affectant de 60 à 90% des enfants et la quasi-totalité des adultes (1). Elle peut toucher à la fois les dents temporaires et permanentes au niveau de leurs couronnes et/ou de leurs racines et est la première cause de pertes dentaires et de douleurs au niveau de la cavité buccale (141, 142). Elle est définie par la déminéralisation et la destruction localisée des tissus durs de la dent (émail, dentine et cément) par des produits acides bactériens issus du métabolisme de la fermentation des sucres, entraînant une diminution locale du pH (**figure 23**) (143). Le nombre de caries présentes en bouche chez un individu augmente avec l'âge. De manière générale, les molaires et les prémolaires sont plus touchées que les incisives et canines, la dent la plus atteinte étant la première molaire (144, 145). Les dents mandibulaires sont plus touchées que les dents maxillaires mais on ne note pas de différence entre le côté droit et le côté gauche (144).



Figure 23 : Carie et plaque dentaire. (C. Willmann©).

- **Progression de la maladie carieuse**

La carie dentaire est due à des déséquilibres microbiens favorisant des bactéries acidogènes (dont les produits de dégradation sont acides) et aciduriques (tolérant un milieu acide) au sein du biofilm dentaire. Elle est influencée par des facteurs intrinsèques à la cavité buccale comme la morphologie dentaire (rétention de plaque plus ou moins importante), la composition, le pH et le flux salivaire par exemple et par des facteurs extrinsèques comme l'hygiène bucco-dentaire, la fréquence de consommation de sucres ou l'exposition au fluor (143, 145, 146).

- **Surfaces amélaire saines**

Les surfaces dentaires vont d'abord être colonisées par des streptocoques dits « non *mutans* », appartenant pour la plupart au groupe « *mitis* ». Il s'agit principalement de *Streptocoques sanguinis*, *mitis* et *oralis* mais aussi d'autres genres comme *Actinomyces*, *Streptococoque mutans* représentant moins de 2% de la population initiale de Streptocoques (147). Il s'agit d'un équilibre dynamique et stable où le processus de déminéralisation est faible et peu fréquent, largement contrebalancé par la reminéralisation.

- **Lésion initiales non cavitaires « white spots »**

Si la fréquence de consommation de sucres fermentescibles augmente, ceci entraîne une acidification locale du milieu auxquelles les bactéries du groupe « non *mutans* » vont s'adapter, devenant acidogènes et aciduriques (148). Cela favorise également la colonisation par d'autres bactéries aciduriques et un changement dans l'équilibre de déminéralisation/reminéralisation des tissus durs dentaires en faveur de la déminéralisation et de l'initiation des caries (148). La proportion de *Streptocoques mutans* au niveau des lésions amélaire initiales est plus importante qu'au niveau des dents saines, cependant, ils ne sont pas majoritaires et on retrouvera en plus

grande quantités des *Streptocoques* « non *mutans* » (149). La déminéralisation de la dent peut être contrebalancée par un processus de reminéralisation quand la production d'acide diminue suite à l'épuisement du substrat en carbohydrates, si l'acidité du milieu est neutralisée par un tampon ou par l'augmentation de la concentration en calcium, phosphate ou fluor (142, 143, 148).

- **Lésions cavitaires de l'émail et de la dentine**

Elles sont caractérisées par un milieu restant acide de manière prolongée ainsi qu'une déminéralisation continue (148). La flore est principalement composée de *Streptocoques mutans* (environ 30% de la flore totale présente), de *Streptocoques* « non *mutans* » dont *Streptocoque sobrinus*, *Lactobacilles*, *Prevotellas* et *Bifidobacterium* (143, 147, 148).

Actuellement une quarantaine d'espèces présentes dans le biofilm ont été identifiées comme responsables du processus carieux (147, 150).

2.3.2) Maladie parodontale ou parodontopathie

Les parodontopathies sont des maladies inflammatoires d'origine infectieuse bactérienne affectant les tissus de soutien de la dent : le parodonte (gencive attachée, cément, desmodonte et os alvéolaire). Elles peuvent toucher uniquement le parodonte superficiel (gencive attachée), on parle alors de gingivite ou bien affecter à la fois le parodonte superficiel et profond, on parle alors de parodontite (**figure 24**) (5, 151). Les gingivites sont réversibles avec cicatrisation ad integrum, alors que les parodontites entraînent une résorption osseuse avec formation de poches entre parodonte détruit et racine dentaire ainsi que mobilités et pertes dentaires (**figures 25 et 26**) (152, 153).



Figure 24: Gingivite au niveau des dents antérieures avec oedème des papilles interdentaires (flèches blanches). (D'après Iwata 2013).

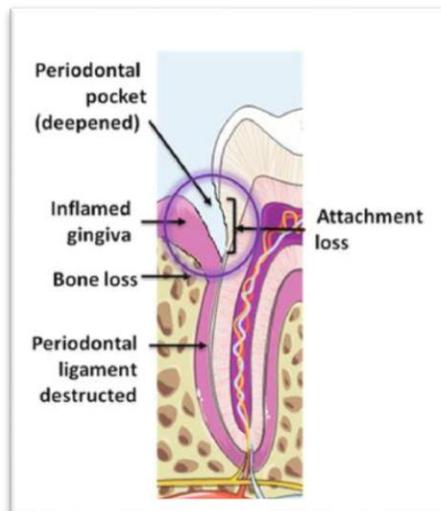


Figure 25 : Schéma d'un site atteint par une parodontite : inflammation gingivale due à la colonisation microbienne, poche parodontale en formation, perte d'attache et des structures parodontales (os alvéolaire et ligament). Le cercle violet montre le front de progression de la maladie. (D'après Trindade 2014).

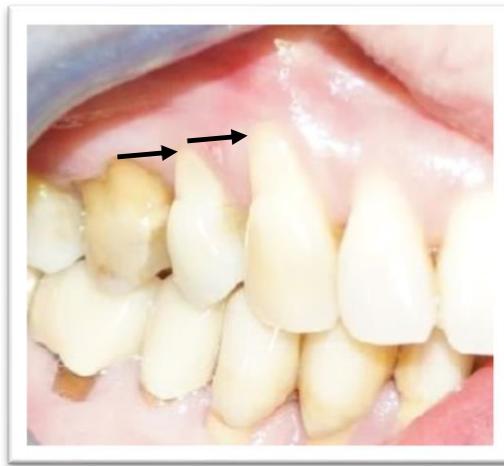


Figure 26: Zones de récession parodontale (flèches noires) chez une patiente atteinte de parodontite chronique. (C. Willmann©).

- **Progression de la maladie parodontale**

On distingue trois types de parodontites : agressives, chroniques et liées à une maladie systémique (151, 154). La prévalence des maladies parodontales est élevée dans les pays développés et également dans les pays en voie de développement. Concernant les parodontites chroniques dites « sévères », leur prévalence est de 5 à 20% à travers le monde (2, 5). La sévérité et la progression de la maladie parodontale sont liées à trois facteurs principaux : la charge bactérienne au sein de la plaque dentaire, la susceptibilité de l'hôte et l'environnement (151, 155).

- **La charge bactérienne**

Faute de nettoyage régulier, la plaque dentaire va mûrir, on peut compter plus de 10^9 bactéries sur la surface dentaire d'une dent atteinte et 10^8 au niveau d'une poche parodontale contre 10^3 chez un sujet sain (152, 156). Les proportions et quantités de bactéries anaérobies, gram-négatives, vont augmenter (156). Parmi ces bactéries, citons *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* et *Treponema denticola*, faisant partie du « complexe rouge » de Socransky

et fortement associées aux parodontites (138, 152, 155, 157, 158). Ce complexe bactérien, présent à la fois dans les parodontites chronique et dans les autres formes de parodontites, sécrète des facteurs de virulence entraînant l'inflammation des tissus parodontaux de l'hôte ainsi qu'une résorption osseuse immuno-inflammatoire (158). Dans les parodontites agressives avec destruction rapide des tissus périodontaux, on retrouve également la présence d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitens* (159).

- **La susceptibilité de l'hôte**

Face à la prolifération bactérienne, l'hôte va combiner deux types de réponses immunitaires complémentaires, humorales et cellulaires (160, 161). Ces réponses immunitaires sont le plus souvent protectrices, cependant une réponse trop forte ou trop faible peut accélérer la destruction tissulaire (152). La réponse immunitaire humorale est relativement non spécifique et est plus à même de causer des dommages aux tissus de l'hôte par augmentation de l'inflammation locale et libération d'enzymes lytiques dans l'environnement (162). La réponse cellulaire est plus spécifique mais peut également provoquer des dommages par la libération de cytokines inflammatoires (162).

- **L'environnement**

Certains facteurs environnementaux ou comportementaux, par la modification de la réponse immunitaire de l'hôte, ont un effet sur la progression des parodontopathies. Parmi ces facteurs, le plus connu est le tabagisme mais on peut également citer le stress psychologique, le déficit en calcium et vitamine D, l'ostéoporose, l'obésité ou les carences alimentaires (125, 151, 163-165). De même, les parodontopathies constituent un facteur de risque ou d'aggravation d'autres pathologies comme le diabète, les maladies cardio-vasculaires ou la polyarthrite rhumatoïde par exemple (125, 166-168).

2.3.3) Lésion Inflammatoire Péri-radulaire d'Origine Endodontique (LIPOE)

Les LIPOE sont des affections causées par la colonisation bactérienne des parois canalaire radiculaires d'une dent dont la pulpe est nécrosée (169, 170). Il s'agit de la rencontre dynamique entre les facteurs microbiens et les défenses de l'hôte, à l'interface entre la pulpe radulaire infectée et le desmodonte. Ceci entraîne localement inflammation, résorption osseuse, destruction des tissus péri-apicaux et formation de divers types de LIPOE (171). La pulpe dentaire mature n'a pas de capacité de réparation quand elle est endommagée. Une agression pulpaire provoque une réponse inflammatoire comprimant et détruisant les capillaires sanguins nourriciers et entraînant à terme la mort du tissu pulpaire (172). Le plus souvent, la nécrose pulpaire est due à une atteinte carieuse importante mais elle peut aussi être liée à un trauma, à une fracture ou à une fêlure profonde de la dent (173). Ces atteintes créent une communication entre le milieu extérieur buccal et l'endodonte, porte d'entrée pour les bactéries orales. La flore canalaire radulaire colonisatrice des dents nécrosées est constituée en grande majorité de bactéries anaérobies (>90%) (171, 174-177) appartenant aux genres *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* (171, 178). L'infection du système canalaire radulaire est due à l'interaction de plusieurs espèces bactériennes où les débits pulpaire nécrotiques et les produits de dégradation de certaines bactéries peuvent permettre l'alimentation des autres dans un système de co-colonisation (179-181). Plus il y aura de souches bactériennes dans le canal et plus la réaction inflammatoire sera importante (180, 181). Une fois la colonisation bactérienne établie dans un canal radulaire, le nombre de bactéries va croître graduellement (180, 181). Les bactéries peuvent ensuite gagner l'apex de la dent ainsi que les tissus parodontaux et entraîner une réponse inflammatoire locale, le plus souvent chronique et asymptomatique, objectivée par une lyse osseuse péri-apicale radio-visible (**figure 27**) (179, 182). L'abcès péri-apical est la forme la plus symptomatique de l'infection, elle entraîne de fortes douleurs et une tuméfaction (169).

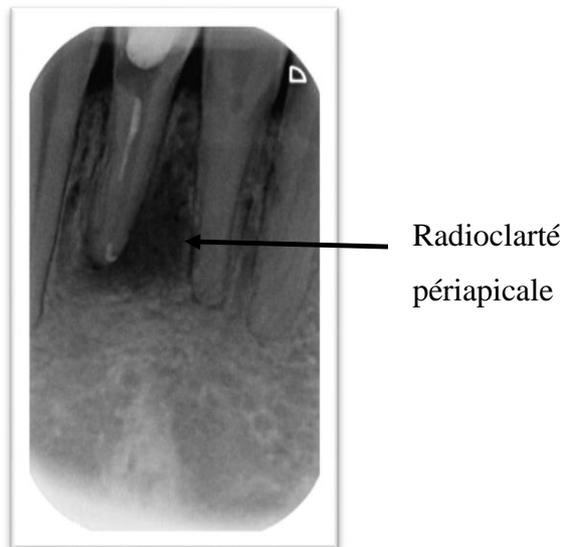


Figure 27: Radiographie rétroalvéolaire d'une dent présentant une radioclaré péri-apicale. (C. Willmann©).

- **Granulome**

Les réactions d'autolyse au niveau de la pulpe nécrotique relarguent des produits de dégradation dans le milieu provoquant une réponse inflammatoire au niveau des tissus mous autour de l'apex et formant une lésion initiale ou granulome (172). Il contient des cellules inflammatoires (polymorphonucléaires, lymphocytes, etc.) ainsi que des ostéoblastes, ostéoclastes, cellules épithéliales et débris cellulaires entourés d'une capsule fibreuse (183). Les cellules immunitaires de l'hôte ne pouvant atteindre le canal radiculaire pour éliminer les débris nécrotiques faute de vascularisation, la lésion va persister si aucun traitement canalaire n'est réalisé. De plus, la formation du granulome stimule l'activité ostéoclastique créant une cavité osseuse aux parois lisses que la croissance du granulome vient peu à peu combler (183, 184). La déficience en nutriments due à une diminution de l'apport sanguin au niveau des couches les plus internes entraîne une nécrose de la partie centrale du granulome, à l'origine de la formation d'une cavité liquidienne kystique formant un kyste péri-apical (171, 180, 181).

- **Kyste péri-apical**

Il représente l'évolution chronique d'un granulome non traité et est généralement plus volumineux. Un kyste est constitué d'une paroi épithéliale interne délimitée par une capsule fibreuse externe et rempli en son centre de liquide kystique comprenant débris nécrotiques, cristaux de cholestérol et leucocytes (145, 170). Il peut être en communication (kyste poche) ou non (kyste vrai) avec l'apex de la dent nécrosée (170, 171, 180, 181).

La plupart des granulomes et kystes péri-apicaux sont initialement asymptomatiques car non colonisés par des bactéries orales qui sont cantonnées au canal radiculaire (184). La région péri-apicale peut être considérée comme une interface en équilibre dynamique entre microbes et défenses de l'hôte (180, 185). A tout moment, cet équilibre peut être rompu et la lésion peut devenir symptomatique, formant un abcès péri-apical.

- **Abcès péri-apical**

Il est dû à l'augmentation de la charge bactérienne intra-canalair et péri-apicale. La dent infectée devient symptomatique : douleur intense, légère extrusion hors de l'alvéole dentaire, tuméfaction et résorption osseuse rapide (169, 171, 181, 184). Histologiquement, la cavité kystique devient purulente, le pus envahit ensuite les trabéculations osseuses et les tissus mous, cherchant le trajet de moindre résistance pour s'extérioriser. Si l'abcès se chronicise, l'activité ostéoclastique aboutit à la formation d'un canal osseux de drainage s'abouchant au niveau de la peau ou de la muqueuse orale et appelé fistule (181). Sur os sec, la présence d'un tel canal indique donc la présence d'un abcès péri-apical chronique (voir chapitre 3) (181). Un abcès péri-apical, aigu ou chronique, ne progresse pas de façon linéaire mais évolue par poussées espacées de périodes de stabilité (171, 181, 184).

Chapitre 3 : Pathologies bucco-dentaires et sujets anciens

Les critères de diagnostic concernant les pathologies bucco-dentaires sur des sujets archéologiques s'avèrent différents de ceux recherchés sur les sujets actuels pour plusieurs raisons notamment des phénomènes taphonomiques pouvant entraîner des erreurs de diagnostic ou priver le praticien d'informations utiles (colorations, pertes dentaires *post-mortem*, dégradation des parties molles, etc.) (186, 187).

3.1) Méthodes d'investigations

3.1.1) Le tartre

Il s'agit de plaque dentaire minéralisée, il est ubiquitaire et les quantités retrouvées varient en fonction des individus. Le plus souvent, le tartre est situé au niveau du collet des dents, correspondant à la ligne gingivale chez le sujet vivant (voir chapitre 2) (139, 188). Il est prélevable sur les dents anciennes par grattage de leur surface (poudre) à l'aide d'un instrument CK6, ou par décollement de plaques de tartre entières, sans endommager la dent support (**figure 28**).



Figure 28 : Recueil d'un échantillon de tartre dentaire (flèche noire) au CK6 sur une dent ancienne. (C. Willmann©).

Le tartre ancien est mentionné dans les études archéologiques dès 1925, cependant, les premières études le concernant datent de la fin des années 80 et du début des années 90 (140, 189, 190). De nombreux travaux en microscopie électronique à balayage révèlent qu'il contient une grande diversité de microorganismes et de particules alimentaires bien préservés au sein de sa matrice minéralisée (140, 189, 190). A partir des années 2010, des analyses isotopiques et par pyrolyse associées à la spectrométrie de masse permettent de mettre en évidence des particules d'amidon ainsi que des fibres textiles donnant des renseignements sur le mode de vie des populations du passé (191, 192). En 2011, pour la première fois, la présence d'ADN bactérien ancien préservé dans le tartre dentaire est confirmée puis, en 2012, *Streptococcus mutans* et d'autres taxa sont mis en évidence spécifiquement ainsi que de l'ADN humain mitochondrial grâce aux techniques de PCR (24, 190, 193, 194). En 2013, Adler, par une technique de NGS (barcoding) a montré que le tartre ancien préserve les microbiomes oraux et permet de connaître leur évolution en fonction des changements de modes de vie humains (voir partie 3.2). Ainsi, deux changements dans la composition des microbiomes anciens ont été mis

en évidence, le premier correspondant au développement de l'agriculture et le second à la révolution industrielle (24, 84).

3.1.2) Les caries

Les dents étant fortement minéralisées et résistantes à la dégradation physico-chimique au niveau de leur partie amélaire, l'étude des caries, en ce qui concerne leur forme, se rapproche de ce qu'elle pourrait-être chez le sujet vivant (7, 195). Concernant leur couleur, dans leurs stades initiaux, les caries varient en teinte du blanc au jaune pour les caries radiculaires ou au brun pour les caries coronaires (**figure 29**) (141).



Figure 29 : Caries occluso-mésiale et occluso-distale chez un sujet médiéval d'Aimargues. (E. Coudrais©).

- **Diagnostic**

La détection des caries se fait de différentes manières, la plus simple étant à l'œil nu ou à l'aide d'un stéréo microscope sous un bon éclairage. Une sonde pointue peut aussi être utilisée, elle permet d'apprécier la dureté d'une lésion ou de mettre en évidence certaines zones de déminéralisation, rugueuses, où la pointe de la sonde va être retenue. Hillson a suggéré également l'utilisation de la transillumination par fibre optique (mettant en évidence, en noir, les déminéralisations dentinaires), la fluorescence laser (différente entre tissu sain et tissu

carieux) ainsi que la mesure de la résistance électrique (diminuée dans un tissu carieux) (144). La radiographie permet quant à elle de diagnostiquer les caries à un stade plus avancé. Selon Rudney 1983, les caries coronaires se définissent radiologiquement par une radioclarité située au contact de la dent et pénétrant l'émail sur au moins la moitié de son épaisseur. Les caries radiculaires présentent quant à elles une radioclarité située à la jonction amélo-cémentaire aux bords nettement définis (**figure 30**) (196). La localisation de la carie sur la dent ainsi que son étendue sont notées (7, 144).

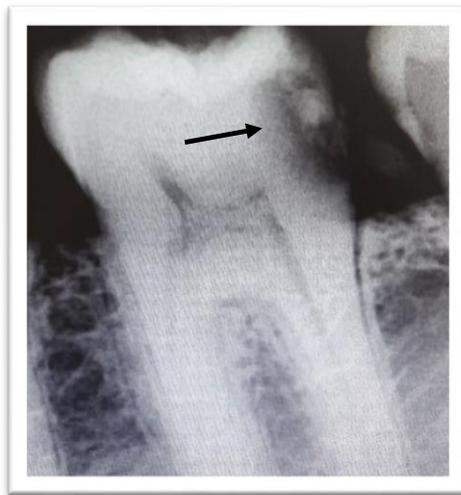


Figure 30 : Radiographie rétro-alvéolaire d'une carie dentaire située sur la face distale d'une molaire mandibulaire (dent 36). (C. Willmann©).

- **Spécificités chez le sujet archéologique**

Le diagnostic des caries bucco-dentaires chez les sujets archéologiques nécessite cependant la prise en compte des phénomènes taphonomiques, comme la déshydratation dentinaire par exemple, donnant une impression de dureté lors de l'exploration à la sonde, différente du vivant. De même, à l'examen radiologique, l'usure ou les fractures amélares peuvent produire des artefacts entraînant des erreurs de diagnostic (196). Les colorations amélo-dentaires sans cavitations ne peuvent pas être classées comme des lésions carieuses car ces « pseudo-carie » peuvent être produites après la mort par des microorganismes acidogènes (144, 197). Enfin, les

lésions carieuses ne doivent pas être confondues avec l'attrition (usure due au frottement dent contre dent), l'abrasion (causée par le contact répété des dents avec des aliments ou corps étrangers durs) et l'érosion (causée par l'acidité du milieu buccal) (7, 198). Chez les populations archéologiques, l'attrition était plus importante que chez les populations actuelles, due aux régimes alimentaires, plus riches en éléments durs et fibreux ainsi qu'à la présence de gravillons dans la farine (**figure 31**) (7). Le phénomène d'attrition dans les populations anciennes réduit le nombre de caries observables. Les dents étant usées avant que la carie n'ait le temps de se former (199). De manière générale, on observe une augmentation du nombre de caries dans les populations Néolithiques, avec le passage d'une alimentation de chasseur-cueilleur (riche en protéines) à une alimentation de cultivateur (riche en céréales), puis au moment de la Révolution Industrielle, avec l'arrivée des sucres raffinés transformés industriellement dans l'alimentation (24, 195, 200, 201).



Figure 31 : Forte abrasion au niveau des faces occlusales des molaires mandibulaires d'un sujet Néolithique. (N. Saenz©).

3.1.3) Les parodontopathies

- **Diagnostic**

Les parodontopathies sont des maladies inflammatoires d'origine infectieuse affectant les tissus qui entourent et maintiennent les dents dans leurs alvéoles osseuses, elles regroupent les gingivites et les parodontites (voir chapitre 2.3.2) (202).

- **Spécificités chez le sujet archéologique**

Chez le sujet archéologique, les critères de diagnostic basés sur les tissus mous deviennent inutilisables à cause de la dégradation des corps, alors que le diagnostic chez le sujet vivant renvoie à des critères non accessibles en archéologie (voir chapitre 2.3.2). Les phénomènes taphonomiques peuvent entraîner des erreurs de diagnostic : les pertes dentaires *post-mortem*, survenant principalement sur les dents monoradiculées (du fait de leur moindre ancrage dans l'os alvéolaire) peuvent être confondues avec les pertes dentaires liées aux parodontites (7, 186). De même, des fractures *post-mortem* au niveau des corticales osseuses peuvent mimer une récession alvéolaire. Il existe également des lacunes osseuses anatomiques en forme de « V », appelés déhiscences qui s'étendent le long des racines dentaires et qui peuvent mimer une perte osseuse parodontale (**figure 32**) (144).



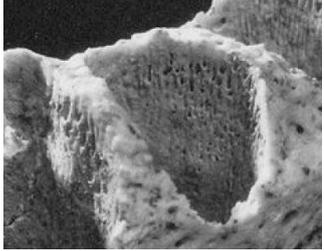
*Figure 32 : Déhiscence osseuse en regard d'une incisive mandibulaire (flèche noire).
(D'après R. Esclassan© 2009).*

Les classifications permettant d'évaluer l'atteinte parodontale chez le sujet archéologique se sont d'abord basées sur la résorption osseuse et le degré d'exposition radiculaire mais ce critère était subjectif (203, 204). Les auteurs ont ensuite mesuré la distance séparant la jonction amélo-cémentaire (où se place la gencive chez le sujet vivant) et l'os alvéolaire pour quantifier la perte d'attache (128, 204-208). Cependant cette méthode ne tient pas compte du phénomène d'éruption compensatoire liée à l'attrition des faces occlusales et bords incisifs des dents. Ce phénomène entraîne une migration occlusale de la jonction amélo-cémentaire et une exposition radiculaire pouvant être confondues avec une perte osseuse liée à une parodontite (**figure 33**) (209).



Figure 33 : Eruption dentaire continue, compensatrice de l'abrasion de la partie coronaire de la dent. (N. Saenz©).

D'autres classifications sont basées sur la morphologie et la texture de l'os alvéolaire (204, 210). Parmi ces dernières, la classification de Kerr (**Tableau 2**) est une des plus utilisées, elle repose sur l'examen de la forme et de la texture des septa interdentaires* et leur modification en fonction du degré d'atteinte parodontale (153, 172, 209, 211). Une corrélation a été établie par l'auteur entre l'aspect histologique du tissu osseux chez le sujet vivant, l'aspect histologique chez le sujet ancien et le degré d'atteinte parodontale. Kerr définit 5 catégories de lésions en fonction de l'atteinte parodontale : la catégorie 1 correspond à un parodonte sain, la catégorie 2 correspond à la gingivite et les catégories 3, 4 et 5 correspondent à la parodontite. Selon Kerr, la catégorie 3 correspond à une parodontite en phase aiguë, la catégorie 4 à une parodontite en phase chronique ayant été aiguë par le passé et la catégorie 5 à un défaut osseux angulaire signe d'une lésion agressive en phase aiguë ou chronique (153, 204). Cette méthode permet de répertorier plus objectivement les atteintes parodontales dans les populations du passé.

Catégorie	Contour et texture de l'os alvéolaire	Etat parodontal	Aspect clinique
0	Non mesurable. Dents perdues antemortem ou septa endommagés <i>post-mortem</i> .	Non mesurable.	
1	Forme des septa caractéristique. Corticales osseuses lisses et non interrompues par des creux ou des invaginations. Catégorie souvent retrouvée chez les juvéniles.	Sain.	

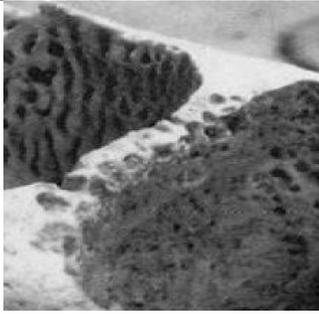
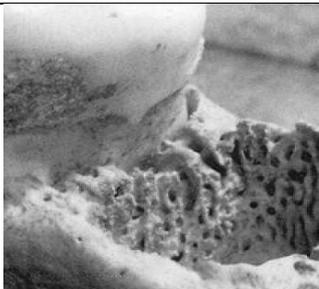
2	Forme des septa caractéristique. Corticales osseuses présentant de petits foramen, des rainures ou des crêtes.	Gingivite ou parodontite dans une phase quiescente ou de cicatrisation.	
3	Perte osseuse septale unique s'étendant en vestibulo-lingual ou sous forme de deux aires de destruction osseuse plus petites. Le défaut osseux a un aspect aigu et irrégulier.	Zone de parodontite active associée à une résorption osseuse.	
4	Perte osseuse septale ayant les mêmes limites que la catégorie 3. Le défaut osseux prend la forme d'une alvéole lisse ou poreuse où les défauts de structure paraissent moins saillants que dans la catégorie 3.	Zone de parodontite contrôlée, stable ou quiescente.	
5	Présence d'un défaut osseux profond angulaire, dont les bords sont inclinés à 45° et dont la profondeur est de 3 mm ou plus. Sa surface peut être aiguë et saillante ou arrondie et lisse.	Site étant ou ayant été une zone de perte osseuse parodontale rapide et agressive.	

Tableau 2 : Classification et photos, Kerr 1988.

3.1.4) Lésion inflammatoire péri-radriculaire d'origine endodontique (LIPOE)

Les LIPOE sont des lésions de type inflammatoire qui affectent l'os alvéolaire en regard de l'apex d'une dent dont la pulpe est nécrosée. Elles peuvent être de type granulomateuses ou

kystiques, asymptomatiques, ou prendre la forme d'abcès péri-apicaux symptomatiques (voir partie 2.3.3).

- **Diagnostic**

Chez les sujets anciens, les auteurs ont cherché à différencier granulomes et kystes en fonction de leur taille (144, 184). Les kystes sont considérés comme étant plus larges que les granulomes, cependant, il n'y a pas de consensus. De manière générale, peu de granulomes montrent une radioclarité supérieure à 25 mm de diamètre et la plupart des kystes ont une radioclarité supérieure à 15mm de diamètre (144, 210).

Les auteurs ont également cherché à différencier les kystes et les granulomes en fonction de l'aspect radiologique des bords de la lésion. Mais des études sur des sujets vivants, comparant aspect radiologique et nature histologique des lésions n'ont pas montré de corrélation entre aspect des bords et nature de la lésion (212, 213).

- **Spécificités chez le sujet archéologique**

Chez le sujet archéologique, le diagnostic des LIPOE repose sur l'aspect macroscopique et radiologique des lésions. Au niveau macroscopique, à l'examen visuel, on relève une cavité osseuse aux bords réguliers qu'il faut différencier d'une fenestration (lacune arrondie de l'os alvéolaire mettant à jour la partie radiculaire d'une dent ou d'une fracture osseuse *post-mortem* (**figure 34 et 35**) (139, 214).



Figure 34 : Cavités de granulome/kyste en regard des apex des première et deuxième molaires maxillaires. (D'après Ogden 2008).



Figure 35 : Fenestration osseuse non pathologique en regard des apex de la première molaire maxillaire. (D'après Ogden 2008, modifié).

La perte osseuse liée à un granulome ou un kyste forme une lacune dans l'os en regard du foramen apical d'une dent dont la pulpe est nécrosée, le plus souvent suite à une carie profonde ou une fracture coronaire ou radiculaire. Plus rarement, la résorption osseuse liée à un abcès péri-apical chronique peut entraîner une communication avec le sinus maxillaire, fistule par laquelle le pus viendra se drainer (voir partie 2.3.3). De même, les abcès péri-apicaux situés sur des molaires mandibulaires peuvent exceptionnellement se drainer à travers la branche montante mandibulaire, formant des abcès submassétériques (214). Cependant, un abcès aigu peut ne pas former de voie de drainage dans l'os si la mort du sujet survient avant que le phénomène de résorption osseuse ait pu aboutir ou bien si le pus se draine à travers le canal radiculaire et la chambre pulpaire ouverte ou le desmodonte (139, 172). A la mandibule, les corticales osseuses sont plus épaisses qu'au maxillaire et une LIPOE peut rester intra-osseuse sans aucun signe extérieur au niveau de l'os alvéolaire, d'où l'intérêt de la radiographie en complément de l'examen macroscopique pour dépister ces lésions (172).

- **Critères de diagnostic macroscopique d'après Ogden (2008)**

Ogden et collègues ont émis 4 critères de diagnostic macroscopique permettant de reconnaître une LIPOE (**figure 36**) (172):

1 : La lésion doit s'étendre sur (ou incorporer) le/les apex(s) d'une ou plusieurs dents. Si l'apex n'est pas impliqué, il peut éventuellement s'agir d'un canal accessoire nécrosé ou bien plus probablement des manifestations buccales d'une atteinte systémique (myélome multiple, carcinome métaplasique...) et d'autres lésions identiques sont retrouvées ailleurs sur le squelette.

2 : D'après Dias et Tayles 1997, la taille d'un granulome est en général autour de 2-3 mm de diamètre, au-delà, il s'agit plus probablement d'un kyste. Les rebords osseux sont arrondis, lisses et réguliers (184).

3 : Bien que lisse, la surface de la lacune présente des porosités liées au passage des capillaires sanguins en direction de la lésion. Moins la lacune est poreuse, plus il est probable que la lésion ait été un kyste entouré d'une membrane périphérique.

4 : Une lacune présentant des bords fins et aigus aux endroits où elle est en contact avec la corticale osseuse alvéolaire indique la présence d'un granulome non infecté. Si, à l'inverse, les bords sont plus arrondis ou épaissis et que l'os périphérique a été remodelé et présente un halo d'os néoformé autour de l'orifice de la lésion, il s'agit d'un abcès chronique ayant sécrété du pus sur une longue période.

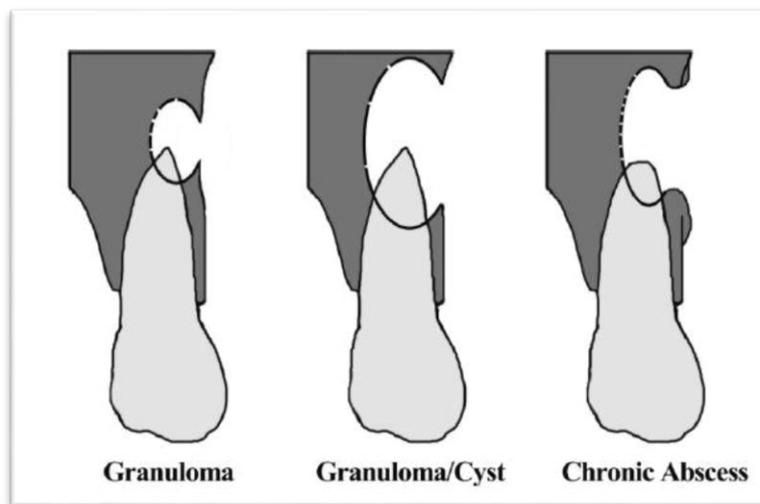


Figure 36 : Caractéristiques d'un granulome, d'un granulome/kyste et d'un abcès péri-apical. Le granulome est en général de plus petit diamètre que le kyste. Granulome et kyste présentent des parois osseuses fines et aiguës. Les parois osseuses entourant un abcès péri-apical sont plus épaisses et souvent bordées d'un halo d'os néoformé. Le fond de la cavité de résorption est très poreux pour les granulomes et les abcès péri-apicaux et peu poreux pour les kystes. (D'après Ogden 2008).

Une LIPOE, combinée au phénomène d'éruption continue ainsi qu'à une parodontite peut entraîner la perte de la dent atteinte (144).

3.2) Microbiomes retrouvés dans les pathologies bucco-dentaires chez les sujets archéologiques, la métagénomique “buccale”.

3.2.1) Etat de l’art

L'application des NGS au microbiome oral et la comparaison à des bases de données telles que le Human Microbiome Project* (HMP : <http://nihroadmap.nih.gov/hmp>) a permis de caractériser les communautés microbiennes humaines dans leur habitat, dont la cavité orale, ainsi que la biodiversité microbienne et les pathologies qui leurs sont associées (215). Parallèlement, les chercheurs se sont intéressés aux pathologies bucco-dentaires retrouvées chez les populations du passé et aux moyens d’accéder aux bactéries anciennes, notamment grâce à l’étude du tartre dentaire.

En 2013, pour la première fois, Adler et collègues appliquent le metabarcoding et le séquençage haut débit (pyroséquençage) à des échantillons de tartre dentaire de sujets de la période du mésolithique jusqu’à l’époque actuelle, couvrant ainsi 7500 ans d’histoire humaine (24). L’étude montre, principalement à partir de séquences de la région V3 du gène 16S, que la diversité microbienne orale au niveau des Unités Taxonomiques Opérationnelles* (OTU) a diminué à l’époque moderne par rapport au néolithique et au mésolithique. Cependant, l’analyse n’a été réalisée que pour les bactéries gram positives. De plus, des amplifications spécifiques de séquences de *Porphyromonas gingivalis* et de *Streptococcus mutans* montreraient une fréquence croissante dans les échantillons, depuis la période néolithique pour le premier, et pendant la révolution industrielle pour le second (**figure 37**).

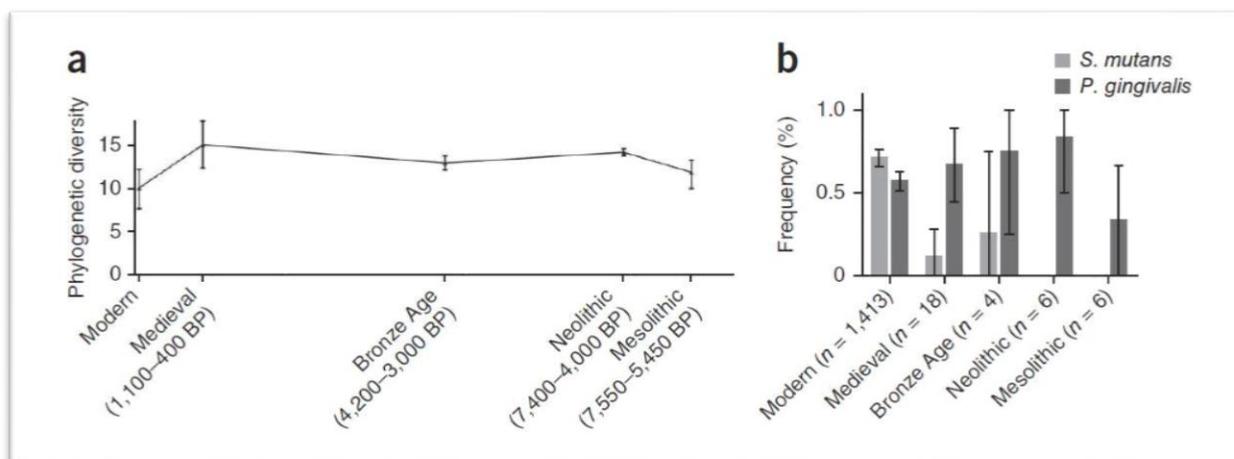


Figure 37 : Changements au niveau du microbiome oral en termes de diversité et de composition. a) Evolution de la diversité microbienne au niveau de la région V3 pour les bactéries gram positives contenues dans les échantillons anciens et modernes. b) Fréquence de *Streptococcus mutans* et *Porphyromonas gingivalis*, obtenues grâce à des amorces spécifiques de séquences cibles de ces bactéries, dans les différents échantillons (D'après Adler 2013).

Les auteurs ont proposé une corrélation entre ces changements et l'évolution des régimes alimentaires : d'abord pendant la transition néolithique avec le début de l'agriculture à l'origine d'une plus grande consommation de céréales et donc de carbohydrates, puis, au moment de la révolution industrielle avec l'introduction dans l'alimentation de sucres et farines raffinés transformés de façon industrielle. Ces changements entraînant une transition d'un microbiome oral équilibré et pauvre en bactéries pathogènes vers un microbiome déséquilibré en faveur de bactéries cariogènes et parodontopathogènes. Cette interprétation semble cohérente avec les observations macroscopiques retrouvées dans les séries archéologiques d'Adler et collègues. Malheureusement, ces données archéologiques sont inconnues pour les populations néolithiques et de l'Age de Bronze échantillonnées dans cet article et ne peuvent donc pas être complètement affirmées.

En 2014, Warinner et collègues sont allés plus loin dans l'analyse du microbiome oral en adoptant une approche microscopique, métagénomique (shotgun et metabarcoding) et métaprotéomique à partir de quatre échantillons de tartre médiéval (25). Cette étude a ciblé

ainsi différentes molécules : ADN microbien, protéines humaines et bactériennes, macromolécules animales et végétales. Concernant l'ADN ancien bactérien, les auteurs ont identifié des pathogènes oraux spécifiques à partir des données issues du séquençage NGS, ils retrouvent par exemple le complexe rouge de Socransky impliqué dans les maladies parodontales : *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* et *Treponema denticola* à une fréquence plus élevée que dans 95% de la plaque dentaire issue d'une cohorte saine contemporaine du Human Microbiome Project*.

Ils sont parvenus également à reconstruire le génome du pathogène parodontal *Tannerella forsythia* à la période médiévale avec une profondeur moyenne de 5,7x et une couverture du génome de 91%. La comparaison avec la souche contemporaine de référence du génome de *Tannerella forsythia*, ATCC 43037, utilisée pour l'alignement, a montré que 53 gènes, correspondant à un transposon* contenant des gènes de résistance à la tétracycline, étaient absents du génome médiéval. Ceci suggère que cette résistance aux tétracyclines a été acquise par *Tannerella forsythia* plus tardivement pour ce groupe médiéval et dans ce site géographique **(figure 38)**.

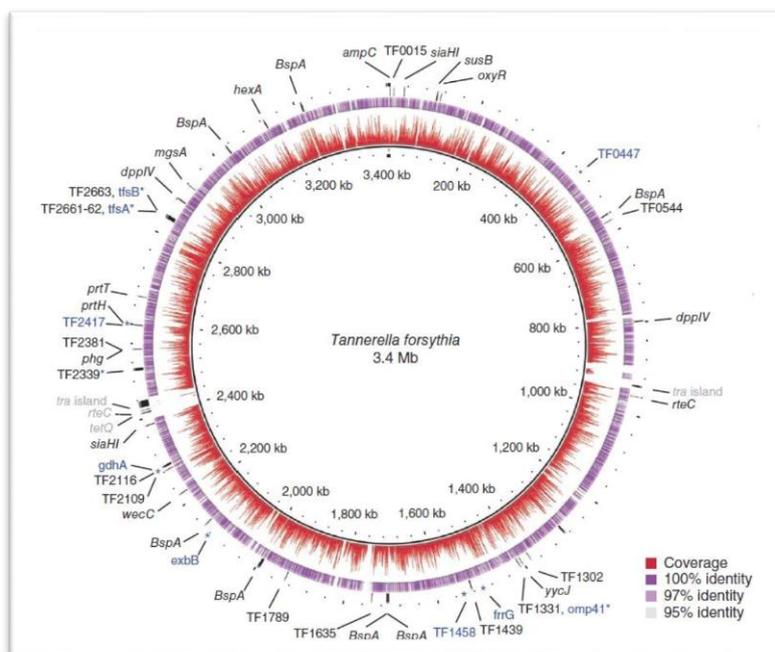


Figure 38 : Reconstruction du génome de *Tannerella forsythia* par rapport à une souche moderne de référence ATCC 43037, la couverture du génome est représentée en rouge et le pourcentage d'homologie en violet. On note l'absence de deux facteurs de virulence « tra island » responsable de la résistance aux tétracyclines, en gris (D'après Warinner 2014).

En 2015, Ziesemer et collègues ont adopté une approche meta-taxonomique pour caractériser le microbiome oral du tartre dentaire ancien (190). Les auteurs ont comparé les données obtenues par barcoding à partir d'une amplification ciblée de régions codantes pour l'ARNr 16S, et plus précisément de la région hypervariable V3 (amorces universelles), avec les données obtenues par shotgun sur quatre échantillons de tartre ancien. Les auteurs ont mis en évidence que les polymorphismes de grande longueur au niveau de la région V3 ainsi que la petite taille des fragments d'ADN anciens entraînent très fréquemment une amplification différentielle (favorisant l'amplification des fragments de petite taille) à l'origine d'erreurs d'assignation taxonomique, faussant ainsi la reconstruction des microbiomes anciens basée sur le séquençage d'amplicons. Les auteurs ont conclu que les biais d'amplification systématiques rendent imprécises les tentatives d'assignation taxonomique issues de données générées par des amplicons d'ARNr 16S V3, avec des amorces universelles. L'analyse *in silico** d'autres régions hypervariables montrant les mêmes biais, les auteurs ont conseillé l'approche shotgun

pour la reconstruction des microbiomes oraux anciens. L'approche shotgun n'est pas affectée par la petite taille des fragments anciens ni par les polymorphismes au niveau de certains loci puisque la technique ne cible pas une région particulière. Après amplification et séquençage shotgun, les données issues des régions codantes pour l'ARNr 16S peuvent être filtrées et analysées pour permettre une assignation taxonomique. Ceci permet d'éviter les biais liés à la fragmentation et aux polymorphismes lors de l'amplification PCR, tout en profitant de riches bases de données comparatives disponibles pour les séquences de gènes d'ARNr 16S. Cependant certains taxa très proches ne peuvent pas être différenciés avec cette méthode car les gènes codant pour l'ARNr 16S sont très conservés d'une espèce à l'autre (26).

En 2017, Weyrich et collègues ont essayé de déterminer s'il était possible d'avoir accès à l'alimentation de sujets néandertaliens par l'analyse de l'ADN bactérien endogène contenu dans le tartre dentaire. Ils ont appliqué le shotgun au microbiome oral contenu dans le tartre dentaire de cinq sujets néandertaliens, d'un chimpanzé sauvage et d'un humain actuel. Ils ont identifié, chez un des sujets néandertaliens (SPY II), quelques reads correspondant à de la viande et ont supposé une alimentation carnée. Ils ont ensuite comparé les résultats obtenus au microbiome oral retrouvé dans le tartre dentaire de sujets humains archéologiques de différentes époques, aux modes de vie et à l'alimentation différente (chasseur-cueilleur, cueilleur, agriculteur ancien) (216). Trois sujets néandertaliens ont finalement été retenus pour l'analyse métagénomique : un, SPY II pour lequel une alimentation carnée était supposée et deux (El Sidron 1 et El Sidron 2) pour lesquels elle n'était pas supposée (les données obtenues pour les deux autres individus n'étaient pas exploitables). Les résultats préliminaires tendaient à montrer que le microbiome oral des néandertaliens était plus proche de celui du chimpanzé et des cueilleurs que de l'humain moderne pour El Sidron 1 et El Sidron 2 ne consommant pas de viande. La composition du microbiome oral de SPY II, consommant de la viande, se rapprochait plus de celui des chasseurs-cueilleurs et de l'Homme moderne. Ces résultats préliminaires

portent sur un petit nombre d'individus et certains taxa bactériens peuvent avoir été sur ou sous représentés lors les analyses, du fait de biais survenus pendant des étapes d'amplification, de séquençage et de traitement des données. De plus, le nombre de reads identifiant la viande chez SPY II est très faible et ne permet que des suppositions quant à une alimentation carnée (**figure 39**).

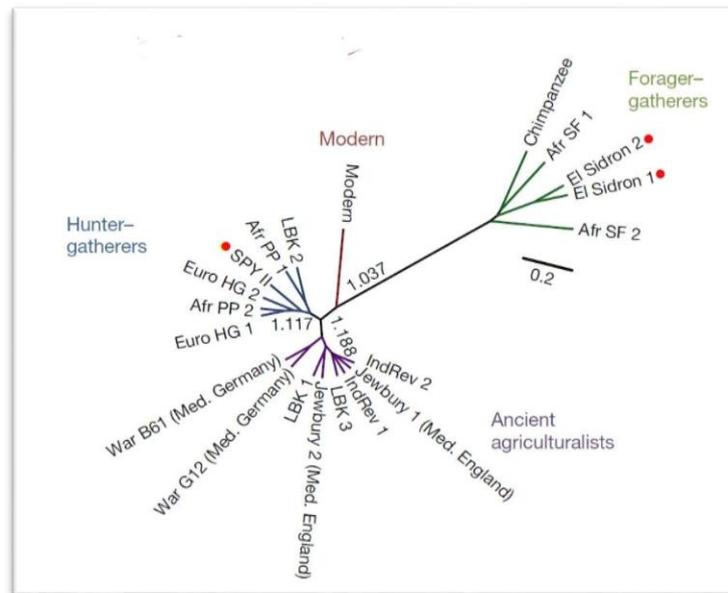


Figure 39 : Regroupement UPGMA* des distances de Bray-Curtis* pour 22 métagénomes oraux issus de sujets modernes, de chasseurs-cueilleurs, d'agriculteurs anciens et de cueilleurs, révélant une corrélation avec la consommation de viande. Les sujets néandertaliens sont indiqués par un point rouge (D'après Weyrich 2016, modifié).

Les données métagénomiques d'un des individus (El Sidron I) ont également permis de reconstruire le plus ancien génome microbien quasi-complet à ce jour, celui de *Methanobrevibacter oralis*, bactérie archée commensale, daté d'environ 48 000 ans avec une profondeur moyenne de 10,2x. Les auteurs ont également identifié les pathogènes *Streptococcus mutans* (0.08%–0.18%) ainsi que les membres du « complexe rouge » de Socransky [*Porphyromonas gingivalis* (0–0.52%), *Tannerella forsythia* (0.05–2.4%); *Treponema denticola* (0–1.87%)].

En 2018, Mann et collègues ont comparé les données métagénomiques issues du séquençage shotgun de 48 individus, avec un double échantillonnage pour chacun de dentine et de tartre dentaire, d'une période allant de - 3000 JC à nos jours (27). Les résultats ont montré que le tartre fournit un environnement favorable à la préservation à long terme de l'ADN endogène, retrouvé en plus grande quantité et moins contaminé par de l'ADN environnemental que dans la dentine. La majorité de l'ADN endogène du tartre est microbienne et provient du microbiome oral. L'ADN contenu dans la dentine provient majoritairement de l'environnement, quel que soient les conditions taphonomiques et la période temporelle, mais contient cependant des bactéries orales de l'hôte. Pour un sous-ensemble d'échantillons dentinaires (15,21 %), les bactéries orales représentent plus de 20 % de l'ADN total. Bien que répandu, le tartre dentaire n'est pas toujours présent ou préservé dans les collections archéologiques : il peut être peu abondant voire absent chez certains individus ou avoir été détruit. Il est alors possible d'accéder à certains aspects du microbiome oral grâce la dentine, servant ainsi de source alternative d'ADN bactérien oral en l'absence de dépôts de tartre dentaire conservés.

3.2.2) Recommandations et critères à respecter concernant le travail en ADN ancien microbien

En 2017, Warinner et collègues ont publié des recommandations visant à établir une norme et un cadre communs de recherche concernant l'étude génétique des pathogènes anciens (**tableau 3**) (26). Certains des critères énoncés par Cooper et Poinar sont repris tandis que d'autres sont spécifiques aux analyses microbiennes, **sept points** sont à retenir :

- 1) Le travail sur les microbes anciens doit être effectué dans des laboratoires d'ADN ancien dédiés afin de minimiser et contrôler la contamination.
- 2) Les approches méta-taxonomiques diffèrent dans leurs théories et leurs biais et les résultats de ces analyses doivent être interprétés en tenant compte de ces facteurs. Les paramètres, les protocoles et les bases de données doivent être aussi homogènes que possible afin de minimiser

les variations dues à la technique employée. Les approches pour lesquelles il a été démontré des résultats taxonomiques biaisés concernant les échantillons d'ADN dégradés, comme le séquençage d'amplicons de gènes de l'ARNr 16S, ne sont pas recommandées pour les analyses quantitatives.

3) Le mapping sur la séquence d'un génome de référence ne suffit pas à lui seul à l'identification taxonomique au niveau de l'espèce. Le mapping doit être compétitif (plus d'un génome de référence possible) et doit prendre en compte le fait que l'échantillon ait été produit par métagénomique. Certains *loci* sont plus informatifs phylogénétiquement que d'autres. En général, les éléments mobiles ne sont pas recommandés pour l'identification taxonomique et ne devraient être utilisés qu'avec prudence et au cas par cas.

4) L'identification des espèces microbiennes nécessite de multiples validations, qui peuvent inclure, sans s'y limiter, les éléments suivants : uniformité dans la couverture du génome, similarité génétique et haploïdie.

5) Les dommages de l'ADN doivent être évalués. L'ADN microbien ancien doit présenter un profil caractéristique de fragmentation et de dégradation. Cependant, les dommages subis peuvent varier selon le contexte archéologique et l'espèce bactérienne. Le profil de dégradation variera également en fonction du protocole de laboratoire et des enzymes utilisées pour construire les bibliothèques.

6) Pour les échantillons contenant des microbiomes anciens, tels que le tartre dentaire et les paléofèces, la composition des communautés microbiennes doit être testée et la plausibilité biologique doit être évaluée avant analyse. Les analyses de diversité et les comparaisons entre différentes communautés microbiennes doivent être effectuées avec prudence et uniquement sur des échantillons bien conservés, sinon les résultats seront plus instructifs sur le processus de décomposition que sur le microbiome endogène de l'individu.

7) Enfin, les questions et les hypothèses de recherche concernant les microbes anciens doivent être biologiquement étayées. L'archéologie microbienne est un domaine émergent qui fait appel à l'expertise de chercheurs ayant reçu une formation dans de multiples disciplines comme l'archéologie, l'anthropologie, la microbiologie, la biologie computationnelle, la génétique des populations, la médecine, etc. Interdisciplinarité, communication et collaboration sont essentielles pour développer un cadre de recherche fiable en archéologie microbienne.

To guide future research in microbial archaeology, we propose the following standards and precautions:

1. Dedicated aDNA laboratories are necessary to minimize and manage contamination.
2. Metataxonomic approaches differ in their assumptions and biases, and the results of these analyses should be interpreted with these factors in mind. Parameters, protocols, and databases should be kept as consistent as possible to minimize technical variation. Approaches that have been demonstrated to produce taxonomically biased results for degraded DNA, such as 16S rRNA gene amplicon sequencing, are not recommended for quantitative analyses.
3. Mapping to a reference genome sequence alone is not sufficient for species-level identification. Mapping should be competitive (to more than one candidate reference) and must take the metagenomic nature of the sample into account. Some genomic loci are more phylogenetically informative than others. In general, mobile elements are not recommended for taxonomic identification and should be used only with caution on a case-by-case basis.
4. Microbial species identification requires multiple lines of validation, which may include, but are not limited to, demonstrations of coverage evenness, genetic similarity, and haploidy.
5. DNA damage must be assessed. Microbial aDNA should exhibit patterns of DNA damage and fragmentation; however, the magnitude of damage may vary depending on the source context and species, and the damage pattern itself depends on the workflow and enzymes used during library preparation.
6. For ancient microbiome samples, such as dental calculus and paleofeces, microbiome community composition must be assessed and tested for biological plausibility before analysis. Diversity analyses and community comparisons should be undertaken with caution and performed only on well-preserved samples; otherwise, the results will be more informative about the process of decomposition than about the original microbiome of the individual.
7. Finally, research questions and hypotheses involving ancient microbes should be biologically informed. Microbial archaeology is an emerging field drawing on the expertise of researchers who have been trained in multiple disciplines, including archaeology, anthropology, microbiology, evolutionary biology, computational biology, population genetics, and medicine, to name a few. Cross-disciplinary communication and collaboration are critical to develop a robust framework for microbial archaeology research.

Tableau 3 : Recommandations de Warinner et collègues (2017) pour le travail en ADN ancien microbien.

Partie 2 : Archéologie

Chapitre 1 : Contexte historique

La période révolutionnaire française s'inscrit dans une époque de troubles à travers toute l'Europe occidentale ainsi qu'en Amérique. L'historien Jacques Godechot, spécialiste de la Révolution française, a parlé de « Révolution Atlantique » pour caractériser ces mouvements, initiés par une classe bourgeoise, dans divers pays d'Europe de 1766 (révolutions démocratiques à Genève) à 1801 (révolution en Allemagne rhénane) et en Amérique (1770-1783) (217, 218).

En France, on assiste à un essor démographique dû à une diminution de la mortalité dans la deuxième moitié du XVIIIe siècle : l'épidémie de peste s'essouffle, il y a moins de famines et de guerres. La population des villes et des campagnes a augmenté et on assiste à la montée en puissance d'une classe sociale bourgeoise, enrichie grâce au développement industriel et commercial. De plus, les idées des philosophes des Lumières se diffusent. Voltaire, Rousseau, Montesquieu ou Diderot bouleversent l'ordre social en prônant des valeurs telles que l'égalité entre les êtres humains, la liberté, la justice sociale, le rejet du dogmatisme et la recherche du bonheur en s'appuyant sur la science et la raison (218).

Cependant, à la fin des années 1780, suite à de mauvaises récoltes, à une diminution du pouvoir d'achat des paysans et à un refus des nobles et du clergé d'intégrer la communauté bourgeoise à la vie politique ainsi qu'à certains postes de l'armée et du haut clergé, une crise économique, sociale et politique éclate, entraînant des révoltes urbaines et rurales. Face à ces troubles, le roi Louis XVI et ses ministres décident de convoquer les Etats Généraux à Versailles en mai 1788, cette assemblée rassemble des représentants des trois différents ordres établis : la noblesse, le clergé et le tiers état. Des querelles éclatent entre les députés des différents ordres au sein de cette assemblée et le 17 juin, le tiers état se déclare seul représentant de la nation et se proclame

« assemblée nationale ». L'effervescence grandit à Paris jusqu'au 14 juillet 1789 et la prise de la prison de la Bastille, symbole de l'ancien régime et du pouvoir royal, marque le début de la Révolution française. La période révolutionnaire s'étendra sur dix ans, jusqu'en 1799. La Révolution prend fin avec le coup d'état du 18 Brumaire (9 novembre 1799) donnant le pouvoir à Bonaparte et marquant le début du Consulat (218).

1.1) La Vendée pendant la Révolution

La Révolution de 1789 est tout d'abord bien accueillie dans l'Ouest de la France où la population voit d'un bon œil l'abolition des droits seigneuriaux et espère la fin de la centralisation monarchique du pouvoir. De plus la mise sur le marché des biens fonciers du clergé donne aux paysans l'espoir d'acquérir de nouvelles terres. Cependant, des heurts éclatent dès 1791 entre les populations rurales vendéennes et les autorités révolutionnaires. Les vendéens se révoltent contre la constitution d'un clergé civil en défendant les prêtres réfractaires, s'opposant à la redécoupe des limites paroissiales et à la vente des biens du clergé comme « biens nationaux ». Parallèlement, les « biens nationaux » mis en vente sont principalement acquis par la bourgeoisie locale et les assignats (monnaie fiduciaire émise par l'état) sont dépréciés, entraînant un appauvrissement des classes déjà les plus pauvres et augmentant les rancœurs contre l'Etat révolutionnaire. Après ces premières révoltes, des soulèvements sporadiques éclatent dont le plus important se déroule en 1792 dans les Deux-Sèvres où de petits nobles (hobereaux) se joignent à la révolte paysanne (28, 219).

L'exécution du roi Louis XVI le 21 janvier 1793 renforce les luttes armées entre la France et la coalition des monarchies européennes. Pour faire face à ces guerres et sachant qu'une restauration de la monarchie en France signerait leur arrêt de mort, les membres de la Convention (gouvernement révolutionnaire) décident, en février 1793, la levée de 300 000 hommes supplémentaires pour renforcer les rangs de l'armée républicaine. Dans l'Ouest du pays, ce décret est très mal accueilli car il représente une résurgence des milices de l'ancien régime, des ruraux refusent de participer aux tirages au sort qui devaient désigner les recrues et des émeutes éclatent dans de petites villes dont ils s'emparent. Le 19 mars 1793, ils font échec à une colonne de l'armée régulière dirigée par le général Marcé, prouvant ainsi que leurs mouvements ne sont pas des révoltes sporadiques mais que le territoire est bel et bien en guerre contre l'armée révolutionnaire républicaine (219, 220).

Les insurgés ne disposent que de peu d'armes à feu et de munitions au début du mouvement : on compte quelques fusils de chasse utilisés par des braconniers et des garde-chasse ainsi que des pistolets donnés ou portés par de petits nobles prenant part ou soutenant les révoltes. La plupart des paysans étaient armés d'outils agricoles ou de la vie quotidienne transformés en armes blanches : faux montées à rebours, fourches, broches à rôtir, piques, haches, bâtons, etc. **(figure 41).**

Leurs victoires sur l'ennemi leur apportent une certaine quantité d'armes et de munitions qu'ils obtiennent soit auprès des habitants des villes qu'ils prennent, soit directement en récupérant l'armement sur les dépouilles de leurs victimes. Ils réussissent à s'emparer de pièces d'artillerie de l'Armée bleue (républicaine) et fabriquent bientôt leurs propres balles et cartouches. Ils se forment au maniement des armes à feux, parfois même sous l'instruction de prisonniers républicains (221, 222).



Figure 41 : Henri de la Rochejaquelin à la tête de l'Armée catholique et royale. Les paysans sont armés de fusils mais aussi d'outils agricoles. Gravure de Louis Monziès d'après un tableau de Julien Le Blant (Crosefinte 1989).

Les nobles qui commandaient les troupes ayant déjà fait la guerre, ils surent s'emparer de lieux stratégiques, coupèrent des ponts et se procurèrent, en plus des armes, des réserves de vivres et d'argent. Ils connaissaient bien le terrain, un bocage d'accès difficile, coupé par des haies favorables aux embuscades et comprenant peu de chemins et de routes. Leur stratégie consistait le plus souvent à agir en ordre dispersé pour déborder l'Armée révolutionnaire pendant que des lignes de tirailleurs l'enveloppaient. Cependant, les Vendéens restaient peu expérimentés et difficile à commander par rapport à une armée régulière.

A l'annonce des troubles ayant lieu en Vendée, sous le régime de la Terreur, la Convention vote le 19 mars 1793 un décret punissant de mort tous les rebelles qui seraient pris les armes à la main ainsi que la confiscation de leurs biens. Au cours du printemps 1793, les Vendéens connaissent plusieurs victoires (Cholet, Saumur, Angers, Thouars, par exemple) mais la tendance s'inverse à partir du mois d'août où ils échouent à prendre Luçon (28, 220, 223).

1.3) La virée de Galerne

Le 17 octobre 1793, le gros des troupes “royalistes” est mis en déroute par l’Armée républicaine à Cholet. Suite à cette défaite « l’état-major » de l’insurrection est divisé. Certains souhaitent rallier d’autres populations de l’Ouest à leur mouvement, d’autres veulent tenter de marcher sur Paris pour libérer Louis XVII et renverser le gouvernement, tandis que d’autres encore veulent prendre un port sur la Manche pour permettre le débarquement de l’armée britannique. Débute alors une période de soixante-deux jours nommée par les insurgés eux-mêmes « Virée de Galerne », du nom d’un vent de nord-ouest, froid et humide, soufflant sur l’ouest de la France. L’Armée catholique et royale regroupe alors une foule disparate de 60 000 à 80 000 personnes où les individus aptes au combat ne sont pas majoritaires (femmes, enfants, vieillards et prêtres). Elle est placée sous le commandement du jeune généralissime Henri de la Rochejaquelein et arpente le « Pays de Galerne » traquée par l’Armée républicaine (**figure 42**) (28, 224).

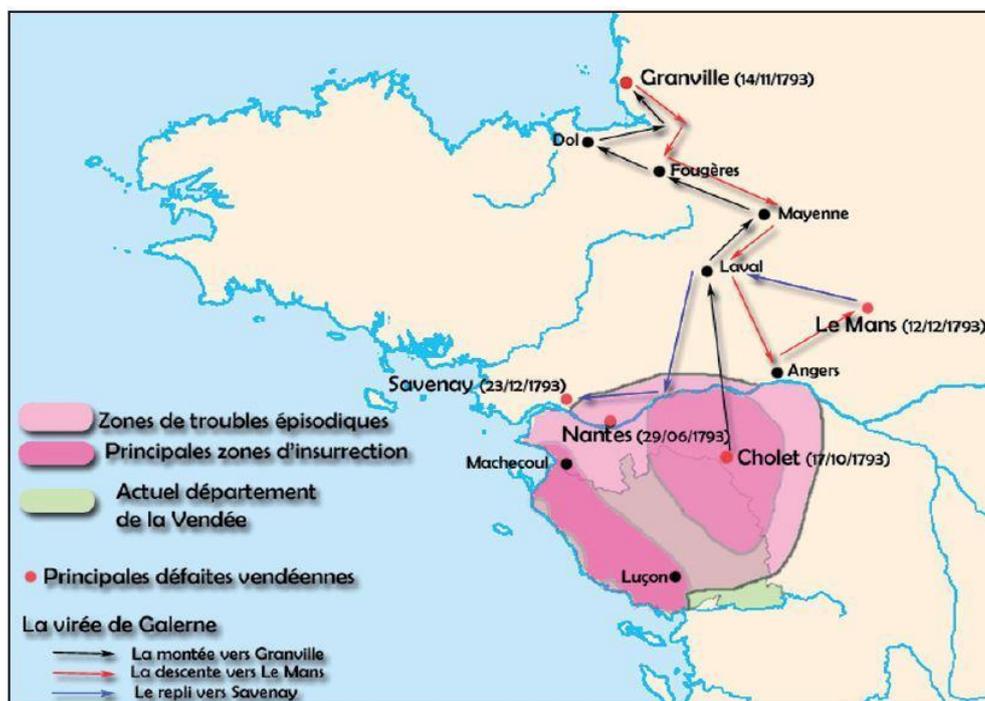


Figure 42 : Carte représentant le parcours de la virée de Galerne. (Cabot E, Chevet P. Volume 2, tome 1. La bataille du Mans des 12-14 décembre 1793 : la mémoire du sol. Texte. INRAP; 2015).

Si l'on suit le trajet « aller » sur une carte, on remarque le tracé en zig-zag, reflétant l'indécision entre les chefs et le manque d'une stratégie clairement établie. Cependant, ce trajet inclut toujours le passage par des villes afin de renouveler les stocks de vivres et de munitions. Le 14 novembre 1793, La Rochejaquelein, se présente devant Granville à la tête d'une armée de 25 000 combattants mais ils échouent à prendre la cité portuaire et sont contraints de battre en retraite, éloignant ainsi la possibilité d'un débarquement des anglais (224). Cet échec a un fort impact psychologique chez les insurgés qui, dès lors, n'ont plus qu'une idée en tête : regagner la Vendée. Cependant, le trajet de retour est bien plus difficile car il est le même qu'à l'aller, posant ainsi le problème du ravitaillement en vivres. De plus, on avance dans la mauvaise saison, la pluie, le froid et l'humidité. Les insurgés sont affamés, épuisés, les conditions d'hygiène sont déplorables et ils commencent à succomber en masse à la maladie dite « brigantine », très contagieuse, et dont les symptômes se rapprochent de la dysenterie et de la fièvre typhoïde (28, 224). Les 3 et 4 décembre 1793, les insurgés échouent à passer la Loire à Angers. Ils sont épuisés et décident alors de se diriger vers le Mans pour reprendre des forces (28, 224).

1.4) La Bataille du Mans

Mardi 10 décembre 1793, l'Armée catholique et royale (environ 40 000 personnes dont la moitié de non combattants) entre dans la ville du Mans après une résistance très faible des habitants (225). Les Vendéens, épuisés, se logent dans les maisons des Manceaux afin d'y trouver de la nourriture, des vêtements et du repos. Les chefs vendéens étaient conscients de leur position vulnérable, cependant ils ne disposaient plus que d'une faible autorité sur les soldats et leurs disputes internes contribuaient à les affaiblir. Aucune patrouille ne fut mise en place, aucun avant-poste défensif de grande ampleur ne fut créé. Les chefs vendéens avertis de l'arrivée de l'Armée bleue font sonner l'alarme et donnent l'ordre de se tenir prêts à évacuer la ville mais la plupart des soldats restent dans les maisons, pensant qu'il ne s'agit que d'une alerte et qu'ils ne seront vraiment attaqués que le lendemain. La Rochejaquelin et quelques hommes arrivent dans un premier temps à repousser une partie de l'armée républicaine avant leur entrée au Mans mais des renforts arrivent rapidement et ils sont obligés de battre en retraite dans la ville (28, 226, 227). Le jeudi 12 décembre vers 11h du matin, l'avant-garde de l'Armée de Mayenne, appartenant à l'Armée républicaine, entre en ville. Les combats s'engagent dans plusieurs endroits et vont se poursuivre jusqu'au soir. L'Armée blanche (royaliste) est rapidement débordée et l'arrière garde tente de retenir les Bleus pour permettre la fuite du reste de ses troupes vers Laval. La ville possède des ruelles étroites encombrées par des chevaux, des bœufs, des charrettes, des cadavres et des pièces d'artillerie abandonnées et l'unique point de franchissement de la Sarthe au nord-ouest est le pont Perrin. La nuit commence à tomber, il pleut, les Vendéens ne sont pas familiers avec la topographie des rues et, dans la panique pour fuir, nombre d'entre eux meurent accidentellement écrasés ou piétinés dans le mouvement de foule, noyés dans la Sarthe ou sous les coups de l'artillerie républicaine dirigée contre les fuyards (**figure 43**) (28, 227).

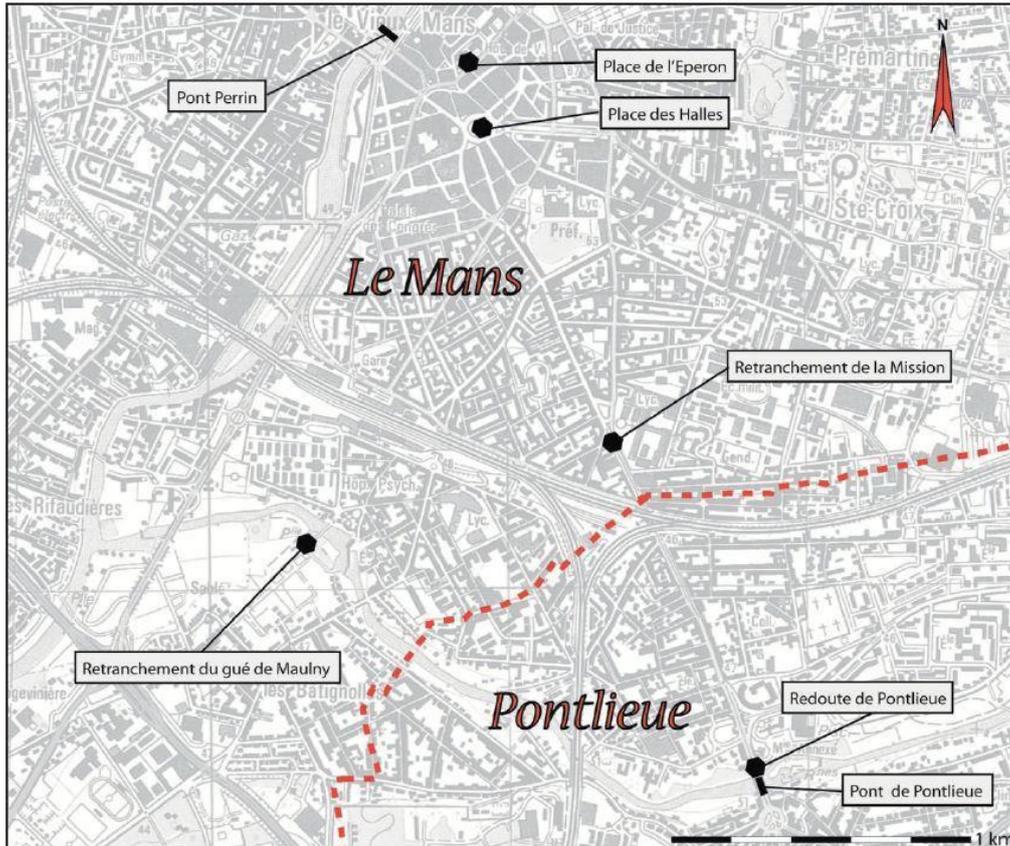


Figure 43 : Théâtre des opérations de la bataille du Mans. (Cabot E, Chevet P. Volume 2, tome 1. La bataille du Mans des 12-14 décembre 1793 : la mémoire du sol. Texte. INRAP; 2015. [Illustration : @inrap]).

Vendredi 13 décembre, vers 7h du matin, les Républicains arrivent en nombre et mettent en déroute ce qu'il reste de l'Armée vendéenne. De nombreux actes de torture et de répression seront commis, 200 à 300 vendéens sont faits prisonniers puis fusillés à Pontlieue, les Blancs cachés dans les maisons sont tués ou mis en prison pour être ensuite exécutés sans distinction entre les combattants et les non combattants, écho du régime de Terreur alors appliqué à Paris (204). Henri Chardon, dans le deuxième tome de son livre « les Vendéens dans la Sarthe » cite entre autres ce témoignage : « Le sang coulait par ruisseaux dans les rues ; des chariots renversés, des canons démontés, des cadavres entassés, des femmes échevelées et éperdues, des bœufs et chevaux mourants, étendus pêle-mêle ; les rugissements des vainqueurs, les cris plaintifs des victimes, tout présentait aux yeux l'image du chaos et de l'enfer » (226).

Les autorités municipales ayant fui avant les combats, les habitants du Mans vont s'organiser spontanément pour former une administration provisoire et nettoyer les rues de la ville, enterrer les morts et faire face aux besoins des troupes républicaines sous peine que celles-ci ne se livrent à des pillages. Ils souhaitent agir rapidement pour éliminer les traces des combats et rendre à la ville son aspect normal mais aussi pour des raisons sanitaires, redoutant la propagation d'épidémies. Le samedi 14 décembre 1793, on enterre les victimes fusillées à Pontlieue la veille ainsi qu'une partie des combattants appartenant aux deux armées, les inhumations se poursuivront le 15 et le 16 décembre (28, 226). Un membre de cette administration provisoire, Chesneau-Desportes, parle de deux mille deux cent cadavres transportés dans quatre-vingt-quinze tombereaux enterrés dans de grandes fosses sur la nouvelle esplanade des Jacobins, construite à la place des enclos de deux anciens couvents. Il s'agit là des victimes inhumées officiellement par la municipalité mais d'autres furent enterrées en d'autres points de la ville ou jetées dans les rivières ou les puits (226). La place des Jacobins est alors un terrain vague en travaux, situé à la périphérie de la ville et appartenant à la municipalité. Les fosses sont ensuite recouvertes totalement ou partiellement de chaux afin d'éviter les épidémies, la population ayant peur de la propagation de la maladie brigantine. La virée de Galerne s'achève le 24 décembre avec la destruction quasi-totale de l'Armée blanche à Savernay, en Loire Atlantique (28, 225).

1.5) Le bilan humain des combats

Actuellement, le chiffre retenu est de 10 000 à 15 000 victimes au total en comptant les combats ayant eu lieu au Mans, à Pontlieue et la répression qui a suivi sur la route de Laval. Sur ce nombre, au maximum 5% des pertes concernent l'Armée républicaine. Concernant les morts enterrés dans les fosses des Jacobins, on peut les rattacher à trois événements principaux : la panique pour quitter la ville (12 décembre en début de soirée), les combats d'arrière-garde (12

et 13 décembre) et la phase de répression (à partir du 13 décembre). Parmi ces victimes, les morts au combat représentent moins de 1000 personnes, la part respective des deux autres causes de mortalité, accidentelle et répression, n'a pu être évaluée avec les textes dont disposaient les archéologues et historiens (28, 225).

Chapitre 2 : Données archéologiques et génétiques

En 2009-2010, des fouilles archéologiques aux Quinconces des Jacobins, préalables à la construction de « l'Espace Culturel des Jacobins », ont mis au jour neuf charniers contenant les dépouilles de victimes de la Bataille du Mans, décédées entre le 12 et le 13 décembre 1793. Un total de 154 sujets a pu être identifié, représentant moins de 10% de la population totale inhumée au Jacobins (environ 2000 personnes).

2.1) Présentation générale des fosses

Les neuf charniers se situent dans l'angle nord-ouest de la zone de fouilles, sous le parking de l'ancien théâtre municipal de la ville, ils ont subi peu de dégradations (**figure 44**).



*Figure 44 : Site archéologique et emplacement des fosses.
Photos : détail des fosses 8 et 9 (en haut), du site archéologique (au milieu) et de la fosse 1 (en bas); Cabot E, Chevet P. Volume 2, tome 1. La bataille du Mans des 12-14 décembre 1793 : la mémoire du sol. Texte. INRAP; 2015. Carte de France et montage : P. Gérard (AMIS).*

Un décapage de la couche de remblais contemporaine a été fait à la pelle mécanique. Chaque fosse a fait l'objet d'une fouille exhaustive et d'un enregistrement spécifique par l'INRAP Grand Ouest. Les fosses ont été démontées sur plusieurs couches horizontales successives en commençant par la couche de chaux, quand elle était présente, puis la partie supérieure et enfin la partie inférieure. Les fosses étaient consolidées avec du bastaing et des plaques métalliques au fur et à mesure de l'avancement des travaux afin d'éviter tout risque de piétinement des zones déjà fouillées (**figure 45**) (28).



Figure 45 : Charniers 8 et 9 en cours de fouilles. Vue de l'aménagement avec les bastaings et les plaques métalliques (Cabot E, Chevet P. Volume 2, tome 1. La bataille du Mans des 12-14 décembre 1793 : la mémoire du sol. Texte. INRAP; 2015).

Les fosses étaient couvertes de plaques métalliques et de bâches tous les soirs pour éviter les dégradations climatiques ou par des tiers pénétrant le chantier. Pendant les travaux en journée, les fosses ouvertes étaient protégées par des tentes en voile pour empêcher une exposition trop forte au soleil ou à l'humidité risquant d'endommager les pièces archéologiques (28).

La totalité des fouilles a été effectuée avec de petits outils (instruments de dentistes, truelle, pinceaux, etc.) permettant une grande minutie, l'étude des connections anatomiques,

l'identification des petits objets présents et leur position dans le dépôt. Les fosses étaient fouillées deux par deux dans un souci de gain de temps, celles qui n'étaient pas en train d'être explorées étant maintenues fermées pour éviter qu'elles ne se dégradent (28). L'enregistrement de terrain visait à identifier chaque individu, noter sa position et donc son mode de dépôt, les lésions traumatiques qu'il avait pu subir et éventuellement la présence de mobilier (**figure 46**).

LE MANS - Les Jacobins, 2010

FOSSE :	Zone :	Niveau :	Démontage :
SQ n° :	Mensurations	Caractères discrets	
Age :	humérus :	fémur :	-----
Sexe :	radius :	tibia :	-----
	ulna :	fibula :	-----

PATHOLOGIES

<p>Trauma</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p>	
<p>Infectieux</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p>	
<p>Dégénératif</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p>	

Autre

COMMENTAIRES

Figure 46 : Fiche de démontage individuelle vierge utilisée pour tous les sujets en 2010. (Cabot E, Chevet P. Volume 2, tome 1. La bataille du Mans des 12-14 décembre 1793 : la mémoire du sol. Texte. INRAP; 2015).

Les fosses sont rectangulaires (exceptée la fosse 1) et varient en dimensions et profondeur, elles mesurent en moyenne 292 cm x 122 cm et ont une profondeur moyenne de 40 cm. Les fosses contiennent de 3 (fosse 7) à 53 corps (fosse 5) chacune, ce qui représente au maximum 5-6 % des victimes totales du centre-ville. Certaines fosses ont été perturbées (diagnostic de terrain en

1999, tranchée moderne). Les corps sont empilés sans ménagement, sans distinction d'âge ou de sexe et sans dispositions particulières : sur le ventre, le dos, en travers de la fosse, parfois enchevêtrés les uns avec les autres. L'empreinte de fibres textiles ou de membres est parfois visible dans la chaux. Du mobilier (boutons, pièces de monnaie, médailles religieuses, épingles, boucles, etc.) a été retrouvé dans toutes les fosses sauf la 4 et la 7, ce qui exclut un déshabillage et un pillage systématique des victimes (**figure 47**). Parmi les monnaies retrouvées, des écus Louis XV suggèrent que les fosses datent de la fin du XVIII^e siècle.



Figure 47 : a) Boutons à queue en verre et métal retrouvés dans la fosse 3 ; b) Vue de la fosse 10 c) Médaille de Saint Benoît retrouvée dans la fosse 4 ; d) Fibres de tissu conservées par la chaux, retrouvées dans la fosse 8. (Cabot E, Chevet P. Volume 2, tome 1. La bataille du Mans des 12-14 décembre 1793 : la mémoire du sol. Texte. INRAP; 2015).

Ce traitement des corps (grandes fosses communes, inhumation de masse, unicité du lieu d'enfouissement) est retrouvé dans de nombreuses sépultures dites « de catastrophe », c'est-à-

dire de crise de mortalité massive dans un laps de temps réduit (bataille, épidémie, catastrophe naturelle, etc.) ne permettant pas une gestion classique des inhumations (**tableau 4**) (28).

Fosse	Année de fouille	Etat	Forme	Longueur (cm)	Largeur (cm)	Profondeur (cm)	Chaux	Nombre minimal d'individus (NMI)
1	2009	perturbé	ovoïde	145	170	25	Non	9
2	2009-2010	intact	rectangulaire	440	110	36	Couverture complète	17
3	2010	Perturbé	rectangulaire	200	140	59	Couverture complète	13
4	2010	perturbé	rectangulaire	335	125	28	partielle	13
5	2010	intact	rectangulaire	375	130	67	partielle	53
7	2010	perturbé	rectangulaire	70	85	18	partielle	3
8	2010	intact	rectangulaire	430	160	41	partielle	22
9	2010	intact	rectangulaire	420	90	51	Couverture complète	13
10	2010	perturbé	rectangulaire	210	95	34	partielle	11

Tableau 4 : Principales caractéristiques des fosses. NB : la fosse 6 n'est pas citée car elle ne contenait pas de squelettes humains mais les restes d'un cheval. Cabot E, Chevet P. Volume 2, tome 1. La bataille du Mans des 12-14 décembre 1793 : la mémoire du sol. Texte. INRAP;2015.

La fosse 1 est la seule à ne pas respecter ces critères : elle est de forme ovoïde et contient seulement des corps masculins à l'exception d'une femme. Les neuf corps présents sont disposés tête bêche, se rapprochant ainsi d'un mode d'inhumation classique, de plus, cette fosse est la seule à ne pas avoir été recouverte de chaux. Plusieurs hypothèses ont été faites pour expliquer ces différences entre cette fosse et les autres : inhumation de soldats républicains avec un soin plus important, mais la fosse comprend un corps de femme, ce qui infirme cette hypothèse. De même la fosse a pu être réservée à des Manceaux ou bien réalisée en fin de période d'inhumation, dans une moindre urgence, ce qui explique un plus grand soin dans le dépôt des corps. A ce jour aucune de ces hypothèses n'a pu être vérifiée (28).

On note des différences quant aux traumatismes retrouvés sur les squelettes : les traumatismes balistiques sont plus importants dans la population masculine et les traumatismes par arme blanche sont légèrement plus représentés dans la population féminine (**figure 48**).

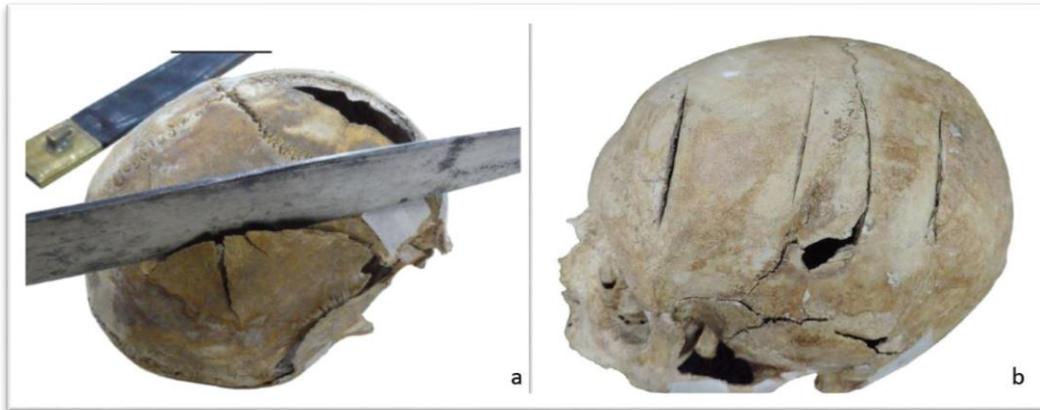


Figure 48 : a) Entaille profonde résultant d'un coup tranchant porté par une lame type sabre. Exemple de traumatisme tranchant ayant pénétré le pariétal droit du sujet 555 par la face supérieure ; b) Détails d'impacts tranchants sur le frontal et le pariétal du sujet 401. (Cabot E, Chevet P. Volume 2, tome 1. La bataille du Mans des 12-14 décembre 1793 : la mémoire du sol. Texte. INRAP; 2015).

Parmi les adolescents, on retrouve des blessures exclusivement à l'arme blanche chez les sujets de sexe féminin alors que ceux de sexe masculin présentent également des lésions balistiques, évoquant une participation plus active aux combats de ces derniers (28). De manière générale, les blessures à l'arme blanche sont prépondérantes dans les charniers sauf pour la fosse 9 où on retrouve une plus grande proportion de lésions dues à l'artillerie et aux armes à feu. Cette fosse est composée exclusivement d'hommes et ces différences suggèrent un ramassage des corps quartier par quartier avec des lésions dépendant des différents affrontements ayant eu lieu en ces endroits (combat au corps à corps, tir, poursuite des fuyards, etc.) (28).

2.2) Présentation générale des sujets

Deux méthodes utilisant l'observation morphologique ont été utilisées pour déterminer le sexe des victimes : la « diagnose sexuelle probabiliste (DSP) » basée sur la morphologie de l'os coxal et une technique de « diagnose sexuelle secondaire (DSS) » basée sur la morphologie du squelette infra-crânien (228). Ces méthodes ont été mises en œuvre pour les sujets adultes ainsi que pour les adolescents de plus de 15 ans. En dessous de cet âge, aucune méthode ne permet une différenciation sexuelle fiable. Lorsque les os coxaux étaient disponibles, la technique DSP était privilégiée et appliquée aux deux os coxaux (ou à un seul si l'autre était endommagé ou absent) par deux examinateurs indépendants. Lorsque les os coxaux étaient absents ou endommagés, la DSS a été utilisée.

Le sexe génétique a également été déterminé pour un échantillon de 96 individus, présentant une conservation d'ADN endogène compatible avec les analyses. Pour 8 de ces individus, l'analyse morphologique n'avait pas été possible et 7 étaient des sujets immatures de moins de 15 ans, ne présentant pas de caractères sexuels morphologiques discriminants. Des échantillons dentaires ont été utilisés lorsqu'ils étaient disponibles car leur contenu en ADN ancien endogène est plus important que celui de l'os (229). Parmi les 96 sujets échantillonnés, le sexe génétique a pu être établi pour 68% grâce aux échantillons dentaires contre 17% grâce aux échantillons osseux (228). En combinant l'approche morphologique et génétique, la détermination du sexe a pu être faite pour 93% de la population des fosses (**tableau 5**).

	N	Adult			Immature		
		Male	Female	UD*	Male	Female	UD*
Grave 1	9	7	1	1	0	0	0
Grave 2	17	6	8	0	1	0	2
Grave 3	13	9	4	0	0	0	0
Grave 4	13	8	4	0	1	0	0
Grave 5	53	39	5	2	6	1	0
Grave 7 ^a	3	0	2	1	0	0	0
Grave 8	22	0	18	0	0	3	1
Grave 9	13	10	0	0	0	0	3
Grave 10	11	8	1	0	0	0	2
Total	154	87	44	3	8	4	8

^a Only one subject was determined out of three in grave 7, in consequence this grave hasn't been included in further analyses.
* UD: UnDetermined.

Tableau 5 : Recrutement funéraire des fosses, toutes méthodes combinées (D'après Thèves 2016).

Un rapport de deux tiers d'hommes pour un tiers de femmes a été mis en évidence chez les sujets adultes et également chez les immatures. 62% des sujets ont été identifiés comme des hommes, 31% comme des femmes et 6% n'ont pu être identifiés. Parmi ces individus, 87% sont considérés morphologiquement comme des adultes de plus de 18 ans et 13% comme des immatures. Chez les immatures, 6% étaient de grands adolescents de 15 à 19 ans et 7% des enfants de moins de 15 ans (28, 228). En tout, 41% des sujets retrouvés dans les fosses sont des femmes et des enfants. La présence de femmes et d'enfants en proportions très importantes est très inhabituelle pour des sépultures de bataille où le recrutement est en général quasi exclusivement masculin. Ces indices concernant la population présente dans les fosses, associés aux récits historiques et aux objets retrouvés (écus de la fin du XVIIIe siècle), orientent vers une population quasi-exclusivement composée de membres de l'Armée catholique et royale ayant péri durant la bataille du Mans.

Dans le cadre de travaux de Master 2, deux séquences d'ADN mitochondrial, appartenant aux régions hypervariables HVR-I et HVR-II, ont été étudiées à partir d'échantillons issus de 101

sujets retrouvés au Mans et comparées à des séquences issues de populations modernes venant des départements du Maine-et-Loire, de Loire Atlantique, de Vendée et de Sarthe présents depuis au moins deux générations sur ces territoires (230). Les séquences d'ADN mitochondrial correspondant aux régions cibles ont été amplifiées avec un taux de succès de 66,6% et 95 haplotypes* distincts ont été retrouvés dans la population ancienne, correspondant aux haplogroupes retrouvés ailleurs en France et en Europe. De façon inattendue, les analyses (comparaison des indices de fixation [Fst]) montrent une différence significative entre les sujets anciens et les sujets actuels issus du département de la Vendée, alors que les écrits historiques décrivent un recrutement de l'Armée catholique et royale en partie issue de ce département (230). Ceci peut s'expliquer par un recrutement inégal de l'Armée catholique et royale entre les différents départements avec un déficit de recrues vendéennes ou bien par une proportion de Manceaux enterrés avec l'Armée catholique et royale plus importante que ce qui est décrit dans les témoignages historiques ou encore par une évolution génétique de la Vendée différente des départements voisins au cours des 200 dernières années. A l'inverse, l'étude ne révèle pas de différence significative entre les sujets actuels issus du département de la Sarthe et les sujets anciens retrouvés dans les fosses du Mans, alors que les Sarthois n'appartenaient pas à l'Armée Catholique et Royale. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène : comme mentionné précédemment celle d'une plus grande quantité d'habitants du Mans tuée durant la bataille que ce qui est relaté dans les écrits historiques ou bien l'impact des migrations de populations du Maine-et-Loire ayant eu lieu au Mans au cours de la période révolutionnaire pour fuir les combats dans leur région (230). Les données étaient concordantes entre les sujets anciens et les sujets modernes issus du Maine-et-Loire et de Loire Atlantique.

Un autre travail concernant les lignées paternelles (chromosome Y) a également été effectué dans le cadre d'un Master 1 (231). La comparaison des profils microsatellites (voir ci-après) du chromosome Y a été réalisée entre les sujets modernes de Sarthe, Maine-et-Loire, Loire

Atlantique, Vendée, présents sur ces territoires depuis au moins deux générations, et la population ancienne retrouvée au Mans. Les régions d'ADN microsatellite (ou STR = Short Tandem Repeats) sont des séquences constituées de courts motifs répétés N fois en tandem (2 à 5 bp), les mutations de ces séquences permettant une discrimination fine entre individus. Cependant, aucune différence significative n'a pu être établie entre la population ancienne et les quatre populations actuelles sur la base des marqueurs étudiés (231). Ceci met en évidence une continuité génétique entre populations moderne et ancienne du point de vue des marqueurs STR Y étudiés (231).

Les récits historiques concernant la Bataille du Mans ont été rédigés par des partisans des deux camps et sont souvent orientés et parfois divergents. Les fouilles archéologiques réalisées au Mans ont permis pour la première fois de confronter les témoignages historiques à la réalité archéologique (28, 225, 228). Les sujets retrouvés sont issus d'une aire géographique restreinte, ont eu un mode de vie similaire majoritairement paysan, et comprennent toutes les composantes d'une population (homme, femme, enfants et vieillards), ce qui en fait un échantillon représentatif d'une population rurale de l'Ouest de la France à la fin du XVIIIe siècle.

Partie 3 : La méthodologie

3.1) Matériel

Les sujets étudiés, échantillonnage des dents et des os

Les dents et les os analysés dans ce travail proviennent des fosses 1 à 9. Leur état général de conservation est très variable d'un sujet à l'autre et d'une fosse à l'autre. Concernant les mâchoires, certains maxillaires et certaines mandibules présentent un os alvéolaire presque intact, tandis que d'autres sont fragmentés, en particulier au niveau des parties osseuses alvéolaires fines comme les septa interdentaires et les tables vestibulaires. Au niveau des bases osseuses des mâchoires, la dégradation est plus ou moins importante, allant parfois jusqu'à la destruction complète. Pour un faible nombre d'individus, les crânes n'ont pas été retrouvés et ces individus ont été écartés de l'étude (28, 83, 232).

Concernant les analyses ADN, ont été retenues uniquement les dents en bon état et présentes sur les arcades dentaires de sujets clairement identifiés. Ces dents ont été directement placées dans des sachets plastiques individuels, transportées au laboratoire et stockées dans des conditions contrôlées à -20°C. Des photos, radiographies rétroalvéolaires et CBCT (Cone Beam Computed Tomography) des maxillaires et mandibules de certains sujets en particulier ont été faits directement au laboratoire après l'échantillonnage pour des raisons techniques. Pour certains individus, des échantillons osseux ont été collectés de la même façon, servant d'abord à l'identification du sexe de ces individus puis comme témoins négatifs lors du séquençage haut débit (228).

3.2) Méthode

3.2.1) Etat sanitaire bucco-dentaire dans cette population ancienne : étude générale morphologique et macroscopique.

L'analyse dentaire préliminaire, à partir de l'observation macroscopique des pièces, porte sur **137 sujets** et concerne les pertes dentaires ante-mortem, les maladies carieuse et parodontale, les dépôts de tartre, les caractères héréditaires et l'usure (232, 233).

Les pertes dentaires ante-mortem ont été relevées sur des fiches d'observation spécifiques. Les caries ont été évaluées selon trois niveaux correspondant au degré d'atteinte (A : cavités de l'ordre du millimètre atteignant la jonction amélo-dentinaire ; B : atteintes moyennement délabrantes limitées à la dentine ; C : atteintes très délabrantes avec destruction coronaire importante et communication pulpaire).

L'étude du tartre portait sur l'ensemble des dents présentes *post-mortem* à l'exception de celles montrant des délabrements carieux très importants ou détériorées en surface. Quatre niveaux de dépôt de tartre ont été établis d'après Brothwell (0 : absence de traces visibles de dépôts ; 1 : dépôts réduits au tiers cervical de la couronne dentaire ; 2 : dépôts s'étendant au tiers moyen de la couronne dentaire ; 3 : dépôts importants atteignant le tiers occlusal de la couronne) (203, 232, 233).

Cinq degrés d'usure occlusale ont été établis en simplifiant la classification des usures définie par Brothwell (0 : absence d'usure macroscopique ; 1 : atteinte uniquement amélaire ; 2 : atteinte dentinaire en îlots distincts ; 3 : atteinte de l'ensemble de la dentine occlusale avec une confluence des îlots dentinaires mais persistance d'email au niveau des sillons ; 4 : atteinte de la totalité de la dentine sur la surface occlusale avec une perte plus ou moins importante de hauteur coronaire). Deux types d'usure ont été distingués : usure normale liée à la mastication et usure parafunctionnelle (17, 232, 233).

Une première approche rapide visant à estimer l'atteinte parodontale a été réalisée sur les dents présentes dans des alvéoles intactes. Les dents dont les alvéoles étaient altérées (fracture, dégradation chimique) ont été exclues. Les différents degrés de résorption ont été estimés d'après Brothwell selon quatre niveaux (0 : niveau osseux à moins de 2 mm de la jonction amélo-cémentaire ; 1 : alvéolyse comprise dans le tiers coronaire de la racine ; 2 : alvéolyse au tiers médian de la racine ; 3 : alvéolyse au tiers apical de la racine). Cette première ébauche fut ensuite complétée par une étude plus précise de l'atteinte parodontale grâce à la classification de Kerr (203, 232, 233).

Les variations anatomiques, signes de carences alimentaires et de stress ainsi que les malpositions et anomalies dentaires ont été relevées.

3.2.2) Etude macroscopique et radiologique de six sujets centrée sur les maxillaires, mandibules et dents échantillonnées.

Suite à l'étude macroscopique réalisée préalablement, six sujets ont été retenus pour des analyses plus poussées car ils présentaient des particularités pathologiques (caries, atteinte parodontale, Lésion Inflammatoire Péri-radriculaire d'Origine Endodontique [LIPOE]) au niveau des mâchoires.

Les caries ont été diagnostiquées macroscopiquement par deux observateurs avec l'aide d'une sonde n°6 sous un bon éclairage. Les lésions étaient considérées comme carieuses s'il existait une cavitation et un défaut clairement objectivable dans la structure de la dent. Les colorations de l'émail sans cavitation n'ont pas été prises en compte. Le nombre de caries ainsi que leur localisation (occlusale, proximale, vestibulaire/linguale ou pulpaire) ont été enregistrés (144, 234, 235). Une classification simplifiée décrivant les différents stades d'atteinte carieuse, basée sur un rapport de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a été utilisée pour diviser les caries en trois catégories : A ; B et C en fonction de la sévérité de l'atteinte (235). La catégorie

A désignait les cavités limitées à l'émail, la catégorie B les cavités limitées à la dentine et la catégorie C les dents extrêmement délabrées avec destruction de la couronne dentaire et atteinte pulpaire. Des examens d'imagerie ont également été réalisés : radiographies rétroalvéolaires pour les maxillaires (générateur Xmind Satelec Acteon), orthopantomogramme ou cliché occlusal pour les mandibules (générateur Kodak 3000).

La perte osseuse parodontale a été évaluée par examen visuel et utilisation d'une sonde parodontale graduée. Elle a été différenciée de phénomènes d'attrition et d'éruption continue ou de fractures post-mortem des corticales osseuses (153, 236). La classification de Kerr basée sur la forme des septa interdentaires et les caractéristiques de surface de l'os alvéolaire a ensuite été utilisée pour définir le statut parodontal des sujets (voir 3.1.3) (153, 204). La présence ou l'absence de tartre dentaire a également été enregistrée.

Les LIPOE (granulomes, kystes et abcès péri-apicaux ainsi que les kystes résiduels dus à l'évolution intra-osseuse d'abcès péri-apicaux après la perte de la dent causale) ont été diagnostiquées par examen macroscopique. L'imagerie (radiographies rétroalvéolaires, orthopantomogramme ou CBCT (générateur Kodak 3000)) a également été utilisée pour mettre en évidence les cavités strictement intra-osseuses (237). Les LIPOE ont été considérées comme présentes quand une partie de l'os maxillaire ou mandibulaire était détruite par un processus infectieux créant une cavité arrondie dans l'os spongieux ainsi qu'une lésion radioclaire sur l'examen d'imagerie (voir partie 3.1.4). Si le phénomène infectieux était externalisé, la fistule de drainage et la perte osseuse au niveau de l'os cortical étaient enregistrées (214, 236, 238).

3.2.3) Décontamination et préparation des dents et des os, extraction de l'ADN ancien des échantillons.

La totalité du travail a été réalisée au sein d'un laboratoire de paléogénétique dédié (Laboratoire AMIS, Toulouse) dans le respect des critères et des protocoles de travail sur l'ADN ancien (34, 229). Nous avons voulu tester la possibilité de retrouver des pathogènes oraux anciens à partir de dents saines, sur des sujets pour lesquels des pathologies bucco-dentaires avaient été mises en évidence sur d'autres dents. Pour chaque individu sélectionné, une dent saine, en bon état de conservation a été prélevée pour échantillonnage.

Le séquençage a été réalisé sur six dents issues de six sujets différents. Trois os, issus de trois autres sujets ont également été séquencés en tant que contrôles et pour permettre la comparaison entre profils microbiens buccaux et environnementaux (sol) (**tableau 6**).

Numéro de l'échantillon	Fosse	Type d'échantillon	Sexe
213	2	dent	M
306	3	dent	M
307	3	os	M
308	3	dent	M
309	3	dent	M
312	3	os	F
403	4	dent	M
406	4	dent	M
702	7	os	F

Tableau 6 : récapitulatif des sujets échantillonnés.

Les échantillons ont été nettoyés dans le respect des conditions de référence concernant le travail sur l'ADN ancien (74, 239). Le tartre a été retiré quand il était présent, puis chaque échantillon dentaire ou osseux a été exposé aux rayons Ultraviolets (UV) pendant 30 minutes

par face (228). Les échantillons ont été réduits en une poudre fine par cryobroyage sous azote liquide avec Spex SamplePrep™ 6870 Freezer/Mill™ (Fisher Scientific). Puis l'extraction ADN a été réalisée à partir de 200 mg de poudre d'échantillon dentaire ou osseux en utilisant des colonnes avec filtres de silice (voir annexe) (226). Pour évaluer la présence éventuelle de contaminations bactériennes lors des manipulations (microbes de la peau), par du matériel de laboratoire (réactifs, plastiques ou matériaux) ou lors du stockage (prolifération de bactéries) (26), un blanc d'extraction (BE23) et deux blancs de librairie (BL19 et BL12) ont été amplifiés (25 cycles) dans les mêmes conditions que les échantillons anciens puis purifiés sur des billes Ampure XP (Beckman Coulter) jusqu'à atteindre une concentration compatible avec le séquençage. Les librairies de blancs amplifiées ont ensuite été poolées en ratios équimolaires et séquencées sur un séquenceur MiniSeq Illumina au laboratoire AMIS, pendant 80 cycles sur un mode paired-end.

3.2.4) Préparation des bibliothèques et séquençage haut débit.

Une bibliothèque ADN Illumina simple index a été construite pour chaque extrait d'ADN ancien échantillonné (5µl) en suivant la méthodologie basée sur la ligation d'adaptateurs à bouts francs (« blunt-end » adaptors) et en utilisant un kit NEBNext Ultra DNA Library for Illumina (New England Biolabs), conformément au protocole du fabricant. Les bibliothèques blunt-end ont été construites avec une concentration finale de 0,750 µM d'adaptateurs multiplex Illumina. Chaque bibliothèque a été purifiée sur 86,5 µl de billes AMPure XP (Beckman A6388) selon le protocole du fabricant. Les bibliothèques ont ensuite été éluées en ajoutant 25 µl TE1X après incubation à température ambiante pendant 5 minutes. Les bibliothèques ont d'abord été amplifiées dans un volume de réaction de 50 µl en utilisant 22 µl de la bibliothèque ADN, 25 µl de PCR Master Mix 2X (NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit), 1µl de primer InPE1 (25 µM), 1 µl de primer InPE2 (0.5 µM) et 1µl de primer Index (25 µM) de 7 nucléotides correspondant à la séquence d'oligo d'indexation (80). Les conditions du premier cycle de PCR étaient les suivantes : dénaturation initiale de 30 secondes à 98°C, suivie de 8 cycles de dénaturation de 10 secondes à 98°C, 30 secondes d'hybridation à 60°C et 40 secondes d'élongation à 72°C puis une étape finale d'élongation de 5 minutes à 72°C. Les produits de PCR ont été purifiés sur 50 µl de billes AMPure XP et élués en ajoutant 30 µl de TE1X. Une deuxième série de PCR a été réalisée à partir de 5 µl de produit purifié de la première PCR dans un volume final de 25 µl avec 0,5U Taq Gold (Life Technologies) ; 1X de Gold Buffer ; 2 mM de MgCl₂ ; 200 µM de chaque dNTP ; 0,1% de DMSO ; et 1 µl de primer InPE1 (25 µM), 1 µl de primer InPE2 (0,5 µM) et 1 µl de primer Index (25 µM). Les conditions du deuxième cycle de PCR étaient les suivantes : une dénaturation initiale de 10 minutes à 92°C, suivie de 8 cycles de dénaturation de 30 secondes à 92°C, une hybridation de 30 secondes à 60°C et une élongation de 40 secondes à 72°C puis une étape d'élongation finale à 72°C pendant 7 minutes. Les produits de cette seconde PCR ont été purifiés sur 30 µl de billes AMPure XP (Beckman Coulter) et élués en ajoutant 30 µl de TE1X.

L'absence de contamination des échantillons ADN a été contrôlée grâce à des blancs (blanc d'extraction et blanc de librairie), traités en même temps et selon le même protocole que les échantillons.

Les concentrations des librairies amplifiées ont été estimées sur un BioAnalyzer (technologie basée l'électrophorèse micro-capillaire sur puce permettant une analyse rapide et sensible des échantillons d'acide nucléique ainsi que le contrôle de la qualité des échantillons) à l'aide de puces ADN haute sensibilité (Agilent Technologies) pour les échantillons anciens dentaires et les témoins (osseux). Puis, les librairies et les blancs ont été poolés en commun, en ratios équimolaires, avant séquençage sur Illumina HiSeq 2500 sur la plate-forme GeTPlage (Castanet-Tolosan, France) pendant 100 cycles sur un mode pair-end.

3.2.5) Analyse des séquences.

Les adaptateurs présents sur les reads générés lors du séquençage ont été supprimés et les reads « paired-end » qui se chevauchaient sur 11 nucléotides au minimum ont été collapés et traités comme des reads « single-end » avec le logiciel AdapterRemoval. Les reads ont ensuite été alignés sur le génome de référence de Homo sapiens hg19 ainsi que sur la séquence complète du génome mitochondrial de Homo sapiens (séquence de référence de Cambridge révisée ; GenBank Accession n° NC_012920.1) en utilisant le logiciel BWA version 0.7.10 r789 avec les paramètres proposés par Schubert et collègues (107, 240, 241). Seuls les reads avec une qualité de mapping supérieure à 25 ont été retenus (paramètres par défaut). Les doublons de PCR ont été supprimés à l'aide de la fonction MarkDuplicates de PICARD TOOLS version 1.88 (<http://picard.sourceforge.net>) (241).

Une analyse des dommages de l'ADN présents sur les échantillons d'ADN ancien a été effectuée à l'aide du logiciel mapDamage, version 2.0.1 (110, 111), qui va d'abord calculer le nombre d'erreurs d'incorporation à partir des données NGS générées puis le comparer à un

modèle statistique des dommages *post-mortem* que subit l'ADN ancien permettant ainsi d'estimer la dégradation des échantillons avec un modèle Bayésien. Cette analyse a été faite pour les données issues du mapping de chaque ensemble sur le génome humain de référence (hg19) et les principaux pathogènes oraux lorsque le nombre de reads était suffisant (*Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces viscosus*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Rothia dentocariosa*, *Streptococcus sanguinis* et *Tannerella forsythia*) (107).

Malgré la mise en œuvre de protocoles stricts, il est difficile d'éviter la contamination des échantillons anciens par de l'ADN moderne lorsqu'on travaille avec du matériel humain ancien. Des estimations précises des niveaux de contamination nécessitent de grandes quantités de données génomiques, c'est pourquoi nous avons limité cette analyse aux échantillons ayant une couverture du génome mitochondrial supérieure à cinq (5X). Nous avons utilisé mtDNA-Server pour effectuer un contrôle de contamination basé sur la phylogénie afin d'éviter les erreurs d'interprétations. L'analyse de la contamination par l'ADN moderne a été étudiée pour 2 échantillons (sujets 306 et 406) pour lesquels nous avons suffisamment de données (9X et 19X de couverture respectivement). Pour compléter l'analyse de contamination potentielle, nous avons séquencé un Blanc d'Extraction (BE23) et deux Blancs de Librairie (BL12 et BL19). Entre 1,2 et 2 millions de reads paired-end ont été produits pour chaque blancs et nous avons recherché la présence de séquences mitochondriales et génomiques humaines selon le même protocole que celui utilisé pour les échantillons.

Les communautés microbiennes présentes dans les extraits ADN ont été caractérisées à l'aide de MetaPhlAn (Metagenomic Phylogenetic Analysis version 1.7.7, février 2013) et MALT (MEGAN Alignment Tool version 0.4.0) (114).

Pour MetaPhlAn, nous avons aligné les reads collapsés de chaque échantillon sur les séquences de la base de données MetaPhlAn en utilisant les paramètres par défaut de l'aligneur BOWTIE 2 version 2.1.0 (242). Pour éviter des biais dans le calcul de l'abondance microbienne relative,

les doublons de PCR ont été identifiés et retirés (243). Ensuite, les ensembles taxonomiques microbiens ainsi que leur abondance relative ont été déterminés à tous les niveaux taxonomiques. Pour illustrer la composition taxonomique des échantillons, nous avons utilisé le logiciel GraphPad Prism 7.

Pour le screening avec MALT, nous avons d'abord utilisé "malt-build" pour construire un index MALT avec la base de données nucléotidique de NCBI, janvier 2018 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). Ensuite, nous avons aligné les reads collapsés de tous les échantillons avec cette base de données en utilisant "malt-run". Le fichier produit a été utilisé pour l'analyse interactive de la composition taxonomique dans MEGAN6.

Afin d'évaluer la présence de contaminations bactériennes lors des manipulations au laboratoire, nous avons effectué une analyse MetaPhlAn avec la même méthode sur les blancs (26). Cette analyse n'a révélé que trois séquences bactériennes non identifiées dans le Blanc d'Extraction BE23 et aucune séquence dans les deux Blancs de Librairie (BL12 et BL19). Pour vérifier si ces résultats n'étaient pas liés au faible nombre de reads produits pour les blancs par rapport aux échantillons, 1,2 million de reads ont été sélectionnés au hasard pour tous les échantillons, pour créer des sous-échantillons et les mêmes analyses MetaPhlAn ont été réalisées.

Ensuite, tous les reads ont été alignés sur les séquences de référence du génome de 11 pathogènes dentaires en utilisant la version BWA 0.7.10-r789 avec les paramètres proposés par Schubert et collègues (107, 241). Seuls les reads ayant une qualité de mapping (alignement) supérieure à 25 ont été conservés. Les doublons PCR ont été supprimés à l'aide de la fonction MarkDuplicates de PICARD TOOLS version 1.88 (107).

Integrative Genomics Viewer, IGV (outil de visualisation de haute performance) a été utilisé pour examiner les données alignées sur les génomes des bactéries pathogènes dentaires (244,

245). Le logiciel GraphPad Prism 7 a ensuite été utilisé pour créer une représentation visuelle du type et de la proportion de chacun des 11 pathogènes dans les échantillons dentaires.

Partie 4 : Résultats et discussion

Au niveau macroscopique, sur les 6 individus, nous avons relevé la présence de signes infectieux bucco-dentaires sur les dents et les mâchoires de cinq sujets parmi les six sujets étudiés : caries dentaires, pertes osseuses liées à une parodontopathie ; lésions ostéolytiques liées à des LIPOE ou à des kystes résiduels. Au niveau métagénomique, de nombreux pathogènes dentaires ont été identifiés sur cinq des six dents étudiées : *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Streptococcus sanguinis*, *Rothia dentocariosa*, *Parvimonas micra*, etc. *Streptococcus mutans*, chef de file des bactéries responsables de la carie dentaire et *Porphyromonas gingivalis*, impliqué dans les maladies parodontales étaient abondamment présentes dans ces échantillons anciens. Pour les cinq sujets concernés, nous avons observé une correspondance entre les signes infectieux observés macroscopiquement et radiologiquement et les bactéries retrouvées grâce à la métagénomique.

Par exemple, pour le sujet 213, l'examen macroscopique révèle au maxillaire des traces d'alvéolyse au niveau d'une prémolaire (catégorie 3 de Kerr). A la mandibule, on note des pertes dentaires ante-mortem (34-35-37-38-45-46-47-48) ainsi que des traces d'alvéolyse au niveau des incisives évoquant une parodontopathie. On note aussi un orifice sur la face interne de l'angle mandibulaire droit ainsi qu'une soufflure des corticales vestibulaires et linguales. Un trajet fistuleux est mis en évidence sur l'orthopantomogramme et au CBCT, évoquant la présence d'un processus infectieux à type de kyste résiduel intra-mandibulaire (**figure 49**).

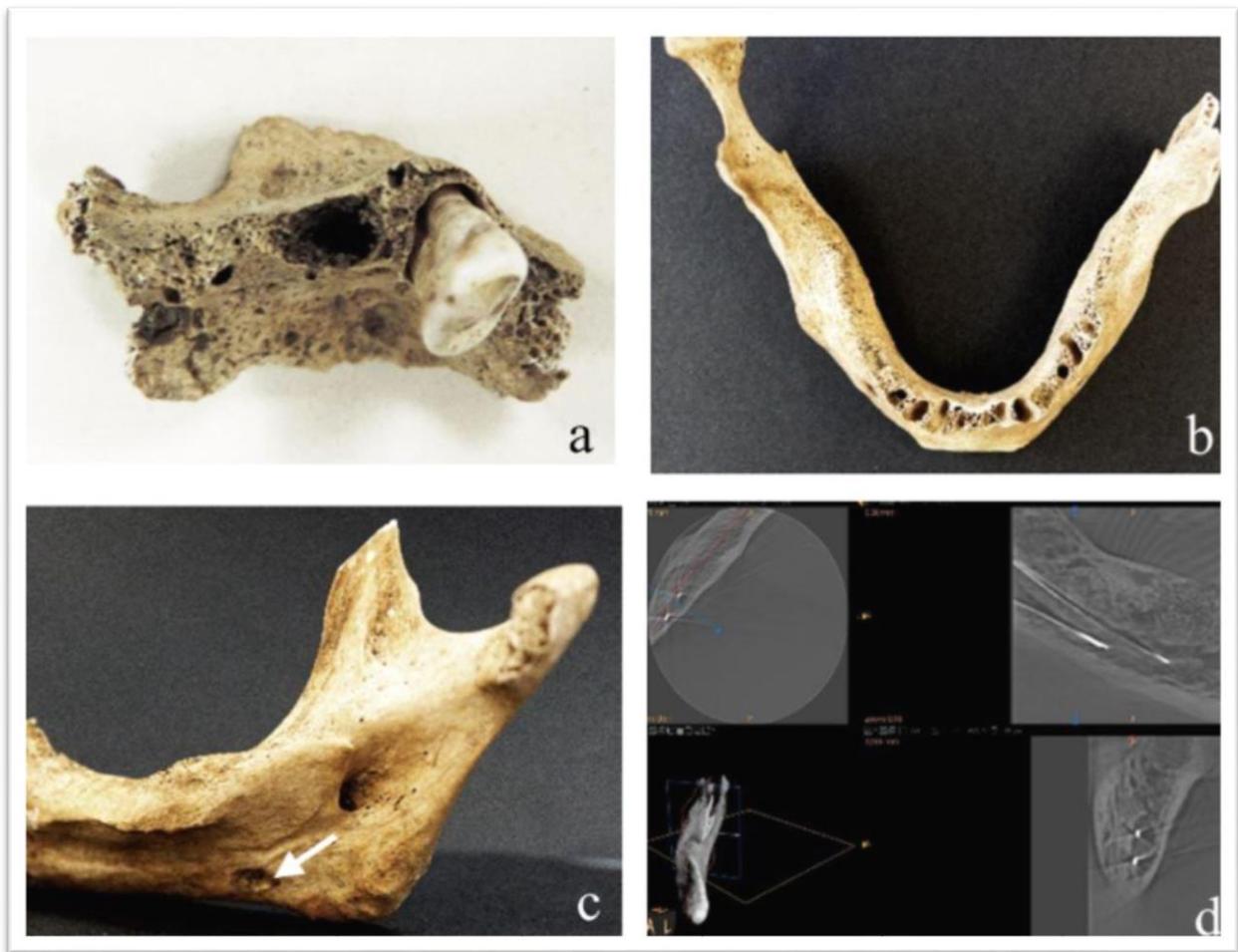


Figure 49: Examen macroscopique et radiologique du sujet 213 : a) région septale maxillaire avec un aspect de découpes irrégulières (catégorie 3 de Kerr) ; b) soufflure des corticales mandibulaires vestibulaire et linguale ; c) ostium fistuleux présent sur la face interne droite de la mandibule (flèche blanche) ; d) mise en évidence du trajet fistuleux au CBCT.

Au niveau métagénomique, on retrouve chez ce sujet *Pseudoramibacter alactolyticus*, présent dans les infections de l'endodonte (LIPOE) ainsi que *Porphyromonas gingivalis* ; *Parvimonas micra* ; *Treponema denticola* ; *Actinomyces viscosus* et *Campylobacter rectus* retrouvés dans les parodontopathies.

4.1) Tableau récapitulatif des résultats obtenus

Un récapitulatif des signes infectieux bucco-dentaires observés et des bactéries mises en évidence par shotgun chez les sujets échantillonnés est montré dans le tableau 7.

Sujet	Fosse	Age	Sexe	Dent	Signes infectieux macroscopiques	Bactéries mises en évidence par shotgun
213	2	Adulte jeune (> 30 ans)	M	Canine supérieure gauche (dent 23)	Signes de parodontopathie. Abouchement de kyste résiduel probable.	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> ; <i>Porphyromonas gingivalis</i> ; <i>Parvimonas micra</i> ; <i>Treponema denticola</i> ; <i>Actinomyces viscosus</i> ; <i>Campylobacter rectus</i>
306	3	Adulte (> 40 ans)	M	Molaire inférieure droite (dent 47)	Tartre LIPOE Reste radiculaire carié Pertes dentaires ante-mortem et alvéolyse du parodonte.	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> ; <i>Olsenella uli</i> ; <i>Actinomyces viscosus</i> ; <i>Parvimonas micra</i> ; <i>Streptococcus mutans</i> ; <i>Treponema denticola</i> ; <i>Porphyromonas gingivalis</i> ; <i>Campylobacter rectus</i>
308	3	Adulte jeune (>30 ans)	M	Molaire supérieure gauche (dent 28)	Pas de signes infectieux bucco-dentaires.	Pas de pathogènes dentaires retrouvés
309	3	Adulte jeune	M		LIPOE	<i>Olsenella uli</i> ;

		(20-30 ans)		Molaire inférieure gauche (dent 37)	Présence de caries.	<i>Streptococcus mutans</i>
403	4	Adulte jeune (20-30 ans)	M	Molaire inférieure droite (dent 47)	Carie.	<i>Streptococcus mutans</i>
406	4	Adulte jeune (>30 ans)	M	Molaire inférieure gauche (dent 37)	Caries.	<i>Pseudoramibacter alactolyticus;</i> <i>Rothia dentocariosa;</i> <i>Streptococcus sanguinis</i>

Tableau 7 : Récapitulatif des signes infectieux bucco-dentaires observés au niveau macroscopique et des bactéries mises en évidence par séquençage shotgun.

Ces résultats montrent des microbiomes oraux caractéristiques, diversifiés et spécifiques à chaque individu. Ils offrent aux odontologues ainsi qu'aux anthropologues une première vision de l'état sanitaire bucco-dentaire de cette population rurale du XVIIIe siècle. Les résultats complets de ce travail sont disponibles dans l'article qui suit, publié en 2018 dans la revue Plos One.

4.2) La publication scientifique

RESEARCH ARTICLE

Oral health status in historic population: Macroscopic and metagenomic evidence

Claire Willmann^{1,2c}, Xavier Mata^{1c}, Kristian Hanghoj^{1,3}, Laure Tonasso¹, Lenka Tisseyre¹, Céline Jeziorski⁴, Elodie Cabot^{5,6}, Pierre Chevet⁵, Eric Crubézy¹, Ludovic Orlando^{1,3}, Rémi Esclassan^{1,2‡}, Catherine Thèves^{1‡*}

1 Laboratoire d'Anthropologie Moléculaire et d'Imagerie de Synthèse UMR 5288, Université de Toulouse, CNRS, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, **2** Service d'odontologie de l'Hôtel-Dieu, Toulouse, France, **3** Centre for GeoGenetics, Natural History Museum of Denmark, Copenhagen, Denmark, **4** INRA, US 1426, GeT-PlaGe, Genotoul, Castanet-Tolosan, France, **5** Institut National de Recherches Archéologiques Préventives, INRAP Grand Ouest, Cesson-Sévigné, France, **6** Anthropologie Bio-Culturelle, Droit, Ethique et Santé, Faculté de Médecine Site Nord (UMR 7268), Marseille, France

© These authors contributed equally to this work.
 ‡ These authors also contributed equally to this work.
 * catherine.theves@univ-tlse3.fr



OPEN ACCESS

Citation: Willmann C, Mata X, Hanghoj K, Tonasso L, Tisseyre L, Jeziorski C, et al. (2018) Oral health status in historic population: Macroscopic and metagenomic evidence. PLoS ONE 13(5): e0196482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196482>

Editor: David Caramelli, University of Florence, ITALY

Received: June 14, 2017

Accepted: April 13, 2018

Published: May 16, 2018

Copyright: © 2018 Willmann et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All raw data files are available from the NCBI database (BioProject PRJNA302605, SRA accession numbers SRR5581849, SRR5581851-58 and SRR6785785-87).

Funding: aDNA analyses were funded by the Institut National de Recherches Archéologiques Préventives (INRAP), France. C. Willmann's laboratory PhD work was funded by the Institut Français pour la Recherche Odontologique (IFRO). This work was performed in collaboration with the

Abstract

Recent developments in High-Throughput DNA sequencing (HTS) technologies and ancient DNA (aDNA) research have opened access to the characterization of the microbial communities within past populations. Most studies have, however, relied on the analysis of dental calculus as one particular material type particularly prone to the molecular preservation of ancient microbial biofilms and potential of entire teeth for microbial characterization, both of healthy communities and pathogens in ancient individuals, remains overlooked. In this study, we used shotgun sequencing to characterize the bacterial composition from historical subjects showing macroscopic evidence of oral pathologies. We first carried out a macroscopic analysis aimed at identifying carious or periodontal diseases in subjects belonging to a French rural population of the 18th century AD. We next examined radiographically six subjects showing specific, characteristic dental pathologies and applied HTS shotgun sequencing to characterize the microbial communities present in and on the dental material. The presence of *Streptococcus mutans* and also *Rothia dentocariosa*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Olse-nella uli* and *Parvimonas micra* was confirmed through the presence of typical signatures of post-mortem DNA damage at an average depth-of-coverage ranging from 0.5 to 7X, with a minimum of 35% (from 35 to 93%) of the positions in the genome covered at least once. Each sampled tooth showed a specific bacterial signature associated with carious or periodontal pathologies. This work demonstrates that from a healthy independent tooth, without visible macroscopic pathology, we can identify a signature of specific pathogens and deduce the oral health status of an individual.

GeT core facility, Toulouse, France (<http://get.genotoul.fr>), and was supported by France Génomique National infrastructure, funded as part of "Investissement d'avenir" program managed by Agence Nationale pour la Recherche (contract ANR-10-INBS-09). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Dental medicine has an active branch of research focusing on the characterization of bacteria and oral biofilms because they are associated with the most common oral pathologies: caries, periapical and periodontal diseases [1]. Such oral pathologies are extremely frequent amongst the populations of industrialized countries and have a major impact on the individual well-being and health care provisions [1, 2]. It is well established that dental plaque and calculus represent examples of microbial communities embedded within biofilms, and studies of the plaque are making a significant contribution to the understanding of these topical areas [3–5]. Dental caries consist of multifactorial diseases influenced by the host diet and are associated with increased proportions of acidogenic and aciduric (acid-tolerating) bacteria, especially from the genera *Streptococcus* (*S. mutans* and *S. sobrinus*) and *Lactobacillus*, which are involved in the enamel demineralization process [1, 4–6]. Periapical pathologies are predominantly caused by Gram positive cocci and Gram-negative rods such as *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Olsenella uli* or *Parvimonas micra* [7–9]. In addition to causing severe local pain, periapical microorganisms can be responsible for serious complications such as cellulitis and septicemia [10]. In contrast, gingivitis is associated with a general increase in plaque mass around the gingival margin, which provokes an inflammatory response in the host, while increased levels of anaerobic bacteria, including Gram-negative proteolytic species (especially belonging to the genera *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Fusobacterium* and *Treponema*), are recovered from periodontal pockets.

For decades, the periodontal status of ancient populations has been of interest in dental archaeology and anthropology [11]. However, the underlying studies have mostly consisted of macroscopic observations, using measurements on archeological material from various collections [12, 13]. Recently, metagenomic has provided a new tool to access the genetic information of a whole microbial community directly via the sequencing of its total DNA content [14, 15]. The application of such technologies to dental calculus material from ancient individuals has started revealing the oral microbial communities from past populations [16–19] and provides a unique opportunity to advance our knowledge on the bacterial/periodontal status of the oral cavity at key transitional periods in our history [20–22]. Yet, a number of questions still remain open, such as the exact nature of the bacteria/pathogens present at particular historical periods and whether the diversity of commensal microorganisms has been affected by modern diet and lifestyle [23]. Additionally, with only one healthy tooth available, our study attempted to reconstruct and detect ancient oral pathogens allowing the deduction of the oral health status relative to macroscopic data. To answer these questions, we investigated the oral microbiome of some 6 French individuals who lived in pre-industrial rural communities in the 18th century AD.

In 2009–2010, as urban construction progressed in the city of Le Mans, in western France, archaeological graves were discovered [24, 25]. These excavations were identified as a mass burial after the battle of Le Mans, which took place between the "Catholic and Royal Army" and the "Republican Army" and was precisely dated at 12th-13th December 1793 [24]. The graves provided a sample of 154 ancient individuals, all identified as natives from western France thanks to historical sources [26]. This archaeological group was composed mainly of young men, mostly members of the "Catholic and Royal Army", but also included 30% of women and teenagers [27]. This sample, thus, provides a snapshot of a French rural population at the end of the 18th century.

We undertook a macroscopic and molecular analysis of the Le Mans archaeological sample aimed at 1) identifying subjects with characteristic dental pathologies through complete macroscopic and radiographic examinations, 2) characterizing the taxonomic composition of the

oral flora using shotgun HTS sequencing, and 3) detecting the oral pathogenic bacteria responsible for carious, periapical or periodontal diseases from an entire tooth without macroscopic pathology [28].

Materials and methods

Historical context, archaeological site

Following the French Revolution of 1789, the young Republic was confronted with a league of armies of monarchic Europe. In western France, military conscription was harshly resented and armed uprisings took place, later named and organized under the name of the Catholic and Royal army. This troop consisted mostly of a composite group of peasants, which represented 80% of the local population at that time. Confrontation between the revolutionary and monarchist armies resulted in the wars of Vendée [26]. On December 12th and 13th 1793, the two armies opposed each other in the city of Le Mans. The losses of this battle were largely to the detriment of the monarchist army, probably with some collateral victims among Le Mans inhabitants. In the days following the battle, for fear of an epidemic, the bodies were hastily and confusingly disposed of in several pits around the city.

Following the discovery of archaeological pits, the study was granted according to Orders for the prescription of a preventive archaeological operation (operation 2009–079) issued by the “Préfet de la Région Pays de la Loire”; by-law numbers: 228 and 099; Number of archaeological site or entity: 721810083 (antique site) and 72181010122 (mass graves). All specimens are publicly deposited in the “Service Régional de l’Archéologie (SRA) des Pays de Loire” which depends on the Ministry of Culture. Nine of these mass graves were excavated by the Institut National de Recherches Archéologiques Préventives (INRAP), in 2009–2010 under the Quinconce des Jacobins in Le Mans, France [24, 25]. For these nine graves, 154 skeletons were excavated, and nine subjects were analysed (213;306;307;308;309;312;403;406;702). The graves contained contextual artifacts such as a Louis XV silver crown coin, a button from an army uniform (12th regiment of dragoons) and small gold crosses. Numerous skeletons showed traumas in correlation with the historical reports of the Battle of Le Mans [24]. For these nine graves, 154 skeletons were excavated, with 62% identified as males, 31% as females and 6% (11 remains) undetermined. Among these individuals, 87% could be considered morphologically as adults (>18 years old) and 13% as immatures. Among the immatures, 6% were adolescents (15–19 years old) and 7% infants (<15 years old) [27].

The general preservation state of the bones and dental pieces was extremely variable across individuals and graves. In particular, some of the mandibles and maxillae were almost intact, while others were fragmented (in particular at the level of very thin bone parts such as dental septa and vestibular tables), or showed more or less extensive degradation of the bony bases, sometimes going as far as complete destruction of the jaw bone.

Sampling of teeth and bones

The teeth and bones analyzed in this work came from pits numbered from 1 to 9 (S1 Table) [27]. During the excavation, only teeth preserved within the maxillary or mandibular alveolar bone from an identified subject were sampled for DNA analysis and were directly placed in individual bags, transported to the laboratory, and stored in controlled conditions (-20°C). Photos, X-rays and Cone Beam Computed Tomography (CBCT) images of the maxillae and mandibles from selected subjects were taken in the laboratory after tooth sampling for logistical arrangements. For some individuals, bones were collected, in the same conditions as those cited above, first for individual sex identification [27] and second, for use as negative controls in shotgun sequencing.

All the laboratory work was performed in the dedicated aDNA facilities at the AMIS laboratory (Toulouse, France), according to strict aDNA standards [29, 30].

Morphological, macroscopic and radiographic analyses

An analytical macroscopic dental study of the teeth, mandible and maxilla was performed in each of 137 subjects (89.6% of the total population), considering only teeth still positioned on dental arches [25, 31]. The dental study of all individuals was based on the macroscopic observation of the mandibular and maxillary pieces. The data obtained from the observation of the pieces were reported on an individual evaluation sheet for each subject and included tooth wear, dental calculus, carious and periodontal diseases (accessible data in [25, 32, 33]). Following this analysis, we observed serious carious, periapical or periodontal pathologies for six individuals in particular (see Table 1 and S1 Table), which were selected for a more complete investigation. Caries were diagnosed macroscopically by two observers using a dental probe and a bright light. Lesions were considered as carious if there was cavitation and a clear defect in tooth structure; enamel colorations without tooth cavitation were not taken into account. A simplified classification based on a WHO (World Health Organization) report describing different stages of carious disease was used: cavities were divided into three categories: A, B and C, depending on the severity of the lesion [34]. Category A designated enamel cavities; category B designated cavities limited to dentine and category C designated very decayed teeth, with coronary destruction and pulp communication. The number of cavities and their locations were charted (occlusal, proximal, buccal/lingual, root and pulp) [35, 36]. Additionally, X-ray examinations were performed using retroalveolar X-ray films for maxillae (X-ray apparatus: Xmind Satelec Acteon) and panoramic or occlusal X-ray films (X-ray apparatus: Kodak 3000) for mandibles.

Periodontal bone loss was evaluated by a visual examination using a periodontal probe and was differentiated from attrition or post-mortem damage [13, 37]. Kerr’s method using septal form and texture characteristics for assessing periodontal status was used [12, 13]. This method classifies bone septal morphology in 6 categories, which represents increasing stages of periodontal disease. According to Kerr, categories 1 and 2 represent a “healthy” periodontal state whereas categories 3, 4 and 5 represent an altered status of septal bone and suggest periodontitis (S2 Table) [12]. Dental calculus was recorded if present.

Table 1. Illumina sequencing data from aDNA extracts, mapping metrics and level of contamination.

sample id	213	306	307	308	309	312	403	406	702
Tissues	Tooth	Tooth	Bone	Tooth	Tooth	Bone	Tooth	Tooth	Bone
Total number of reads (paired-end)	23.1 M	29.9 M	22.4 M	23.7 M	19.3 M	21.6 M	21.7 M	22.3 M	24.6 M
Post-trimming reads	22.9 M	29.5 M	22.2 M	23.5 M	19.2 M	21.3 M	21.5 M	22.2 M	24.4 M
Collapsed reads	20.9 M	20.4 M	19.9 M	22.3 M	17.9 M	14.9 M	20.5 M	19.7 M	21.7 M
Unique human reads* (nuclear + mitochondrial)	0.56 M	4.5 M	40 000	20 000	20 000	90 000	0.4 M	3.6 M	.
Clonality (human)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.04	0.01	0.02	.
Human nuclear genome coverage	0.02	0.16	0.001	0.0005	0.0006	0.004	0.01	0.13	.
Human mitochondrial genome coverage	2.93	9.10	0.30	0.73	0.65	0.18	4.10	19.10	.
% Endogenous	2.5%	15.4%	0.2%	0.1%	0.1%	0.4%	1.9%	16.2%	.
Total number of tooth pathogen reads	122 826	280 591	1 864	961	11 576	2 490	3 593	35 143	678
Total number of tooth pathogen reads/total number of reads (%)	0.53%	0.94%	0.01%	0.00%	0.06%	0.01%	0.02%	0.16%	0.00%

M, millions.

* After duplicate removal, and “.” Values lower than 100 reads

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196482.t001>

Osteolytic infectious lesions of endodontic origin, such as periapical granulomas or cysts, bone deformation due to residual periodontal cysts and intra bony cavities, were recorded by macroscopic and radiological examinations using orthopantomogram, retroalveolar X-ray or Cone Beam Computed Tomography (CBCT) techniques (X-ray apparatus: Kodak 3000) [38]. Dental abscesses were scored as present when maxillary or mandibular bone was destroyed by an infectious process creating a rounded cavity in the spongy bone and a radiolucent lesion. If the infectious phenomena were externalized, the related fistula and cortical bone loss were charted [37, 39, 40].

Tooth and bone preparation for aDNA extraction

A well-preserved tooth was sampled for each individual. Samples were cleaned in a dedicated aDNA laboratory, applying standard precautions for working on aDNA [35, 41]. The surfaces of the teeth samples were abraded to remove the calculus when present, cleaned with bleach (at 20% for 30 sec) and rinsed with H₂O MilliQ[®] (Millipore). Each tooth or bone was exposed to UV light for 30 min on each side [27]. Tooth surfaces were abraded with single use scalpel equipment, while bones were abraded with Dremel[®] and samples were reduced to a fine bone powder in liquid nitrogen using a Spex SamplePrep™ 6870 Freezer/Mill™ (Fisher Scientific). DNA extraction was performed from 200 mg of tooth or bone powder, using silica filter column-based procedures, as described previously [41].

aDNA Library preparation and sequencing

We constructed one single-indexed Illumina DNA library per individual aDNA extract (5 µl), following the methodology based on blunt-ended adapter ligation (from [42, 43]), but using a NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) according to the manufacturer's protocol. Blunt-end libraries were built with 0.750 µM as the final concentration of Illumina multiplex adapters. Each library building reaction was purified on 86.5 µl of AMPure XP beads (Beckman A6388) according to the manufacturer's protocol. Libraries were eluted by adding 25 µl TE1X following room temperature incubation for 5 min. The libraries were first amplified in a 50 µl volume reaction using 22 µl of DNA Library, 25 µl pf PCR Master Mix 2X (NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit), 1 µl of InPE1 primer (25 µM), 1 µl of InPE2 Primer (0.5 µM) and 1 µl of an Index Primer (25 µM) for which 7 nucleotides corresponded to indexing oligo sequences [42]. The first PCR cycling conditions were initial denaturation for 30 sec at 98°C, followed by 8 cycles of 10 sec denaturation at 98°C, 30 sec annealing at 60°C and 40 sec elongation at 72°C. Finally, there was a 5 min elongation step at 72°C. PCR products were purified on 50 µl of AMPure XP beads and eluted by adding 30 µl of TE1X. A second round of PCR amplification was performed from 5 µl of purified product of the first PCR in a final volume of 25 µl using 0.5U Taq Gold (Life Technologies); 1X Gold Buffer; 2 mM MgCl₂; 200 µM of each dNTP; 0.1% DMSO; and 1 µl of InPE1 primer (25 µM), 1 µl of InPE2 (0.5 µM) primers [42] and 1 µl of an Index Primer (25 µM). The second PCR cycling conditions were an initial denaturation for 10 min at 92°C, followed by 8 cycles of 30 sec denaturation at 92°C, 30 sec annealing at 60°C and 40 sec elongation at 72°C, and final elongation at 72°C for 7 min. These second PCR products were purified on 30 µl of AMPure XP beads (Beckman Coulter) and eluted by adding 30 µl of TE1X. DNA contamination from the laboratory and reagents was monitored through mock controls (Extraction blank, and Library blank), which were processed at the same time as the samples.

Amplified library concentrations were estimated on a BioAnalyzer instrument using High-Sensitivity DNA chips (Agilent Technologies) for both controls and ancient samples and pooled in equimolar ratios prior to sequencing on the Illumina HiSeq2500 on the GeTPlage

platform (Castanet-Tolosan, France) using 100 cycles on a paired-end mode. To evaluate possible bacterial contaminations by DNA handling (skin microbes), by laboratory sources (reagents, plastics or materials), and by storage conditions (bacteria overgrowth; [44]), one Blank Extraction (BE23) and two Blank Libraries (BL19 and BL12) were amplified for 25 cycles (same conditions as for ancient samples), purified with Ampure XP beads (Beckman Coulter) to reach a concentration compatible with further sequencing. Amplified Blanks Libraries were pooled in equimolar ratios and sequenced on MiniSeq Illumina available at AMIS, using 80 cycles and a paired-end mode.

Sequence analysis

Metagenomic sequencing was performed on six teeth from six subjects. For comparison and control of bacterial communities coming from the soil with the buccal bacterial community, three bones from three other subjects were also sequenced as environmental/soil controls (S1 Table).

The DNA sequence data generated in this study have been deposited on the NCBI database (Bioproject PRJNA302605, SRA accession numbers SRR5581849, SRR5581851-58 and SRR6785785-87). Methods for the read sequencing process, for the analysis of nuclear and mitochondrial human genomes and aDNA damage are described in S1 Appendix. The identification method of microbial communities by MetaPhlan and MALT software are also described in S1 Appendix. Finally, dental pathogen genomes were selected for their involvement in oral pathologies such as caries, periapical abscesses and periodontal diseases according to our macroscopic and radiologic analyses. Estimates of human DNA contamination levels based on mitochondrial sequences within blanks and samples are also provided in S1 Appendix, together with an analysis of the DNA bacterial content of both Extraction and Library Blanks.

Results

Macroscopic and radiographic examination

For subject 213, the maxillary septal region in the mesial and distal sides of tooth 14 showed a sharp, ragged aspect corresponding to Kerr's third category of periodontal disease (Fig 1, 213a).

The mandibular alveolar bone in the incisive region showed septa similar to those observed on the maxilla on both sides of tooth 14, sorted as Kerr's third category (Fig 1, 213b). Mandibular cortical bone was deformed on the right part of the horizontal branch and a fistula aperture was present on the inner part of this branch (Fig 1, 213b and c). On CBCT examination, the fistula's pathway was different from the inferior alveolar nerve pathway (Fig 1, 213d).

For subject 306, teeth 11 to 14 and 21 to 24 were present on the maxillary arch and had significant deposits of dental calculus on their surfaces. Septa showed a loss of normal contour with a smooth textural surface and a slightly concave form, rated as Kerr's fourth category (Fig 1, 306a).

The septal morphology on the posterior mandibular part was disorganized, riddled and therefore charted as Kerr's third category of periodontal disease. Macroscopically, the second lower right premolar (tooth 45) was a retained root and there was a radiologically visible granuloma on the apical part of this tooth (Fig 1, 306b and c).

For subject 308, all maxillary teeth (except tooth 26, which was on a broken part of the alveolar bone, and wisdom teeth) were present on the maxillary arch at death and were lost post-mortem. There were no traces of tooth decay, dental calculus or periodontal disease on either teeth or alveolar bone (Fig 1, 308a). Teeth 31, 32, 34, 35, 41, 42 and 44 to 47 were present on

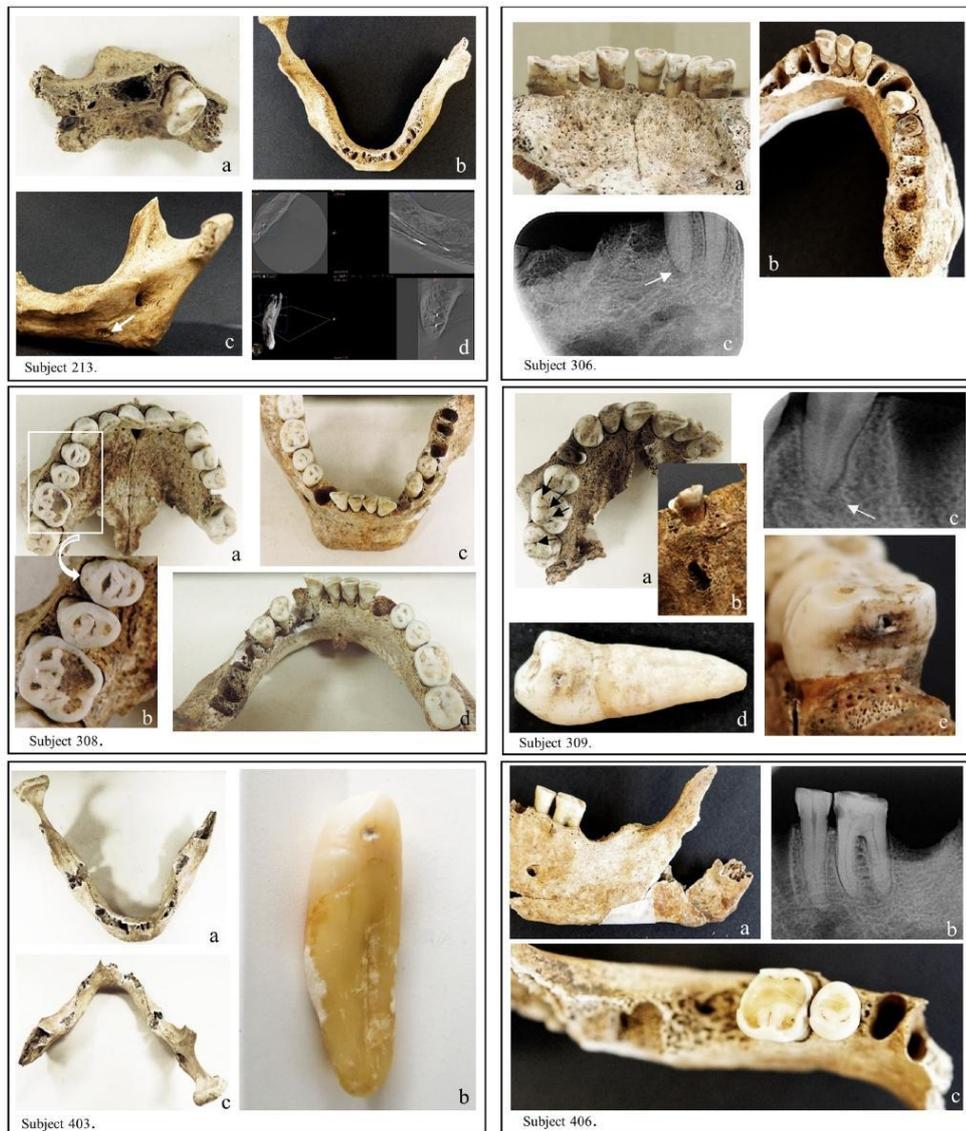


Fig 1. Photographs, X-ray and Cone Beam Computed Tomography (CBCT) of maxilla and mandible from sampled subjects. (Subject 213) a: maxillary septal region showing sharp, ragged aspect on both sides of tooth 14; b: deformation of the mandibular cortical bone on the right part of the horizontal branch; c: inner part of the mandibular right horizontal branch showing a fistula aperture (indicated by a white arrow); d: CBCT examination differentiating the fistula's pathway and the inferior alveolar nerve pathway. (Subject 306) a: maxillary teeth presenting significant deposits of dental calculus; b: disorganized and riddled posterior mandibular septal morphology and destruction of the crown part of tooth 45; c: X-ray view of a granuloma

on the apical part of tooth 45 (indicated by a white arrow). (Subject 308) a; c and d: sound teeth, maxillary and mandibular bones (dental calculus presents on lingual tables of teeth 31 and 41; b: focus on important dental wear on teeth 14; 15 and 16. (Subject 309) a: groove decay on the occlusal tables of maxillary teeth 16 and 17 (indicated by black arrows); b: vestibular fenestration of the maxilla in front of the root apex of tooth 14; c: radiologically visible periapical cyst on the apex of tooth 14 (indicated by a white arrow); d: decay on the distal table of tooth 34; e: decay on the mesial table of tooth 46. (Subject 403) a and c: no teeth on the mandibular arch (except tooth 43 which was sampled for analysis); b: closer view of tooth 43 showing a small patch of distal decay. (Subject 406) a: external view of the left horizontal mandibular branch supporting teeth 35 and 36; b: retroalveolar X-ray image highlighting decay on distal table of tooth 35 and mesial table of tooth 36; c: occlusal view of teeth 35 and 36 revealing dental coloration due to the decay process between the two teeth. Pictures realized and assembled by C. Willmann.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196482.g001>

the mandibular arch. Teeth and alveolar bone appeared macroscopically sound without traces of tooth decay, or periodontal disease. Dental calculus was present on lingual tables of teeth 31 and 41 (Fig 1, 308c and d).

For subject 309, macroscopic examination of the maxilla revealed groove decay on the occlusal tables of teeth 16 and 17, charted as category A (Fig 1, 309a). Tooth 14 was a retained root and a periapical cyst formation was radiologically visible (Fig 1, 309b and c). The cyst growth had progressively destroyed both periapical spongious and buccal cortical bones, leading to a vestibular fenestration of the maxilla in front of the root apex (Fig 1, 309b). Mandibular teeth 34 and 36 were decayed on their distal tables and therefore classified in category B (Fig 1, 309d). Decays were also observed on mesial tables of teeth 36 and 46, charted as category B (Fig 1, 309e).

For subject 403, there were no teeth on the mandibular arch except tooth 43, which presented a small area of decay (category A) on its distal surface (Fig 1, 403a, b and c).

For subject 406, macroscopic and radiological examinations of the mandible highlighted tooth decay on the mesial table of tooth 36 and on the distal table of tooth 35, rated as category B, without signs of dental pulp necrosis or periapical lesions (Fig 1, 406a, b and c). The results section of [S1 Appendix](#) provides a more detailed morphological analysis of the six selected subjects.

Endogenous aDNA

The metagenomic data obtained from aDNA extractions of whole teeth and bone fragments from ten subjects are described in [Table 1](#). We observed that, while numbers of reads obtained from each library were between 19.3 and 29.9 million (M), the number of reads mapping against the human nuclear and mitochondrial genome was very variable between subjects and tissues. This pertains to marked differential preservation levels in the material analyzed, despite its relatively limited age.

The authenticity of ancient human DNA was confirmed through the presence of typical molecular signatures of post-mortem DNA damage (Fig 2 and [S2 Appendix](#)), including fragmentation patterns consistent with depurination and mis-incorporation patterns supporting cytosine deamination within overhangs [45]. This analysis was applied on all samples, when the number of reads was sufficient, for nuclear DNA (hg 19) and main oral pathogens (see [S2 Appendix](#)). It appears that seeing the observed transitions for certain species, the mapping could be less specific and could cluster reads from common genus. MtDNA and bacterial analyses on samples and Blanks showed the absence of contamination, see results on Endogenous DNA in [S1 Appendix](#) for more details.

Metagenomic profiling

Microbial taxonomic profiling was performed using both the methodology described by Schubert and colleagues [46] and based on the MetaPhlAn specific database, and MALT [47] applied to the NCBI nucleotide database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). One

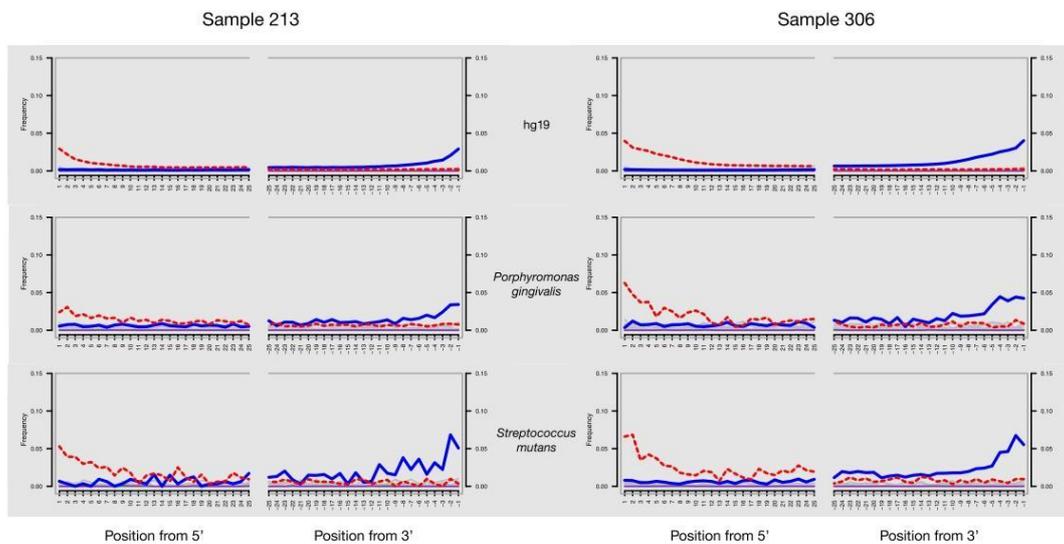


Fig 2. DNA damage patterns for teeth of subjects 213 and 306. The frequencies of all possible mismatches observed between the human nuclear genome (hg19), the *P. gingivalis* and *S. mutans* chromosomes and their mapped reads, respectively, are reported in gray according to the distance from 5' end (left panel, first 25 nucleotides sequenced) and distance to 3' end (right panel, last 25 nucleotides sequenced). The typical DNA damage mutations C>T (5') and G>A (3') are reported in the dotted and solid lines, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196482.g002>

output of MetaPhlAn software was the relative abundances of reads showing significant matches to microbial genome databases. Fig 3 illustrates specific microbial abundances (%) detected in MetaPhlAn database in teeth and bones libraries. It was noted that the bone libraries 312 and 307 were different from 702, with a specific pattern demonstrating no contamination by bacterial pathogen DNA in the laboratory steps. Bone libraries were essentially composed of bacteria from the soil: mainly of *Arthrobacter sp.* for sample 307; of *Nitrobacter sp.* and of *Bacillus haludorans* for sample 312; of *Nitrobacter sp.* and of *Rhodococcus erythropolis* for sample 702. The MetaPhlAn analysis of the bacterial composition of tooth libraries showed the presence of dental pathogens (Fig 3): *Actinomyces viscosus*, *Campylobacter rectus*, *Olsenella uli*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudoramicrobium alactolyticum*, *Streptococcus mutans/sanguinis*, *Treponema denticola*, and *Rothia dentocariosa*, which were identified in subjects 213, 306, 309, 403, and 406. No dental pathogens were detected using both MetaPhlAn and MALT in the tooth of subject 308, suggesting both a healthy tooth and the absence of cross-contamination between samples.

Differences were observed between the taxonomic read assignments derived from MetaPhlAn and MALT, especially pertaining to the identification of three oral bacteria (*P. alactolyticus*, *C. rectus* and *A. viscosus*), which were identified in MetaPhlAn (from 48% to 0.4% in S4 Table for 213, 306 and 406 samples in S5 Table for percentage edited by MetaPhlAn) but not in MALT (S6 Table). Reciprocally, MALT revealed the presence of the dental pathogen *Tannerella forsythia* in 213 sample at a particularly-high abundance level (34%) and in sample 306 (9%; S4 and S6 Tables with complete hits from MALT-MEGAN6), but this pathogen remained undetected by MetaPhlAn. This confirms that different computational tools presently available

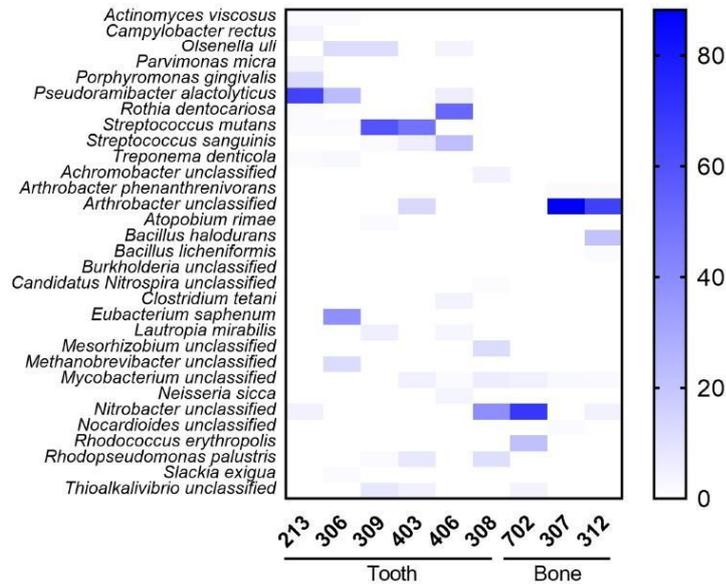


Fig 3. Microbial analyses of ancient samples using MetaPhlAn. Heat Map representation of microbial taxonomic composition for teeth and bones libraries was realized with GraphPad Prism v.7 (GraphPad; La Jolla, CA).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196482.g003>

for carrying out a taxonomic identification of past microbial communities show different performances, probably due to various sensitivity and specificity levels, as well as differences in their underlying database [44].

In order to confirm the taxonomic assignments to major dental pathogens, we mapped the sequences against 11 reference genomes of dental pathogens involved in oral diseases like carious, periapical and periodontal processes [8, 48–56], listed in S3 Table. As shown in Table 1, the number of sequences showing high-quality alignments against pathogenic bacterial genomes differed amongst the tissues and subjects analyzed. Subjects 309 and 403 showed reads mapped against practically only one bacterial species, *S. mutans* (S4 Table); subject 406 presented a high number of reads for *R. dentocariosa* and reads mapped against *S. sanguinis*; subjects 213 and 306 gave some specific, substantial sequences characteristic of a pathological oral microbiome, such as *P. gingivalis* and *P. alactolyticus* in high numbers. Concerning these dental pathogens, we noticed that 1) high coverage was found for several pathogen genomes, from 0.5 to 7X. For example, in samples 213 and 306, we found *P. alactolyticus* at 4.4X and 7X, *T. forsythia* at 2X and 0.98X respectively; in 306, *O. uli* at 4.8X; in 406, *R. dentocariosa* at 1X; in 213, *P. gingivalis* at 0.6X and, in 309, *S. mutans* at 0.5X; 2). The mapped sequences covered positions in the genome at least once, with a minimum of 35%: from 35 to 50% for *P. gingivalis*, *R. dentocariosa* and *S. mutans*, 75% for *T. forsythia*, 82% for *P. alactolyticus*, and 93% for *O. uli*; 3) a specific pathogen signature was associated with the tooth of a given individual as seen in the detailed S4 Table and Fig 4, which gives a more accurate indication of the number of pathogen sequences (in bold) associated with the DNA extracted from the tooth of each subject. All

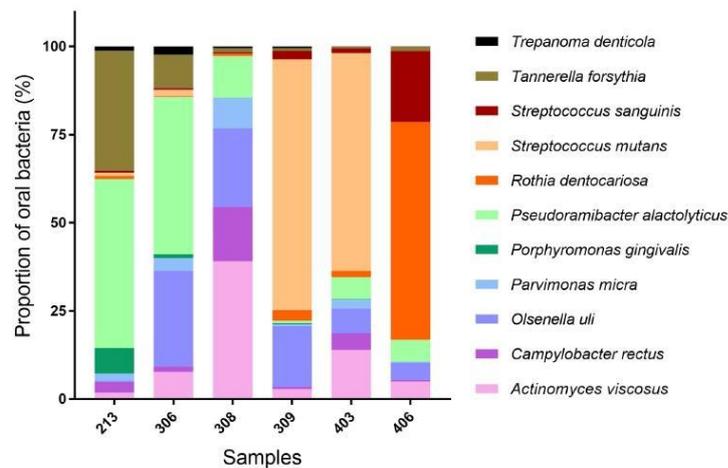


Fig 4. Graphical representation of 11 dental pathogens per tooth sample highlighting specific bacterial composition. Graphical representation was realized with GraphPad Prism v.7 (GraphPad; La Jolla, CA).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196482.g004>

these results were confirmed by displaying them with the IGV software, which showed a uniform distribution of reads along the bacterial chromosomes.

Discussion

Ancient oral microbiomes have only been recently opened to biomolecular investigation [57]. Here, we combined macroscopic and radiologic analyses with metagenomic analyses to identify dental pathogens present in bacterial communities from past individuals (Figs 1, 3 and 4). In contrast to previous studies, our methodology relied on taxonomic profiles recovered from total aDNA available from an entire healthy tooth (including root, pulp and cementum) and was thus not limited to dental calculus. HTS read mapping helped to identify characteristic pathogens responsible for carious, periapical or periodontal diseases [58] in six individuals that lived in the late 18th century (S1 Table), including not only *S. mutans*, but also *R. dentocariosa*, *A. viscosus*, *P. gingivalis*, *P. alactolyticus*, *O. uli*, *T. forsythia* and *P. micra* (S4 Table).

Interestingly, we detected a strong association between carious teeth from subjects 309 and 403 and the presence of *S. mutans* in the genetic data. This bacterium was identified some decades ago as the main etiological agent associated with the initiation of dental caries [1, 54]. Traditional culture-based methods have shown that *S. mutans* can be considered as the ‘chief pathogen’ for dental caries initiation [59]. It is also generally accepted that there is a relationship between *S. mutans* and diet, with individuals having frequent carbohydrate consumption showing increased levels of cariogenic bacteria such as *S. mutans* and a greater risk for dental caries development [4, 5, 60]. *S. mutans* is also considered as the organism best-adapted to a cariogenic environment (high sugar/low pH) [4, 5].

Metagenomic analysis of the tooth sampled from subject 406 also showed high levels of *S. sanguinis* (S4 Table and see Fig 4). *S. sanguinis* is a gram-positive, facultative anaerobe bacterium involved in carious disease [61]. *S. mutans* and *S. sanguinis* counteract each other in the process of oral biofilm formation, as *S. sanguinis* is able to inhibit *S. mutans* development [55].

Interestingly, subject 406 also revealed the presence of *R. dentocariosa*, representing as much as 62% of the bacterial species identified. To the best of our knowledge, this is the first time that *R. dentocariosa* is identified in an ancient population in such amounts (S4 Table; Fig 4). This bacterium is a commensal aerobic and facultative anaerobic, gram-positive organism showing both coccoid and branched filament elements [51, 53, 62]. It was previously known as *A. dentocariosa* [63], and was first isolated from carious dentin in humans. It is mostly found in the flora of the oral cavity, dental caries, and dental plaque from periodontal patients, but also in blood, respiratory secretions, abscesses, and wounds [53, 62, 64]. *R. dentocariosa* has long been considered as a low-virulence bacterium in humans but its potential to cause clinically-significant infections in immunocompromised patients is increasingly acknowledged [65]. This opportunistic pathogen is mainly involved in inflammatory processes and can induce opportunistic infections with an oral starting point, such as infective endocarditis, septicemia and pneumonia amongst others [52–54, 65–67].

It is interesting to observe that, in both subjects 213 and 306, *P. gingivalis* and *T. forsythia* were identified together with *T. denticola*, another bacterial pathogen. These obligate anaerobic Gram-negative bacteria form the periodontal “red complex” [51, 68, 69], a complex secreting virulence factors, where the three bacteria act synergistically, ultimately leading to the inflammation of the host periodontal tissue, bone immuno-inflammatory resorption and chronic periodontitis and other forms of periodontal disease [70]. (S4 Table; Fig 4) [68, 71]. Interestingly, both subjects 213 and 306 showed strong morphological evidence of ante-mortem dental losses. For subject 306, there was a large dental calculus deposit on the maxillary teeth (Fig 1, 306a) and, for subject 213, tooth 14 revealed periodontal bone loss rated as Kerr’s third category, which suggests an area undergoing an acute burst of periodontal activity and bone resorption consistent with the activity of the “red complex” (Fig 1, 213a). In contrast, septa from the maxillary bone of subject 306 showed a loss of normal contour with a smooth textural surface and a slightly concave form, which, according to Kerr, could correspond to quiescent non-progressive periodontitis (Fig 1, 306a).

We also found molecular signatures of a group of bacteria involved in endodontic troubles in four (213, 306, 309 and 406) of the six individuals analyzed. In particular, samples 213, 306 and 406 revealed the presence of *P. alactolyticus*, an anaerobic Gram-positive rod [72] considered by some authors as a good candidate for participation in the etiology of different forms of periradicular diseases [52, 58]. Moreover, it is amongst the most frequently identified micro-organism in the root canal of necrotic teeth associated with acute periapical abscesses [73, 74]. Macroscopically, the mandibular bone of subject 213 was deformed on the right part of the horizontal branch, which is reminiscent of an endosseous infectious phenomenon (Fig 1, 213b). On radiological and CBCT examinations, it suggested a residual periapical cyst in the right molar part of the mandibular bone, whose stoma was draining through an accessory canal of the mandibular nerve (Fig 1, 213d). For subject 306, tooth 45 was a retained root and there was a radiologically visible granuloma on its apical part (Fig 1, 306b and c). This tooth may have progressively decayed and broken down, leading to pulp necrosis and periapical granuloma formation. There were no periapical infections identified on teeth from subject 406 but the maxilla was missing, the mandibular bone was damaged and numerous teeth had been lost post-mortem, all of which impeded the diagnosis of possible endodontic lesions.

Subjects 306 and 309 were positive for *O. uli*, a Gram-positive anaerobic rod which has been recently recognized as a member of the endodontic microbial consortium of teeth with apical periodontitis. It is found in the common microbiota associated with primary endodontic infection [50, 75]. Both on macroscopic and X-ray examinations, subject 309 showed a large abscess on the apical part of tooth 14, which had progressively destroyed the maxillary bone, leading to a vestibular fenestration in front of the root apex (Fig 1, 309b and c). As was

the case for tooth 45 on subject 306, the tooth seemed to have progressively decayed and broken down causing pulp inflammation and necrosis.

Finally, the Gram-positive anaerobic coccus *P. micra* has been detected in subjects 213 and 306 [76]. This bacteria is known as part of the normal flora of the oral cavity and is extensively recognized as an oral pathogen. It has been isolated from multiple polymicrobial infections such as periapical and endoperiodontal lesions, periapical abscesses and periodontitis [8, 76, 77]. It has also long been recognized as a putative endodontic pathogen in necrotic root canals by studies using bacterial culture and molecular methods [78]. Macroscopic and radiological analysis of these two subjects showed endodontic and periapical impairments, in line with the molecular data (Fig 1, 213b, c, d and 306b and c).

The possibility of describing oral health, microbiomes and the evolution of oral pathogens from teeth, bones and dental calculus has been already established [16–18, 79, 80]. Our study confirmed that opportunistic pathogens associated with carious, endodontic and periodontal diseases can be identified in ancient tooth material. Moreover, in this work, we proposed a method to open access to the oral health status of an individual based on one healthy tooth, without calculus or macroscopic signs of disease. A specific microbial signature is associated to each subject which can help to diagnose oral pathologies in ancient dental human remains in absence of physiological evidence of ailments, for example, when parts of the jaw bones are missing.

From a historical standpoint, the 18th century AD in France was considered as a major period in the evolution of dental hygiene and increased lifespan of the dentition [81, 82]. This was also a period of progress in global hygiene [83]. According to a meta-analysis study collecting data from 29 cohorts with 4998 individuals [84], the frequency of caries and ante-mortem tooth loss was relatively stable prior to the 18th century, and mainly evenly distributed across Europe. But, the increasing availability of sugar would have led to a rise in caries and tooth loss from the 18th century onwards. Future work applying the methodology presented here to the full temporal range may provide direct evidence for this hypothesis. Applying the methodology described here to dental remains may also help understand the intimate role of the oral microbiome in the development of oral diseases.

Supporting information

S1 Table. Description of the 9 ancient human samples from archaeological graves resulting of the Battle of Le Mans, on 12th-13th December 1793.

(XLSX)

S2 Table. Classification suggested by Kerr, representing the evolution of periodontal disease.

(XLSX)

S3 Table. List of bacterial genomes used for mapping.

(XLSX)

S4 Table. Alignment statistics of reads mapped against dental pathogen genomes in teeth DNA extracts.

(XLSX)

S5 Table. Estimation of the percentage of reads mapped against known reference genomes by MetaPhlAn. Subsample created for estimation of the percentage of reads mapped against known reference genomes by MetaPhlAn to compare with Blank Extraction and Libraries.

(XLSX)

S6 Table. A RMA result file produced by MALT for analysis in MEGAN6.
(XLSX)

S1 Appendix. Supplementary data on M&M and results.
(DOC)

S2 Appendix. Map Damage results for all samples.
(PDF)

Acknowledgments

We thank Patrice Gerard for his help with graphical technical support, Andaine Seguin-Orlando for sequencing on MiniSeq Illumina and Catherine Mollereau for helping with GraphPad Prism 7 software.

Author Contributions

Conceptualization: Rémi Esclassan, Catherine Thèves.

Data curation: Xavier Mata, Kristian Hanghoej.

Formal analysis: Xavier Mata, Kristian Hanghoej, Catherine Thèves.

Funding acquisition: Claire Willmann, Elodie Cabot, Pierre Chevet, Eric Crubézy, Rémi Esclassan, Catherine Thèves.

Investigation: Claire Willmann, Xavier Mata, Laure Tonasso, Lenka Tisseyre, Céline Jeziorski, Pierre Chevet, Eric Crubézy, Ludovic Orlando, Catherine Thèves.

Methodology: Claire Willmann, Xavier Mata, Kristian Hanghoej, Ludovic Orlando, Rémi Esclassan, Catherine Thèves.

Project administration: Rémi Esclassan, Catherine Thèves.

Resources: Claire Willmann, Xavier Mata, Laure Tonasso, Lenka Tisseyre, Céline Jeziorski, Elodie Cabot, Pierre Chevet, Eric Crubézy, Rémi Esclassan, Catherine Thèves.

Software: Xavier Mata, Kristian Hanghoej.

Supervision: Rémi Esclassan, Catherine Thèves.

Validation: Ludovic Orlando, Rémi Esclassan, Catherine Thèves.

Visualization: Claire Willmann, Xavier Mata.

Writing – original draft: Claire Willmann, Xavier Mata, Elodie Cabot, Pierre Chevet, Rémi Esclassan, Catherine Thèves.

Writing – review & editing: Claire Willmann, Xavier Mata, Ludovic Orlando, Rémi Esclassan, Catherine Thèves.

References

1. Rosier BT, De Jager M, Zaura E, Krom BP. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4:92. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00092> PMID: 25077073
2. Petersen PE, Lennon MA. Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004; 32(5):319–21. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.2004.00175.x> PMID: 15341615

3. Bradshaw DJ, Marsh PD. Use of continuous flow techniques in modeling dental plaque biofilms. *Methods Enzymol.* 1999; 310:279–96. PMID: [10547800](#)
4. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003; 149(Pt 2):279–94. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26082-0> PMID: [12624191](#)
5. Marsh PD. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Dis.* 2003; 9 Suppl 1:16–22.
6. Touger-Decker R, van Loveren C. Sugars and dental caries. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78(4):881s–92s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.4.881S> PMID: [14522753](#)
7. Lee LW, Lee YL, Hsiao SH, Lin HP. Bacteria in the apical root canals of teeth with apical periodontitis. *J Formos Med Assoc.* 2016.
8. Murphy EC, Frick IM. Gram-positive anaerobic cocci—commensals and opportunistic pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2013; 37(4):520–53. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12005> PMID: [23030831](#)
9. Rocas IN, Siqueira JF Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(5):1721–4. <https://doi.org/10.1128/JCM.00531-12> PMID: [22403423](#)
10. Narita M, Shibahara T, Takano N, Fujii R, Okuda K, Ishihara K. Antimicrobial Susceptibility of Microorganisms Isolated from Periapical Periodontitis Lesions. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2016; 57(3):133–42. <https://doi.org/10.2209/tdcppublication.2015-0018> PMID: [27665691](#)
11. Hildebolt C, Molnar S. Measurement and description of periodontal disease in anthropological studies. In: Kelley M, Larsen C, editors. *Advances in dental anthropology.* New York: Wiley-Liss; 1991. p. 225–40.
12. Kerr N. A method of assessing periodontal status in archaeologically derived skeletal material. *Journal of paleopathology.* 1988.
13. Wasterlain SN, Cunha E, Hillson S. Periodontal disease in a Portuguese identified skeletal sample from the late nineteenth and early twentieth centuries. *Am J Phys Anthropol.* 2011; 145(1):30–42. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21464> PMID: [21484759](#)
14. Mullany P, Hunter S, Allan E. Metagenomics of dental biofilms. *Adv Appl Microbiol.* 2008; 64:125–36. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00404-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00404-8) PMID: [18485283](#)
15. Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Res.* 2013; 47(2):89–102. <https://doi.org/10.1159/000345367> PMID: [23207320](#)
16. Adler CJ, Dobney K, Weyrich LS, Kaidonis J, Walker AW, Haak W, et al. Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nat Genet.* 2013; 45(4):450–5e1. <https://doi.org/10.1038/ng.2536> PMID: [23416520](#)
17. Warinner C, Hendy J, Speller C, Cappellini E, Fischer R, Trachsel C, et al. Direct evidence of milk consumption from ancient human dental calculus. *Sci Rep.* 2014; 4:7104. <https://doi.org/10.1038/srep07104> PMID: [25429530](#)
18. Ziesemer KA, Mann AE, Sankaranarayanan K, Schroeder H, Ozga AT, Brandt BW, et al. Intrinsic challenges in ancient microbiome reconstruction using 16S rRNA gene amplification. *Sci Rep.* 2015; 5:16498. <https://doi.org/10.1038/srep16498> PMID: [26563586](#)
19. Weyrich LS, Dobney K, Cooper A. Ancient DNA analysis of dental calculus. *J Hum Evol.* 2015; 79:119–24. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2014.06.018> PMID: [25476244](#)
20. Adler CJ, Dobney K, Weyrich LS, Kaidonis J, Walker AW, Haak W, et al. Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nat Genet.* 2013; 45(4):450–5, 5e1. <https://doi.org/10.1038/ng.2536> PMID: [23416520](#)
21. Warinner C, Rodrigues JF, Vyas R, Trachsel C, Shved N, Grossmann J, et al. Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity. *Nat Genet.* 2014; 46(4):336–44. <https://doi.org/10.1038/ng.2906> PMID: [24562188](#)
22. Warinner C, Speller C, Collins MJ. A new era in palaeomicrobiology: prospects for ancient dental calculus as a long-term record of the human oral microbiome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015; 370(1660):20130376. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0376> PMID: [25487328](#)
23. Metcalf JL, Ursell LK, Knight R. Ancient human oral plaque preserves a wealth of biological data. *Nat Genet.* 2014; 46(4):321–3. <https://doi.org/10.1038/ng.2930> PMID: [24675519](#)
24. Cabot E, Chevet P, Duchesne S. La bataille du Mans, apports archéologiques à l'étude des guerres de Vendée, 10–13 décembre 1793. *Anthropo.* 2012; 27:15–22.
25. Cabot E, Chevet P. Volume 2, tome 1. La bataille du Mans des 12–14 décembre 1793: la mémoire du sol. Rapport d'opération, Fouilles archéologiques. INRAP; 2015.
26. Martin J-C. La Vendée et la Révolution. Perrin ed. Tempus C, editor. Paris 2007. 283 p.
27. Theves C, Cabot E, Bouakaze C, Chevet P, Crubezy E, Balaesque P. About 42% of 154 remains from the "Battle of Le Mans", France (1793) belong to women and children: Morphological and genetic

- evidence. *Forensic Sci Int*. 2016; 262:30–6. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.02.029> PMID: 26968017
28. Simon-Soro A, Tomas I, Cabrera-Rubio R, Catalan MD, Nyvad B, Mira A. Microbial geography of the oral cavity. *J Dent Res*. 2013; 92(7):616–21. <https://doi.org/10.1177/0022034513488119> PMID: 23674263
 29. Gilbert MT, Bandelt HJ, Hofreiter M, Barnes I. Assessing ancient DNA studies. *Trends Ecol Evol*. 2005; 20(10):541–4. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.07.005> PMID: 16701432
 30. Willerslev E, Cooper A. Ancient DNA. *Proc Biol Sci*. 2005; 272(1558):3–16. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2813> PMID: 15875564
 31. Cabot E, Chevet P. Volume 2, tome 2. La bataille du Mans des 12–14 décembre 1793: la mémoire du sol. Texte. INRAP; 2015.
 32. Bibaut M. Le massacre du Mans du 13 décembre 1793. Etude anthropologique et dentaire d'une population.: Paris Descartes; 2013.
 33. Nebenhaus M. Etude anthropologique et dentaire de deux chamiers datant de la guerre de Vendée, 1793. 2011.
 34. International statistical classification of diseases and related healthproblem. 10th Revision. [Internet]. 2016. <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#/K00-K14>.
 35. Keyser-Tracqui C, Ludes B. Methods for the study of ancient DNA. *Methods Mol Biol*. 2005; 297:253–64. PMID: 15570113
 36. Hillson S. Recording dental caries in archaeological human remains. *International Journal of Osteoarchaeology*. 2001; 11(4):249–89.
 37. Roberts C, Manchester K. The archaeology of disease. The History Press ed 2010.
 38. Dias GJ, Prasad K, Santos AL. Pathogenesis of apical periodontal cysts: guidelines for diagnosis in palaeopathology. *International Journal of Osteoarchaeology*. 2007; 17(6):619–26.
 39. Oliveira RE, Neves WA. Oral health in prehistoric San Pedro de Atacama oases, Northern Chile. *Homo*. 2015; 66(6):492–507. <https://doi.org/10.1016/j.jchb.2015.05.001> PMID: 26253130
 40. Araujo JP, Lemos CA, Miniello TG, Alves FA. The relevance of clinical and radiographic features of jaw lesions: A prospective study. *Braz Oral Res*. 2016; 30(1):e96. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0096> PMID: 27556683
 41. Damgaard PB, Margaryan A, Schroeder H, Orlando L, Willerslev E, Allentoft ME. Improving access to endogenous DNA in ancient bones and teeth. *Sci Rep*. 2015; 5:11184. <https://doi.org/10.1038/srep11184> PMID: 26081994
 42. Meyer M, Kircher M. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harb Protoc*. 2010; 2010(6):pdb.prot5448.
 43. Seguin-Orlando A, Schubert M, Clary J, Stagegaard J, Alberdi MT, Prado JL, et al. Ligation bias in illumina next-generation DNA libraries: implications for sequencing ancient genomes. *PLoS One*. 2013; 8(10):e78575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078575> PMID: 24205269
 44. Warinner C, Herbig A, Mann A, Fellows Yates JA, Weiss CL, Burbano HA, et al. A Robust Framework for Microbial Archaeology. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2017; 18:321–56. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091416-035526> PMID: 28460196
 45. Jonsson H, Ginolhac A, Schubert M, Johnson PL, Orlando L. mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics*. 2013; 29(13):1682–4. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt193> PMID: 23613487
 46. Schubert M, Ermini L, Der Sarkissian C, Jonsson H, Ginolhac A, Schaefer R, et al. Characterization of ancient and modern genomes by SNP detection and phylogenomic and metagenomic analysis using PALEOMIX. *Nat Protoc*. 2014; 9(5):1056–82. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.063> PMID: 24722405
 47. Herbig A, Maixner F, Bos K, Zink A, Krause J, Huson D. MALT: fast alignment and analysis of metagenomic DNA sequence data applied to the Tyrolean Iceman. *BioRxiv*: 050559. 2016.
 48. Shimada E, Kataoka H, Miyazawa Y, Yamamoto M, Igarashi T. Lipoproteins of *Actinomyces viscosus* induce inflammatory responses through TLR2 in human gingival epithelial cells and macrophages. *Microbes Infect*. 2012; 14(11):916–21. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.04.015> PMID: 22561467
 49. Kakuta R, Hidaka H, Yano H, Okamoto M, Ozawa D, Endo S, et al. First report of severe acute otitis media caused by *Campylobacter rectus* and review of the literature. *J Infect Chemother*. 2016.
 50. Goker M, Held B, Lucas S, Nolan M, Yasawong M, Glavina Del Rio T, et al. Complete genome sequence of *Olsenella uli* type strain (VPI D76D-27C). *Stand Genomic Sci*. 2010; 3(1):76–84. <https://doi.org/10.4056/sigs.1082860> PMID: 21304694

51. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, et al. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res*. 2014; 2014:476068. <https://doi.org/10.1155/2014/476068> PMID: 24741603
52. Siqueira JF Jr., Rocas IN. *Pseudoramibacter alactolyticus* in primary endodontic infections. *J Endod*. 2003; 29(11):735–8. <https://doi.org/10.1097/00004770-200311000-00012> PMID: 14651280
53. Uchibori S, Tsudukibashi O, Goto H, Kobayashi T, Aida M. A novel selective medium for the isolation and distribution of *Rothia dentocariosa* in oral cavities. *J Microbiol Methods*. 2012; 91(1):205–7. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.07.004> PMID: 22796060
54. Cheon K, Moser SA, Wiener HW, Whiddon J, Momeni SS, Ruby JD, et al. Characteristics of *Streptococcus mutans* genotypes and dental caries in children. *Eur J Oral Sci*. 2013; 121(3 Pt 1):148–55. <https://doi.org/10.1111/eos.12044> PMID: 23659236
55. Li M, Huang R, Zhou X, Zhang K, Zheng X, Gregory RL. Effect of nicotine on dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2014; 350(2):125–32. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12317> PMID: 24164376
56. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology* 2000. 2015; 38(1):72–122.
57. Warinner C, Speller C, Collins MJ, Lewis CM Jr. Ancient human microbiomes. *J Hum Evol*. 2015; 79:125–36. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2014.10.016> PMID: 25559298
58. Rocas IN, Lima KC, Assuncao IV, Gomes PN, Bracks IV, Siqueira JF Jr. Advanced Caries Microbiota in Teeth with Irreversible Pulpitis. *J Endod*. 2015; 41(9):1450–5. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.05.013> PMID: 26187422
59. Peterson SN, Snesrud E, Schork NJ, Bretz WA. Dental caries pathogenicity: a genomic and metagenomic perspective. *Int Dent J*. 2011; 61 Suppl 1:11–22.
60. Cornejo OE, Lefebure T, Bitar PD, Lang P, Richards VP, Eilertson K, et al. Evolutionary and population genomics of the cavity causing bacteria *Streptococcus mutans*. *Mol Biol Evol*. 2013; 30(4):881–93. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss278> PMID: 23228887
61. Paik S, Senty L, Das S, Noe JC, Munro CL, Kitten T. Identification of virulence determinants for endocarditis in *Streptococcus sanguinis* by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun*. 2005; 73(9):6064–74. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.6064-6074.2005> PMID: 16113327
62. von Graevenitz A. *Rothia dentocariosa*: taxonomy and differential diagnosis. *Clin Microbiol Infect*. 2004; 10(5):399–402. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00784.x> PMID: 15113315
63. Onishi M. Study on *Actinomyces* isolated from the deeper layers of carious dentin. *Shikagaku Zasshi*. 1949; 6:273–318.
64. Kataoka H, Taniguchi M, Fukamachi H, Arimoto T, Morisaki H, Kuwata H. *Rothia dentocariosa* induces TNF- α production in a TLR2-dependent manner. *Pathog Dis*. 2014; 71(1):65–8. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12115> PMID: 24265267
65. Yeung DF, Parsa A, Wong JC, Chatur N, Salh B. A case of *Rothia dentocariosa* bacteremia in a patient receiving infliximab for ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 109. United States 2014. p. 297–8. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.366> PMID: 24496430
66. Fridman D, Chaudhry A, Makaryus J, Black K, Makaryus AN. *Rothia dentocariosa* Endocarditis: An Especially Rare Case in a Previously Healthy Man. *Tex Heart Inst J*. 2016; 43(3):255–7. <https://doi.org/10.14503/THIJ-15-5068> PMID: 27303245
67. Pasciak M, Ekiel I, Grzegorzewicz A, Mordarska H, Gamian A. Structure of the major glycolipid from *Rothia dentocariosa*. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1594(1):199–205. PMID: 11825622
68. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2005; 38:72–122. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x> PMID: 15853938
69. Friedrich V, Gruber C, Nimeth I, Pabinger S, Sekot G, Posch G, et al. Outer membrane vesicles of *Tannerella forsythia*: biogenesis, composition, and virulence. *Mol Oral Microbiol*. 2015; 30(6):451–73. <https://doi.org/10.1111/omi.12104> PMID: 25953484
70. Kesavalu L, Sathishkumar S, Bakthavatchalu V, Matthews C, Dawson D, Steffen M, et al. Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. *Infect Immun*. 2007; 75(4):1704–12. <https://doi.org/10.1128/IAI.00733-06> PMID: 17210663
71. Dashper SG, Seers CA, Tan KH, Reynolds EC. Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. *J Dent Res*. 2011; 90(6):691–703. <https://doi.org/10.1177/0022034510385242> PMID: 20940357
72. Robertson D, Smith AJ. The microbiology of the acute dental abscess. *J Med Microbiol*. 2009; 58(Pt 2):155–62. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.003517-0> PMID: 19141730

73. Brundin M, Figdor D, Sundqvist G, Sjogren U. Starvation response and growth in serum of *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Prevotella intermedia*, and *Pseudoramibacter alactolyticus*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 108(1):129–34. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.03.018> PMID: 19540450
74. Nobrega LM, Montagner F, Ribeiro AC, Mayer MA, Gomes BP. Molecular Identification of Cultivable Bacteria From Infected Root Canals Associated With Acute Apical Abscess. *Braz Dent J*. 2016; 27(3):318–24. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600715> PMID: 27224567
75. Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(11):3599–606. <https://doi.org/10.1128/JCM.00431-08> PMID: 18768651
76. Uemura H, Hayakawa K, Shimada K, Tojo M, Nagamatsu M, Miyoshi-Akiyama T, et al. *Parvimonas micra* as a causative organism of spondylodiscitis: a report of two cases and a literature review. *Int J Infect Dis*. 2014; 23:53–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.02.007> PMID: 24680818
77. Gomez CA, Gerber DA, Zambrano E, Banaei N, Deresinski S, Blackburn BG. First case of infectious endocarditis caused by *Parvimonas micra*. *Anaerobe*. 2015; 36:53–5. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.10.007> PMID: 26485192
78. Gomes GB, Sarkis-Onofre R, Bonow ML, Etges A, Jacinto RC. An investigation of the presence of specific anaerobic species in necrotic primary teeth. *Braz Oral Res*. 2013; 27(2):149–55. PMID: 23538426
79. Weyrich LS, Duchene S, Soubrier J, Arriola L, Llamas B, Breen J, et al. Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus. *Nature*. 2017; 544(7650):357–61. <https://doi.org/10.1038/nature21674> PMID: 28273061
80. Vágene AJ, Campana MG, García NR, Huson D, Tuross N, Herbig A, et al., editors. Searching for pathogens in the earliest known colonial epidemic burial in Mexico, Teposcolula Yucundaa. The 86th Annual Meeting of the American Association of Physical Anthropologists, New Orleans; 2017.
81. Kerr NW. The prevalence and natural history of periodontal disease in Britain from prehistoric to modern times. *Br Dent J*. 1998; 185(10):527–35. PMID: 9874885
82. Garant PR. Lessons to be learned from Pierre Fauchard. *J Am Coll Dent*. 1990; 57(3):32–6. PMID: 2254534
83. David C. Hygiène bucco-dentaire du XVIIe au XIXe siècle en France. L'Harmattan ed2010. 87 p.
84. Müller A, Hussein K. Meta-analysis of teeth from European populations before and after the 18th century reveals a shift towards increased prevalence of caries and tooth loss. *Arch Oral Biol*. 2017; 73:7–15. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.08.018> PMID: 27816793

Valorisation scientifique

Ce travail a bénéficié d'un soutien financier attribué en 2015 par l'Institut Français pour la Recherche Odontologique (IFRO).

- Communications scientifiques orales:

- Congrès de l'Association Dentaire de France (ADF), Paris 2015 et 2016.

- Congrès du Groupement des Anthropologistes de la Langue Française (GALF), Toulouse 2016.

- Communications scientifiques écrites:

- Journée Toulousaine des jeunes Chercheurs en Odontologie (JTCO), Toulouse 2014.

- Rassemblement du Collège National des Enseignants en Prothèse Odontologique (CNEPO) 2015, Clermont-Ferrand.

- International Symposium on Dental Morphology & congress of International Association for Paleodontology, Bordeaux 2017 (**figure 50**).

Focus on the oral health status of six individuals from a rural population in western France 18th century: macroscopy and metagenomics

C. Willmann^{1,2*}, X. Mata^{1*}, L. Tonasso¹, L. Tisseyre¹, C. Jeziorski^{3,6}, E. Cabot^{4,5}, P. Chevet⁴, E. Crubézy¹, R. Esclassan^{1,2*} and C. Thèves^{1*}



¹Laboratoire AMIS, UMR 5288, Université de Toulouse/CNRS, 37 allées Jules Guesde, 31073 Toulouse, France.
²Service Odontologie de l'Hôtel Dieu, 4 rue Viguier 31002 Toulouse, France.
³GeT-PlaGe, Genotoul, INRA Auzville, Castanet-Tolosan, France.
⁴Institut National de Recherches en Technologie Préventive, INRP Grand Ouest, 37 rue de Rippon, 35577 Cesson-Sévigné, France.
⁵Anthropologie Bio-Culturelle, Droit, Ethique et Santé, Faculté de Médecine Site Nord (UMR 7268), 51 Boulevard Pierre Dramard, 13 344 Marseille Cedex 15, France.
⁶INRA, UMR 1209 Département de génétique animale, INRA Auzville, Castanet-Tolosan, France/GeT
 *Contributed equally



Oral biofilms are associated with the most common oral pathologies: caries, periapical and periodontal diseases¹. Recently, metagenomic sequencing provided a new tool to access the genetic information of a whole microbial community directly via its total DNA content².

In 2009-2010, in Le Mans (western France) archaeological graves were discovered and identified as a mass burial after the "Battle of Le Mans", which took place between the "Catholic and Royal Army" and the "Republican Army" and was precisely dated at 12th-13th December 1793³.

The aims of the present study were 1) **to test the composition in pathogenic bacteria of the oral flora on healthy teeth** from six subjects belonging to the "Catholic and Royal army" with a metagenomic method, 2) **to identify some characteristic dental pathogenic bacteria** responsible for carious, periapical or periodontal diseases and 3) **to test the possibility to determine the composition of the oral microbiome** from a healthy tooth belonging to an archeological subject.



Fig 1 : Site archéologique (chamiers 8 et 9), mis au jour en 2009-2010. E. Cabot

Materials and Methods

1) Macroscopic analysis : infectious signs presents on teeth and jaws of six subjects were charted: dental caries, bone loss related to periodontal disease and osteolytic lesions associated with periapical abscesses or residual cysts.

2) Metagenomic analysis: six teeth were treated in a dedicated paleogenetic laboratory. The commensal and pathogenic microbial communities were sequenced by shotgun and data analysis was done via Metaphlan and mapping.



Fig 2 : perte osseuse parodontale. C. Willmann



Fig 3 : Carie proximale parodontale. C. Willmann

Results

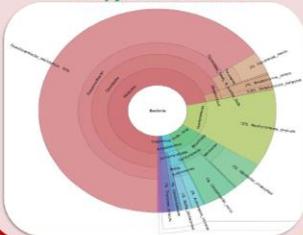
Among the six studied subjects, five were found with tooth decays, periodontal bone loss and periapical granuloma or cyst. The metagenomic analysis revealed the presence of numerous oral pathogens in fives ancient samples : ***Streptococcus mutans***, ***Streptococcus sanguinis*** and ***Rothia dentocariosa*** involved in carious disease; ***Porphyromonas gingivalis*** and ***Treponema denticola*** responsible for chronic periodontitis; ***Pseudoramibacter alactolyticus***, ***Olsenella uli*** and ***Parvimonas micra*** implicated in periapical pathologies.

Subject 213

The only tooth present on the maxillary arch showed a **periodontal bone loss**. A cortical deformation and an **infectious fistula** were observed on the right part of the horizontal mandibular branch.



Numerous reads were found for ***Pseudoramibacter alactolyticus***, ***Porphyromonas gingivalis*** and ***Campylobacter rectus***.

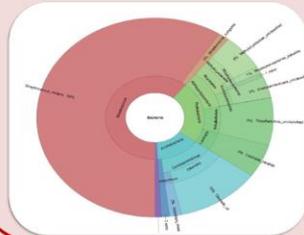


Subject 309

Tooth 14 was a retained root with a radiologically visible **periapical cyst** formation and a vestibular bone fenestration. **Dental decays** were observed on teeth 16; 17; 34 and 46.



Numerous reads were found for ***Streptococcus mutans*** and ***Olsenella uli***.

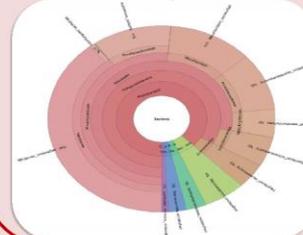


Subject 308

There were **no traces of tooth decays, periapical or periodontal disease** neither on teeth nor maxillary or mandibular bones.



No dental pathogens found.



Discussion and Conclusion

We have demonstrated that, by using a metagenomic approach and working from a single tooth, it is possible to open access to a part of the oral microbiome from a healthy tooth. We have shown that opportunistic pathogens carried in the human oral cavity were clearly associated with carious disease and also probably with periapical and periodontal troubles. Our results are in agreement with historical data : despite changes in the diet and lifestyle over the eighteenth century and an improvement in hygiene (compared to the medieval and Renaissance periods), the oral health of the French population in 1793 was commonly described as "poor" . Our new working approach may open a promising pathway in odontology research and a more precise overview of the oral health in ancient populations.

1. Rosier BT, De Jager M, Zaura E, Krom BP: Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? Front Cell Infect Microbiol. 2014;4:92
 2. Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. Caries Res. 2013;47(2):89-102.
 3. Cabot E, Chevet P. Volume 2, tome 1. La bataille de Mans des 12-14 décembre 1793 : la mémoire du sol. Texte. INRAP; 2015.

Figure 50 : Poster présenté lors de l'International Symposium on Dental Morphology & congress of International Association for Paleodontology, Bordeaux 2017.

Conclusion et perspectives

Dans ce travail, nous avons allié une approche de dentisterie clinique macroscopique et radiologique à une approche paléogénomique dans le but d'identifier moléculairement, chez une population du XVIII^e siècle de l'Ouest de la France, les sujets présentant des pathologies bucco-dentaires spécifiques : caries dentaires ; parodontopathie et LIPOE. Nous avons également souhaité caractériser la flore orale de ces sujets au niveau de sa composition taxonomique et nous nous sommes demandé s'il était possible, à partir d'une dent ne présentant pas de lésion macroscopique, de mettre en évidence des bactéries pathogènes orales impliquées dans les LIPOE, les caries et les parodontopathies.

Le matériel archéologique utilisé pour l'étude provenait de fosses sépulcrales découvertes dans la ville du Mans lors de fouilles préventives menées par l'INRAP en 2009-2010. Elles contenaient les squelettes de 154 individus ayant péri durant la Bataille du Mans, ayant eu lieu entre Armée catholique et royale et Armée républicaine, les 12 et 13 décembre 1793. L'Armée catholique et royale n'avait pas un recrutement classique : elle était composée d'hommes mais aussi de femmes, d'enfants et de vieillards, en majorité paysans, provenant de la « Vendée Militaire » et ayant déclaré la guerre à l'Etat français révolutionnaire. La diversité de recrutement de cette population donne un échantillon pouvant représenter un état de la santé bucco-dentaire dans une communauté paysanne du XVIII^e siècle de l'Ouest de la France, à l'aube de la révolution industrielle.

Pour six individus, sélectionnés en fonction des pathologies bucco-dentaires présentes sur les dents et mâchoires, une analyse macroscopique et radiologique complète a été faite puis une dent saine a été prélevée. Grâce à la technique de séquençage par shotgun, une majorité de molécules d'ADN bactérien présente dans ces échantillons dentaires a été amplifiée, séquencée puis analysée. Pour une plus grande précision dans l'assignation taxonomique, les séquences obtenues ont été alignées aux génomes de référence de 11 bactéries pathogènes bucco-dentaires.

Nous avons mis en évidence des pathogènes bucco-dentaires opportunistes à partir d'échantillons anciens et nous proposons ici une méthode permettant d'avoir accès au microbiome oral spécifique d'un individu ancien à partir d'une dent saine. Cette approche peut être utilisée pour donner une estimation de l'état de santé bucco-dentaire et caractériser les bactéries orales présentes chez un sujet archéologique quand une partie des dents ou des mâchoires est absente.

Au-delà d'une vision odontologique clinique classique, serait-il possible, de par nos choix de modes de vie futurs, d'influer sur la composition de notre microbiome oral? Les aliments cariogènes sont connus depuis longtemps, mais qu'en est-il des autres facteurs ayant un impact sur les bactéries orales? Les bains de bouche, l'exposition aux antibiotiques peuvent-ils avoir, à long terme, l'effet paradoxal de sélectionner les pathogènes les plus virulents chez les populations exposées? Un nombre croissant d'études évoque une association significative entre parodontite et survenue d'évènements cardio-vasculaires (246), aggravation de l'équilibre glycémique des patients diabétiques (247), polyarthrite rhumatoïde (248, 249) survenue d'accouchements prématurés (250-252). Dans un essai clinique randomisé, Tonetti et collègues ont mesuré la fonction endothéliale 6 mois après traitement parodontal chez 120 patients atteints de parodontite sévère (59 dans le groupe contrôle, 61 dans le groupe traitement). Ils ont observé une augmentation significative de la dilatation liée au flux sanguin dans l'artère brachiale, c'est-à-dire une amélioration de la fonction vasculaire chez les sujets traités (253). En 2014, Warinner et collègues ont reconstruit un génome ancien de *Tannerella forsythia* ayant infecté des sujets médiévaux et démontré l'absence de gènes de résistances aux tétracyclines, ce qui n'est pas le cas pour le génome de référence de la bactérie actuelle, ayant acquis cette résistance (25). Cela illustre les interactions et la coévolution entre humains et bactéries ainsi que l'adaptation de ces dernières aux changements de modes de vie, ou du moins de l'action humaine sur la santé, au cours de l'histoire de l'humanité.

Ces considérations nous obligent à revoir les liens et les interactions entre microbiome oral et état de santé général, tant d'un point de vue anthropologique que d'un point de vue clinique, afin de comprendre au mieux les pathologies du passé pour traiter les pathologies actuelles et se prémunir, du mieux possible, des pathologies futures.

Annexes

Analyse de l'authenticité des séquences d'ADN endogènes anciennes (humaines et bactériennes) des échantillons avec mapDamage.

Dépurination

Les diagrammes à points représentent la fréquence des bases A, T, C, G à l'intérieur et à l'extérieur du read, délimité par le rectangle gris. La partie gauche du rectangle délimite l'extrémité 5' et la partie droite l'extrémité 3'.

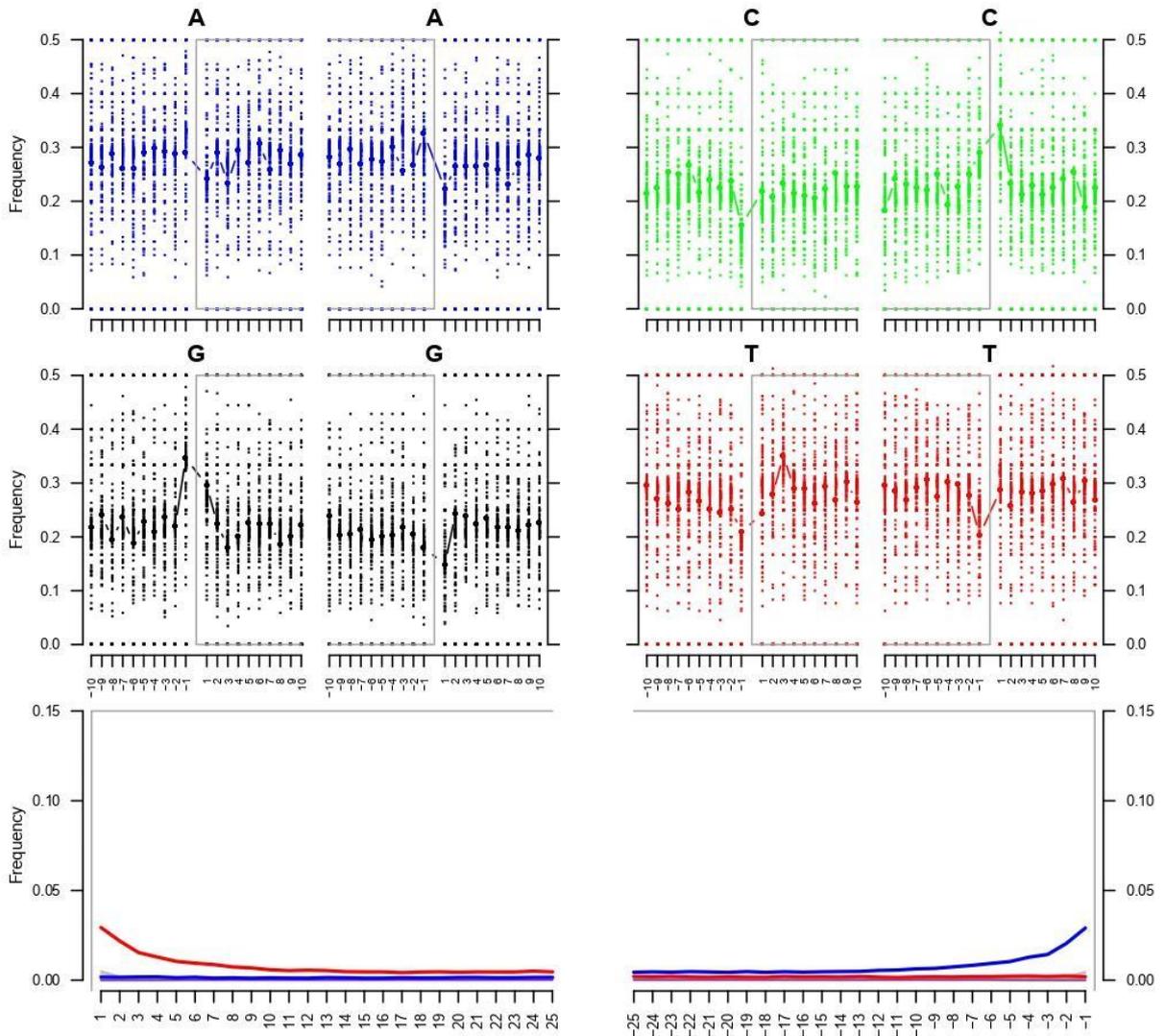
Les profils attendus pour des échantillons anciens sont un excès de A et G aux extrémités 3' (près des coupures de brins) et un excès de C et de T aux extrémités 5, ce qui est globalement respecté.

Désamination des cytosines

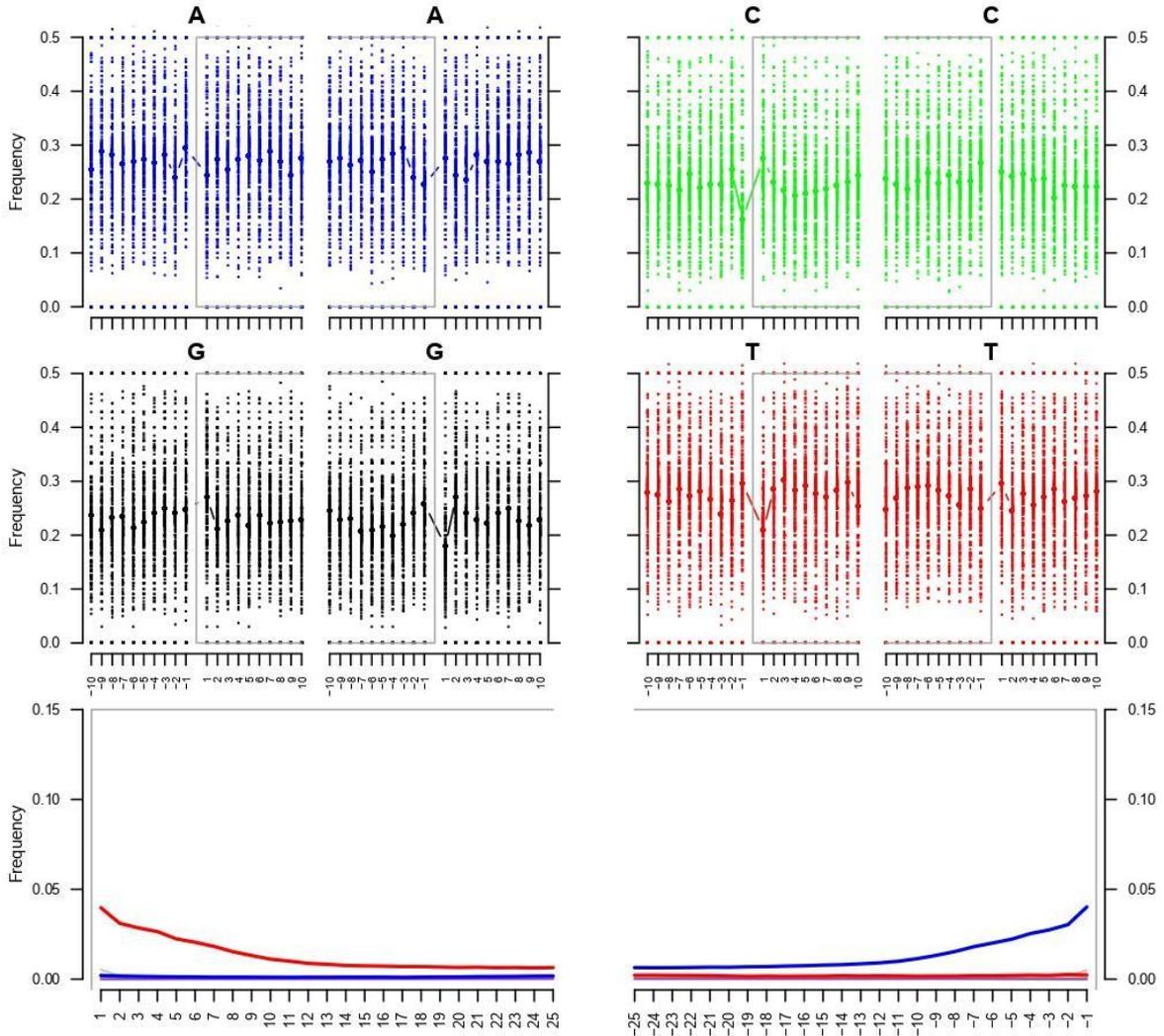
Les courbes représentent les transitions C>T (en rouge) et G>A en bleu présentes au niveau de l'extrémité 5' (à gauche) et 3' (à droite) sur les 25 nucléotides précédant l'extrémité des reads.

Pour certains échantillons, l'intensité du signal est faible. Cela peut être dû à un nombre de reads faibles ou au fait que les échantillons représentés soient relativement peu anciens de 200 ans (XVIII^e siècle).

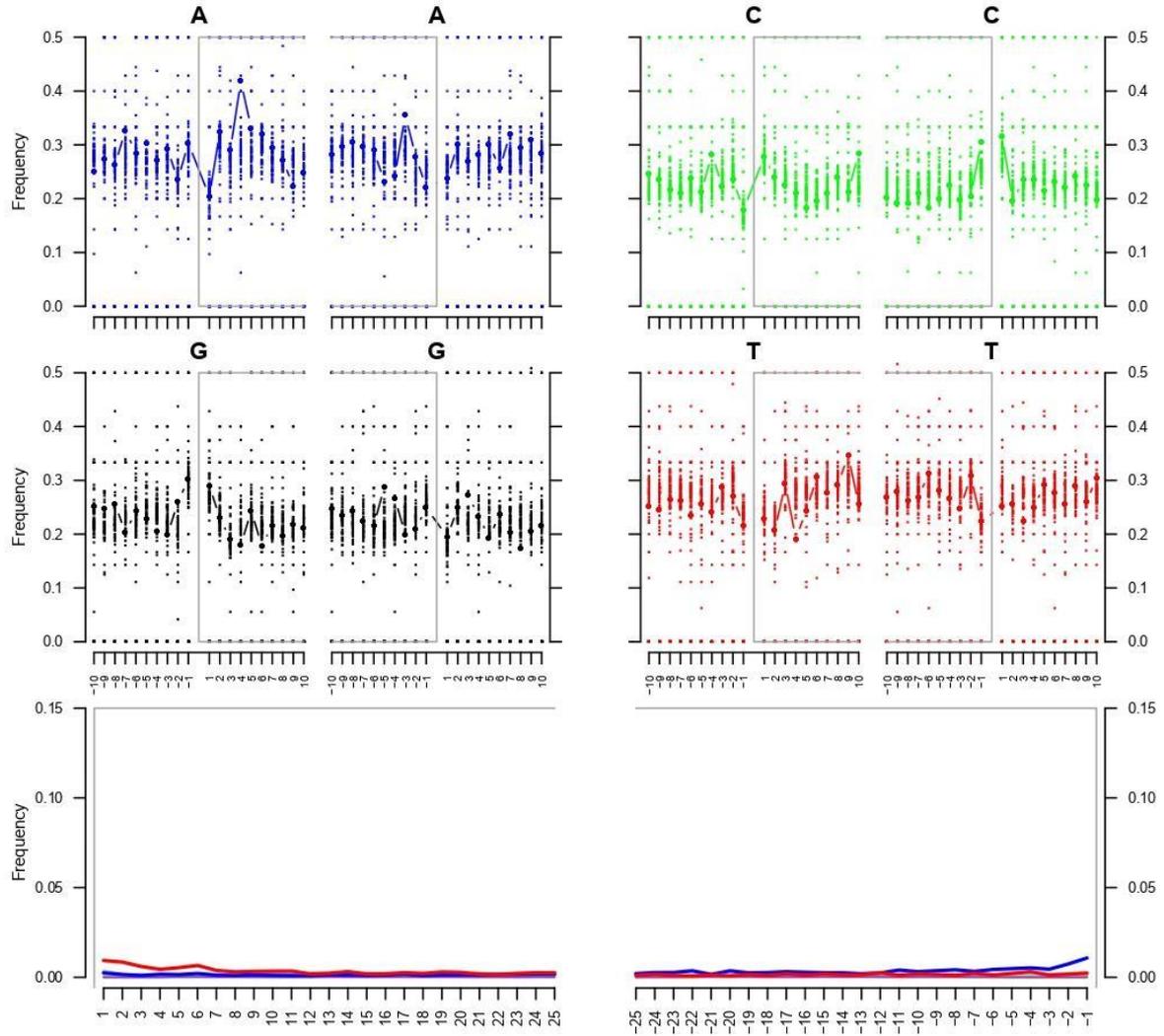
Sample213-hg19



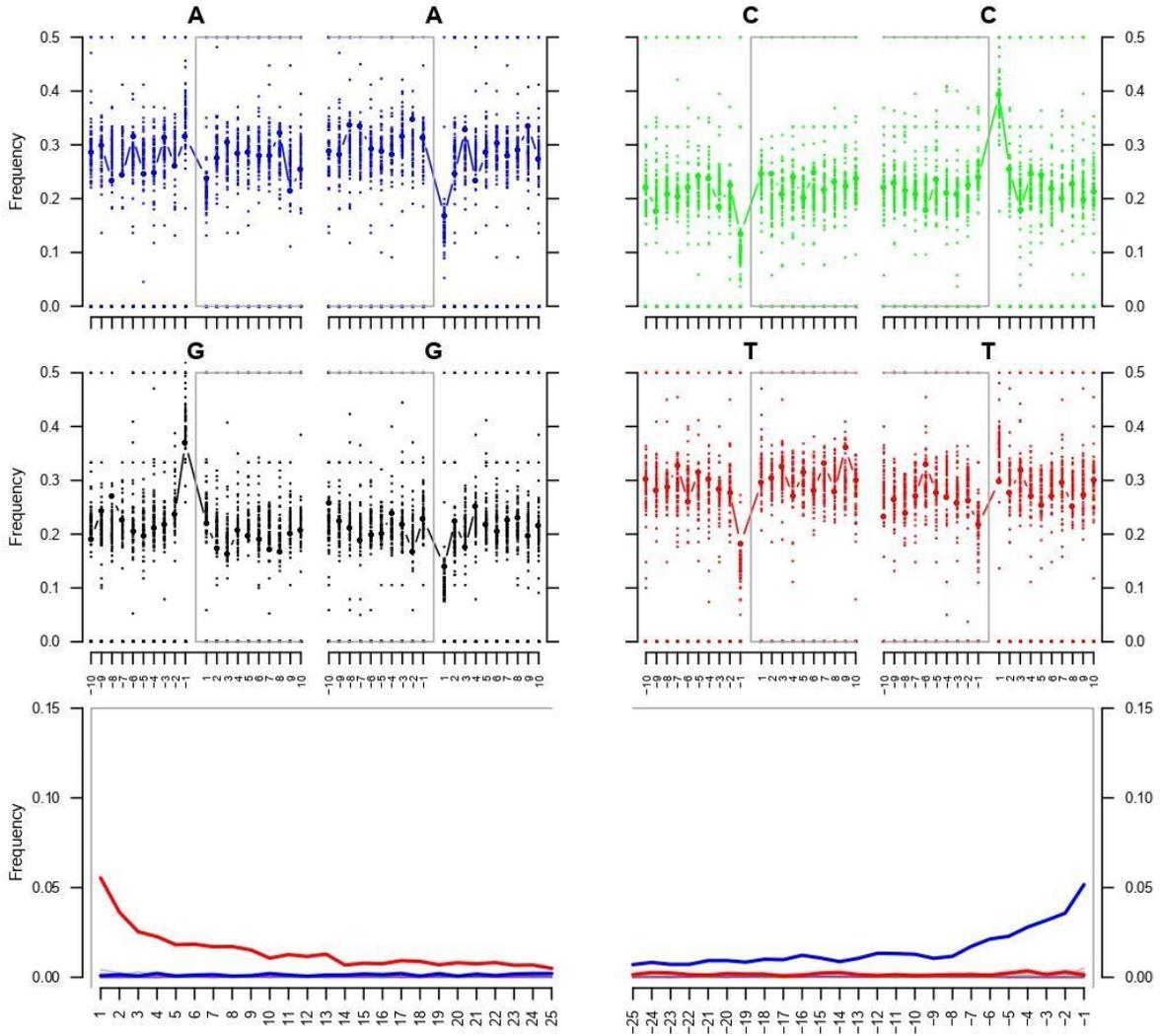
Sample306-hg19



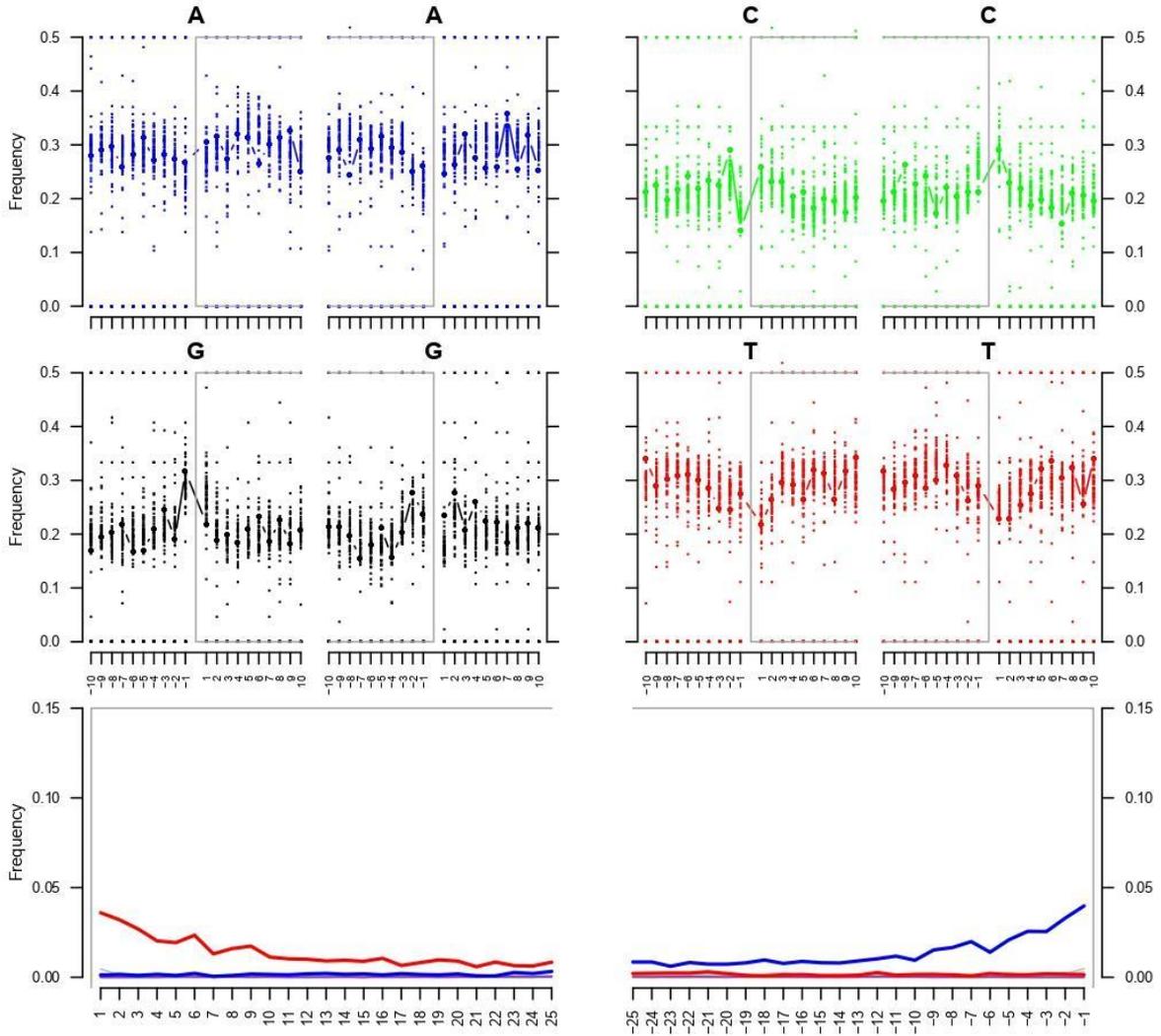
Sample307-hg19



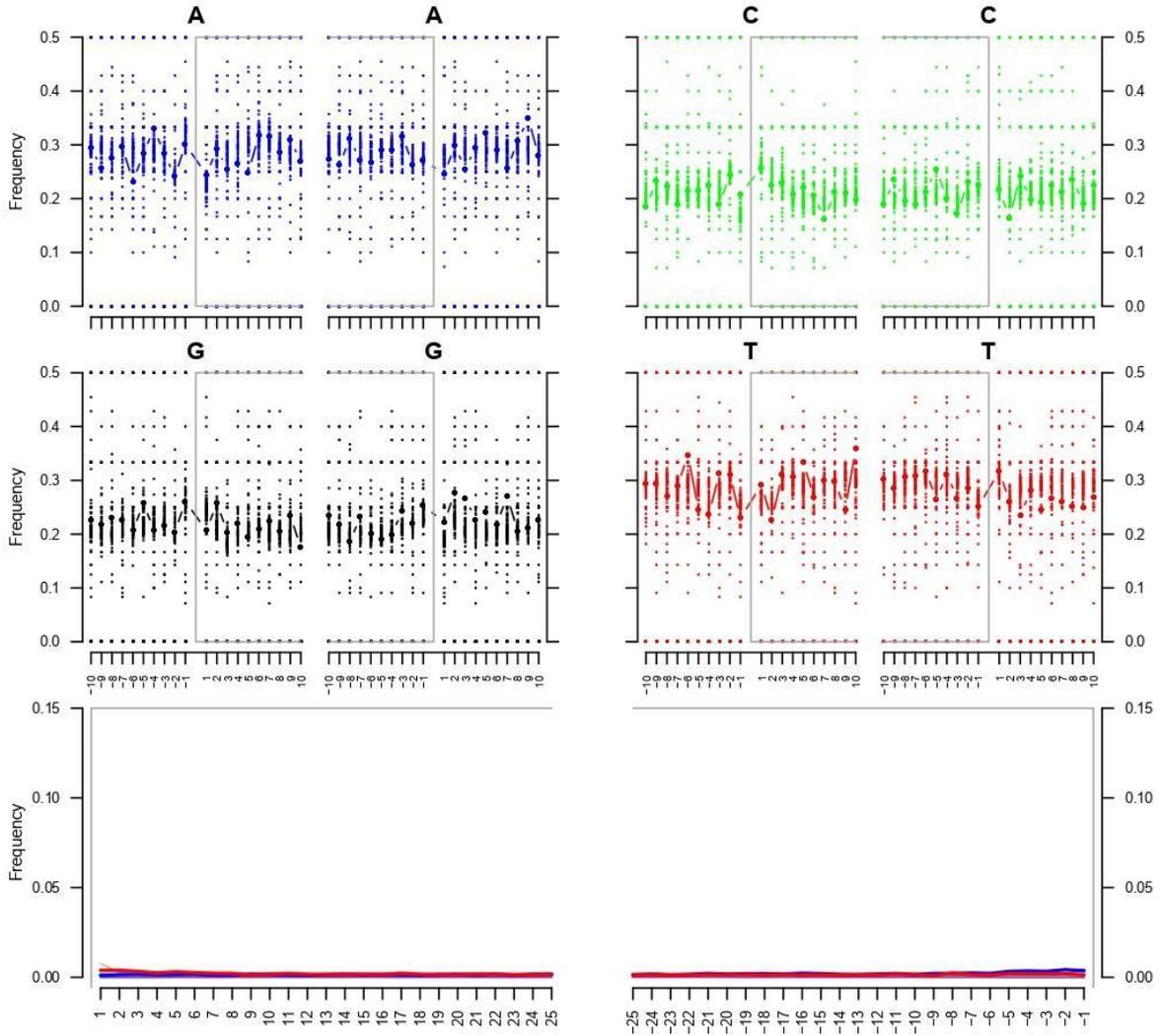
Sample308-hg19



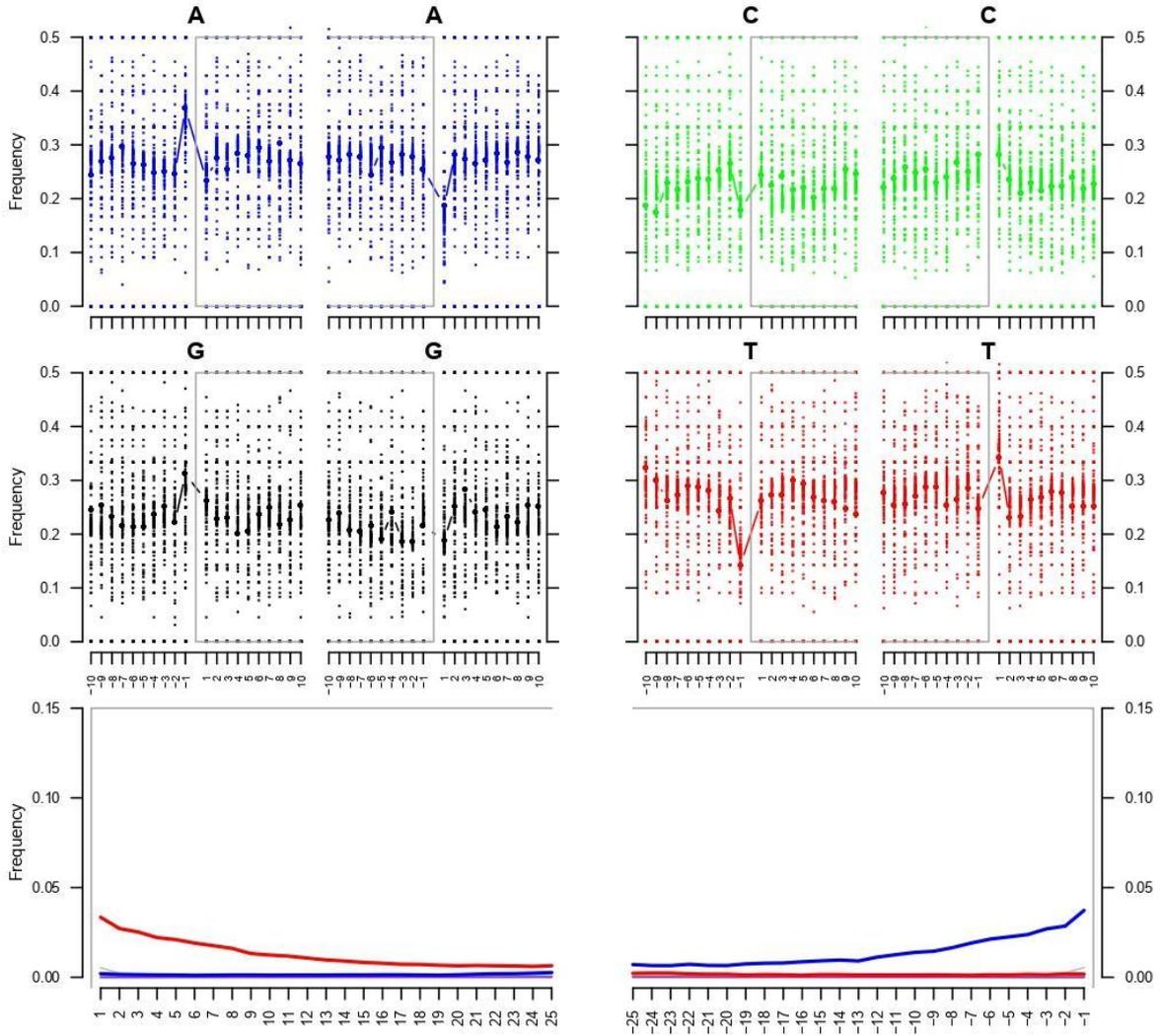
Sample309-hg19



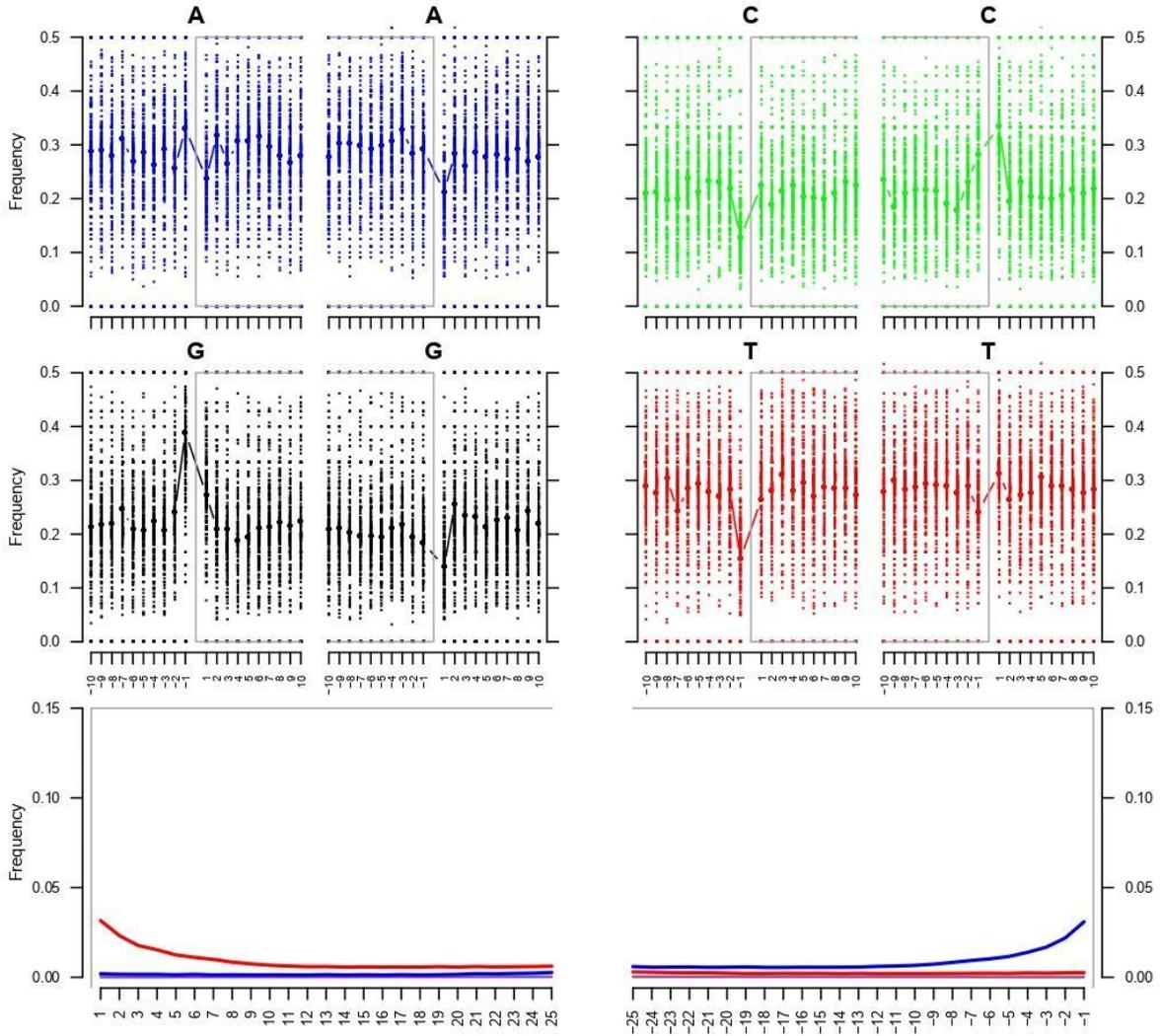
Sample312-hg19



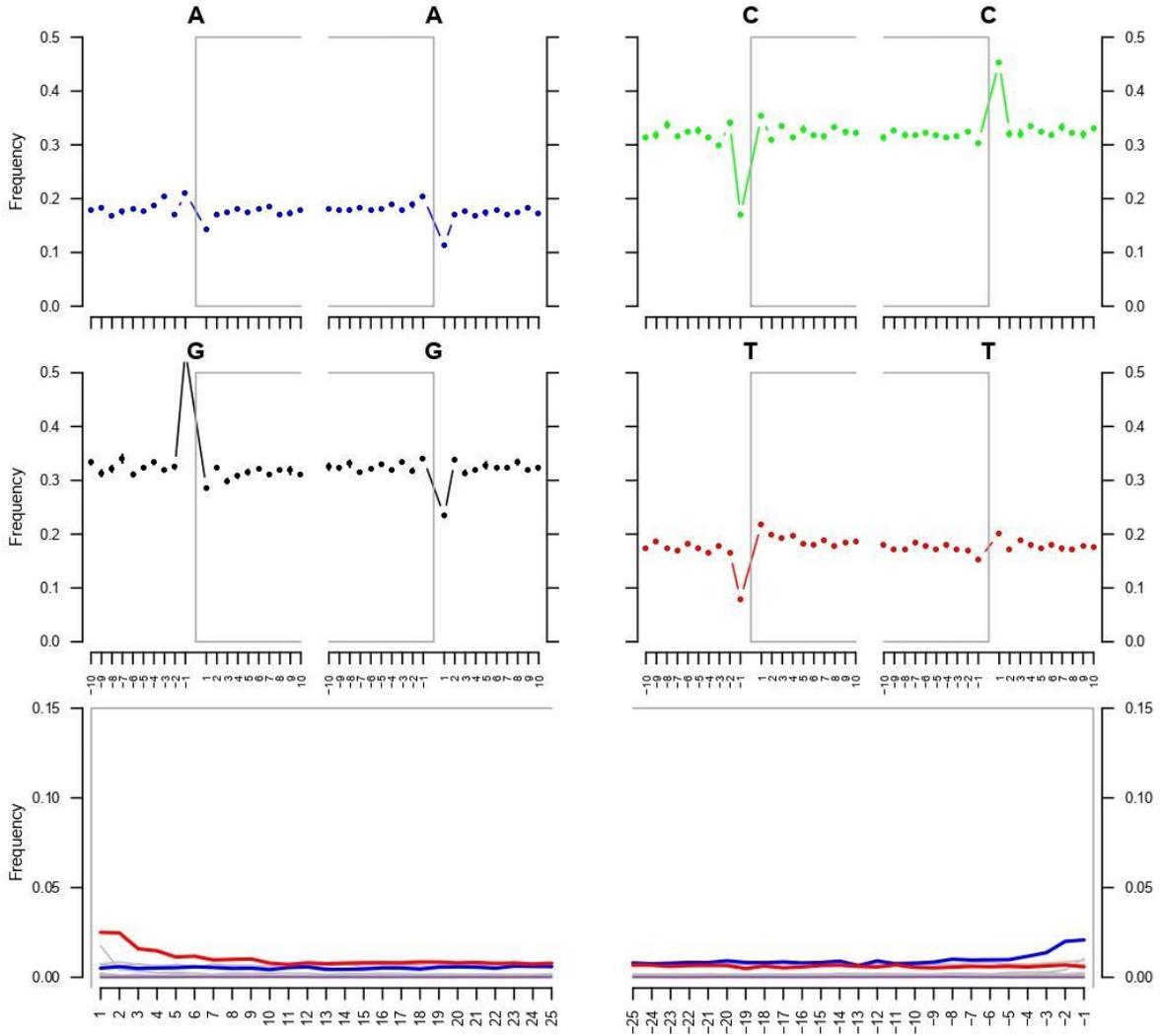
Sample403-hg19



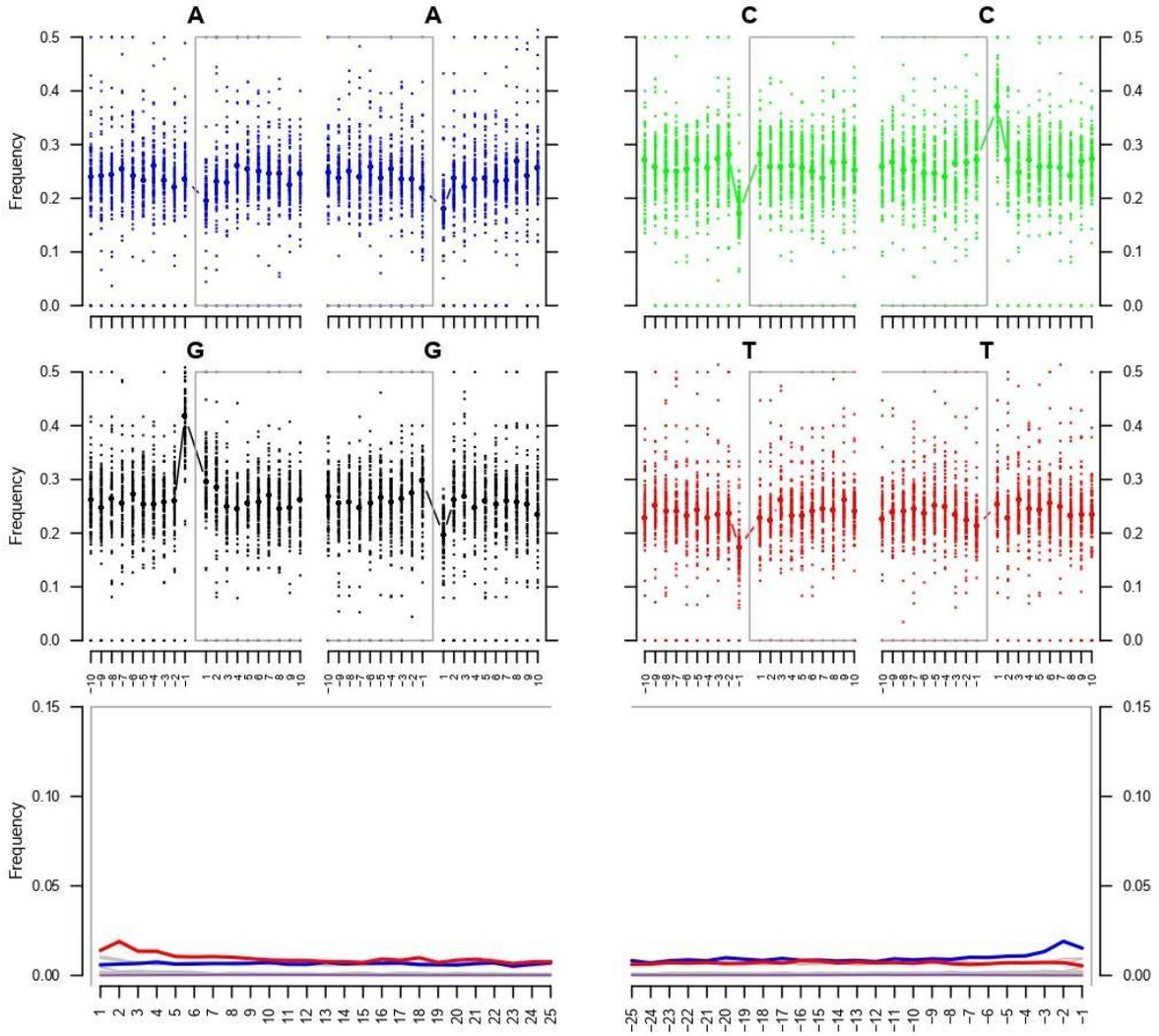
Sample406-hg19



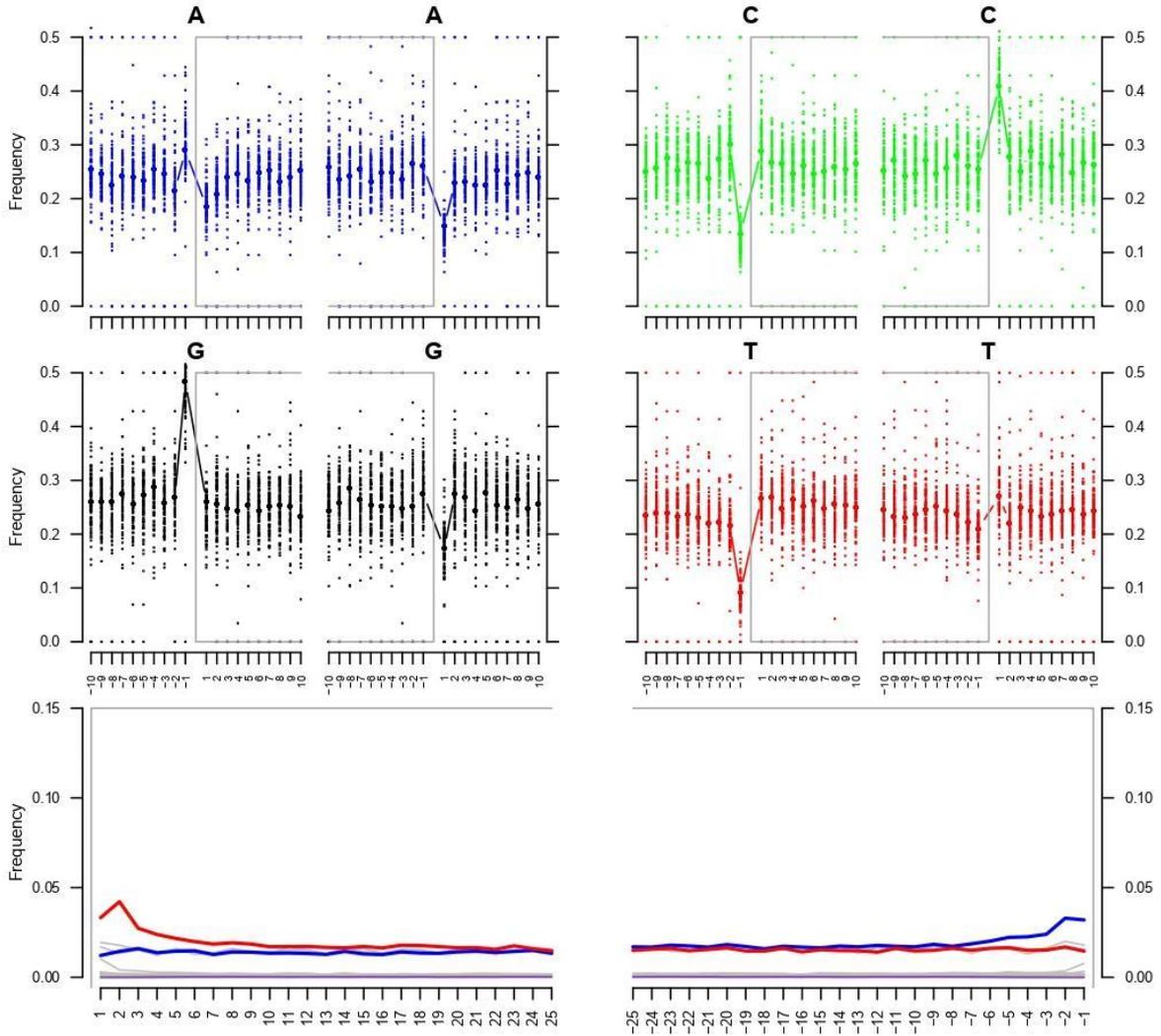
Sample306-Olsenella_uli



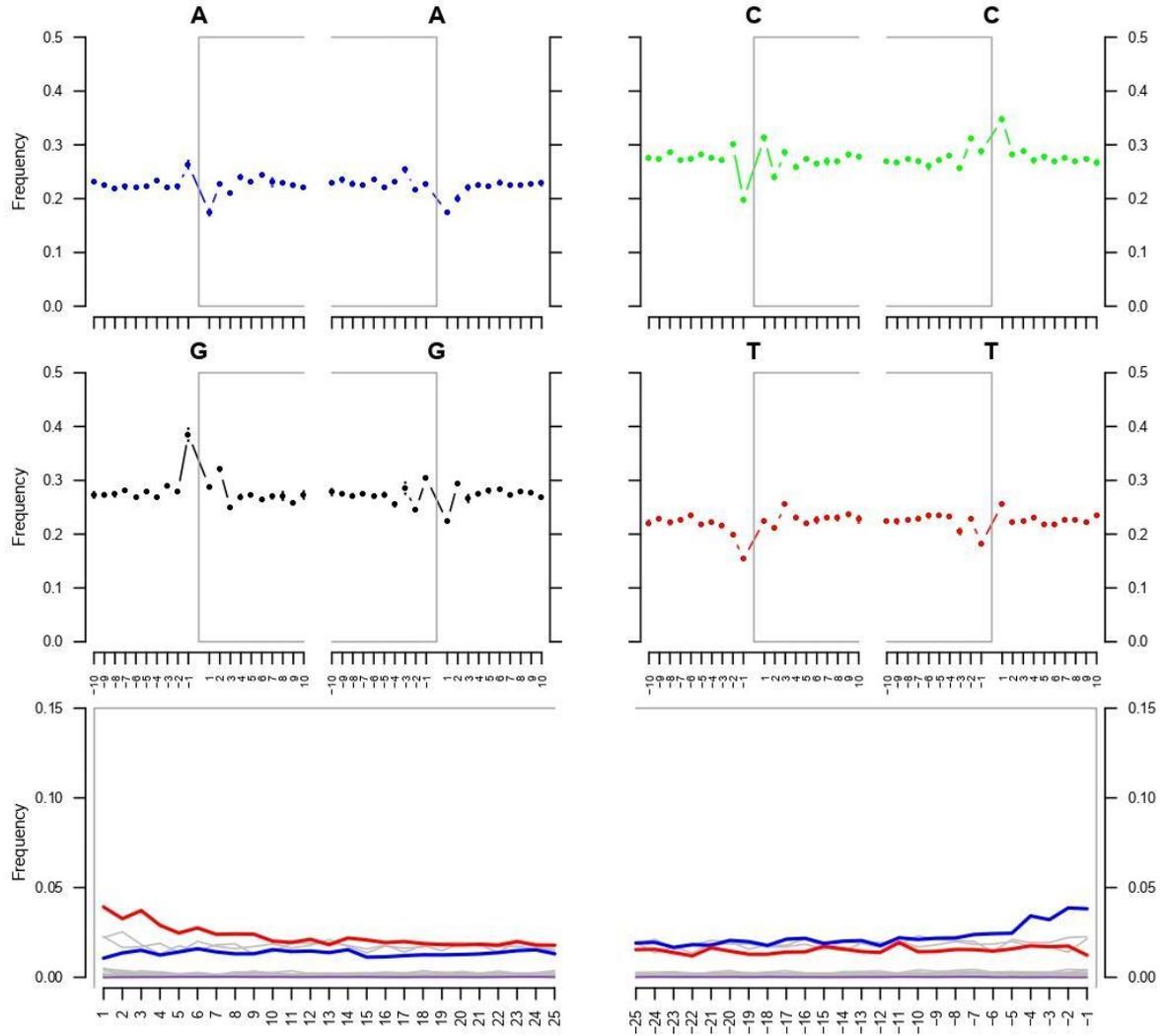
Sample213-Pseudoramibacter_alactolyticus



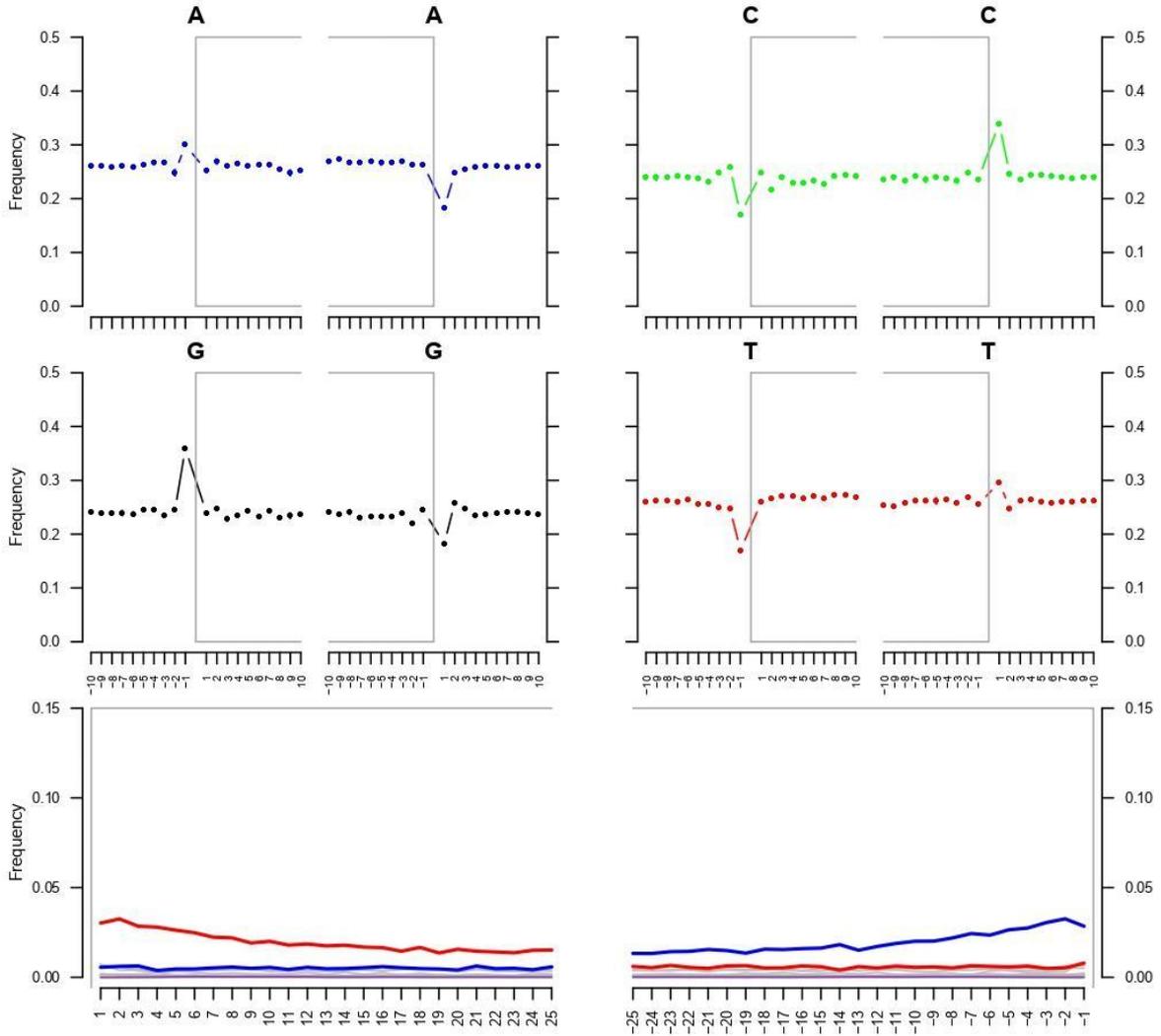
Sample306-Pseudoramibacter_alactolyticus



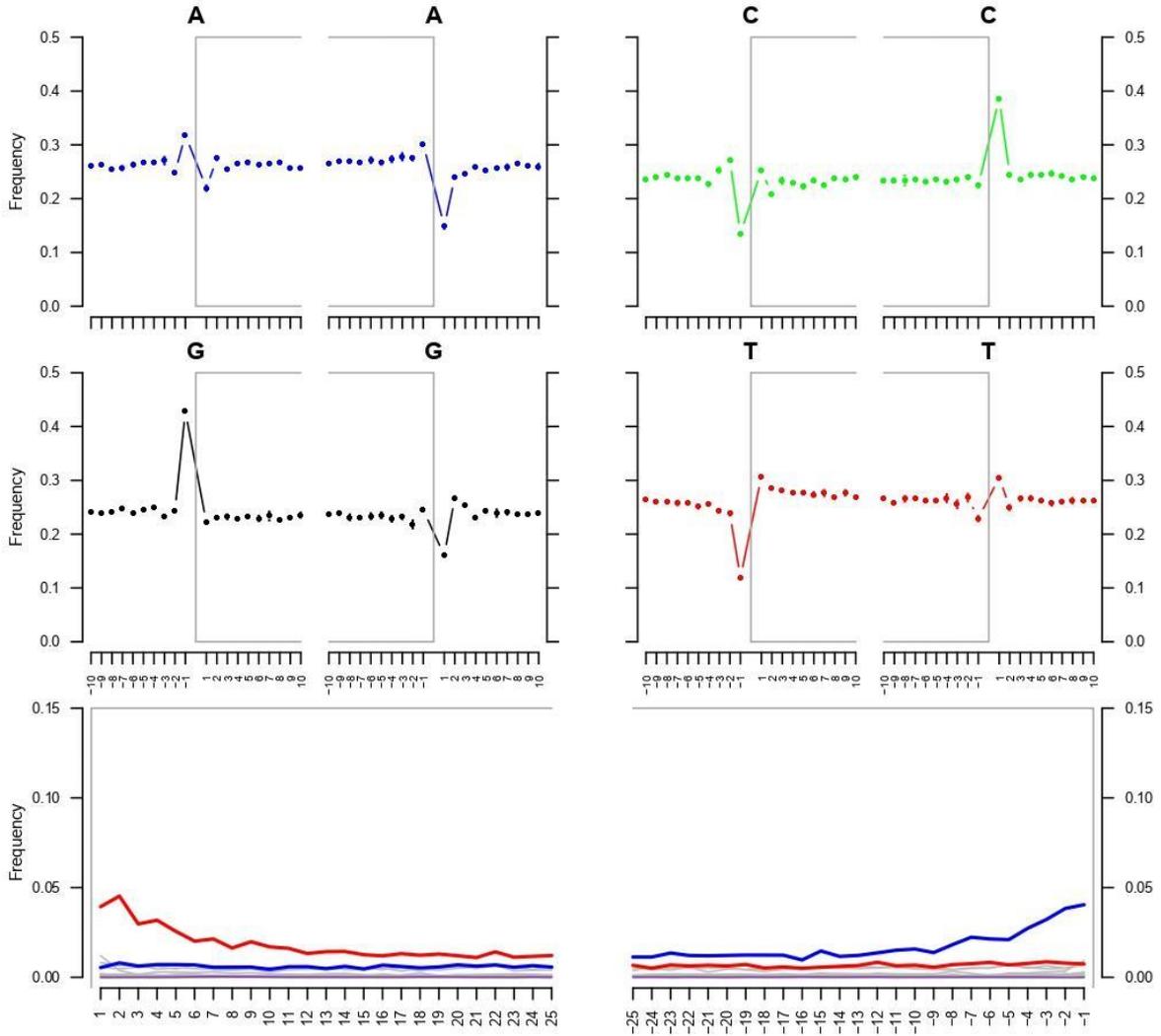
Sample406-Rothia_dentocariosa



Sample213-Tannerella_forsythia



Sample306-Tannerella_forsythia



Liste des génomes bactériens utilisés pour le mapping

Table S3: List of bacterial genomes used for mapping.

strain	Bacteria name	genome size (bp)	NCBI reference
C505	<i>Actinomyces viscosus</i>	3 126 396	ACRE02000001-86
RM3267	<i>Campylobacter rectus</i>	2 513 107	ACFU01000001-89
DSM7084	<i>Olsenella uli</i>	2 051 896	NC_014363
ATCC_33270	<i>Parvimonas micra</i>	1 703 772	ABEE0200001-17
W83	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	2 343 476	NC_002950
ATCC_23263	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	2 327 229	AEQN0100001-75
ATCC_17931	<i>Rothia dentocariosa</i>	2 506 025	NC_014643
UA159	<i>Streptococcus mutans</i>	2 032 925	NC_004350
SK36	<i>Streptococcus sanguinis</i>	2 388 435	NC_009009
92A2	<i>Tannerella forsythia</i>	3 405 521	NC_016610
ATCC_35405	<i>Trepanoma denticola</i>	2 843 201	NC_002967

Statistiques concernant l'alignement des reads issus des échantillons dentaires par rapport à 11 génomes bactériens de référence.

Table S4: Alignments statistics of reads mapped against dental pathogen genomes in teeth DNA extracts.

Id sample	213	306	308	309	403	406
Tissue	tooth	tooth	tooth	tooth	tooth	tooth
Total number of reads	23 132 118	29 948 020	23 686 029	19 337 331	21 674 084	22 334 359
Total number of tooth pathogen bacteria reads	186 594	309 960	973	11 672	3 611	35 571
% of tooth pathogen bacteria reads /number of total reads	0,81%	1%	0,004%	0,06%	0,02%	0,2%
Number of <i>Actinomyces viscosus</i> reads	3 502	23 951	381	330	503	1 772
Number of <i>Actinomyces viscosus</i> bases	321 512	2 576 646	29 719	30 106	41 385	183 512
% of <i>Actinomyces viscosus</i> reads /number of total reads	0,015%	0,080%	0,002%	0,002%	0,002%	0,008%
% of <i>Actinomyces viscosus</i> reads/ Number of tooth pathogen bacteria reads	2%	8%	39%	3%	14%	5%
Number of <i>Campylobacter rectus</i> reads	5 552	4 902	150	86	173	150
Number of <i>Campylobacter rectus</i> bases	589 799	532 184	10 712	7 416	13 620	13 542
% of <i>Campylobacter rectus</i> reads /number of total reads	0,024%	0,016%	0,001%	0,000%	0,001%	0,001%
% of <i>Campylobacter rectus</i> reads/ Number of tooth pathogen bacteria reads	3%	2%	15%	1%	5%	0,4%
Number of <i>Olsenella uli</i> reads	766	83 980	216	1 998	251	1 752
Number of <i>Olsenella uli</i> bases	76 505	9 776 920	14 605	211 122	19 727	172 521
% of <i>Olsenella uli</i> reads /number of total reads	0,003%	0,280%	0,001%	0,010%	0,001%	0,008%
% of <i>Olsenella uli</i> reads/ Number of tooth pathogen bacteria reads	0,4%	27%	22%	17%	7%	5%
Number of <i>Parvimonas micra</i> reads	3 625	11 140	85	71	91	103
Number of <i>Parvimonas micra</i> bases	404 824	1 391 557	5 073	6 416	6 170	8 256
% of <i>Parvimonas micra</i> reads /number of total reads	0,016%	0,037%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%
% of <i>Parvimonas micra</i> reads/ Number of tooth pathogen bacteria reads	2%	4%	9%	1%	3%	0,3%
Number of <i>Porphyromonas gingivalis</i> reads	13 533	3 340	0	29	7	10
Number of <i>Porphyromonas gingivalis</i> bases	1 347 119	368 787	0	2 546	455	885
% of <i>Porphyromonas gingivalis</i> reads /number of total reads	0,059%	0,011%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%
% of <i>Porphyromonas gingivalis</i> reads/ Number of tooth pathogen bacteria reads	7%	1%	0%	0,2%	0,2%	0,03%
Number of <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> reads	89 444	138 056	115	79	224	2 179
Number of <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> bases	10 307 270	16 183 718	7 968	6 072	17 478	244 242

% of <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> reads /number of total reads	0,387%	0,461%	0,000%	0,000%	0,001%	0,010%
% of <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> reads/ Number of tooth pathogen bacteria reads	48%	45%	12%	1%	6%	6%
Number of <i>Rothia dentocariosa</i> reads	1 668	797	7	363	64	21 957
Number of <i>Rothia dentocariosa</i> bases	176 199	86 806	301	39 678	6 029	2 429 045
% of <i>Rothia dentocariosa</i> reads /number of total reads	0,007%	0,003%	0,000%	0,002%	0,000%	0,098%
% of <i>Rothia dentocariosa</i> reads/ Number of tooth pathogen bacteria reads	1%	0,3%	1%	3%	2%	62%
Number of <i>Streptococcus mutans</i> reads	1 771	5 904	0	8 296	2 233	15
Number of <i>Streptococcus mutans</i> bases	185 282	675 607	0	922 192	237 097	1 497
% of <i>Streptococcus mutans</i> reads /number of total reads	0,008%	0,020%	0,000%	0,043%	0,010%	0,000%
% of <i>Streptococcus mutans</i> reads/ Number of tooth pathogen bacteria reads	1%	2%	0%	71%	62%	0,04%
Number of <i>Streptococcus sanguinis</i> reads	857	1 265	3	275	45	7 187
Number of <i>Streptococcus sanguinis</i> bases	93 666	137 250	271	28 582	4 309	817 086
% of <i>Streptococcus sanguinis</i> reads /number of total reads	0,004%	0,004%	0,000%	0,001%	0,000%	0,032%
% of <i>Streptococcus sanguinis</i> reads/ Number of tooth pathogen bacteria reads	0,5%	0,4%	0,3%	2%	1%	20%
Number of <i>Treponema denticola</i> reads	2 108	7 256	4	49	2	18
Number of <i>Treponema denticola</i> bases	225 998	814 982	221	4 858	147	1 562
% of <i>Treponema denticola</i> reads /number of total reads	0,009%	0,024%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%
% of <i>Treponema denticola</i> reads/ Number of tooth pathogen bacteria reads	1%	2%	0,4%	0,4%	0,1%	0,1%
Number of <i>Tannerella forsythia</i> reads	63 768	29 369	12	96	18	428
Number of <i>Tannerella forsythia</i> bases	6 939 149	3 327 261	776	10 340	1 321	47 147
% of <i>Tannerella forsythia</i> reads /number of total reads	0,276%	0,098%	0,000%	0,000%	0,000%	0,002%
% of <i>Tannerella forsythia</i> reads/ Number of tooth pathogen bacteria reads	34%	9%	1%	1%	0,5%	1%

Bibliographie

1. Janakiram C, Deepan Kumar CV, Joseph J. Xylitol in preventing dental caries: A systematic review and meta-analyses. *J Nat Sci Biol Med.* 2017;8(1):16-21.
2. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ.* 2005;83(9):661-9.
3. Carvalho JC, Schiffner U. Dental Caries in European Adults and Senior Citizens 1996-2016: ORCA Saturday Afternoon Symposium in Greifswald, Germany - Part II. *Caries Res.* 2019;53(3):242-52.
4. Dye B, Thornton-Evans G, Li X, Iafolla T. Dental caries and tooth loss in adults in the United States, 2011-2012. *NCHS Data Brief.* 2015(197):197.
5. Bertoldi C, Lalla M, Pradelli JM, Cortellini P, Lucchi A, Zaffe D. Risk factors and socioeconomic condition effects on periodontal and dental health: A pilot study among adults over fifty years of age. *Eur J Dent.* 2013;7(3):336-46.
6. Hillson S. *Dental anthropology.* Cambridge University Press London ed2003. 1-5 p.
7. Esclassan R, Grimoud AM, Ruas MP, Donat R, Sevin A, Astie F, et al. Dental caries, tooth wear and diet in an adult medieval (12th-14th century) population from mediterranean France. *Arch Oral Biol.* 2009;54(3):287-97.
8. Scott GR, Turner II CG. *The anthropology of modern human teeth.* Press CU, editor1997.
9. Scott RG. Dental anthropology. In: Claire S, editor. *Encyclopedia of Global Archaeology*2012.
10. Canivet PA, Esclassan R, Grimoud AM, Lucas S, Jordana F, Destruhaut F, et al. Altérations dentaires socio-culturelles : proposition d'une nouvelle classification. *Actes Société française d'histoire de l'art dentaire.* 2013;18.
11. Mummery JH. On the relations which dental caries (as discovered amongst the ancient inhabitants of Britain, and amongst existing aboriginal races) may be supposed to hold to their food and social condition. Sons W, editor1870.
12. Buikstra J, Roberts C. *The Global History of Paleopathology : Pioneers and Prospects.* press OU, editor 2012.
13. Scott RG, Turner II CG. Dental Anthropology. *Annual Review of Anthropology.* 1988;17:99-126.
14. Pedersen PO. The East Greenland Eskimo Dentition, numerical variations and anatomy. *American Journal of Physical Anthropology.* 1949;7(3):477-9.

15. Moorrees CFA. The Aleut Dentition. A Correlative Study of Dental Characteristics in an Eskimoid People. Press HU, editor 1957.
16. Scott GR, Potter RH, Noss JF, Dahlberg AA, Dahlberg T. The dental morphology of Pima Indians. *Am J Phys Anthropol.* 1983;61(1):13-31.
17. Biology SftSoH. Dental Anthropology. Brothwell DR, editor 1963.
18. Greenberg JH, II CGT, Zegura SL, Campbell L, Fox JA, Laughlin WS, et al. The Settlement of the Americas: A Comparison of the Linguistic, Dental, and Genetic Evidence [and Comments and Reply]. *Current Anthropology.* 1986.
19. Whittaker DK, Molleson T, Daniel AT, Williams JT, Rose P, Resteghini R. Quantitative assessment of tooth wear, alveolar-crest height and continuing eruption in a Romano-British population. *Arch Oral Biol.* 1985;30(6):493-501.
20. Macchiarelli R. Prehistoric "fish-eaters" along the eastern Arabian coasts: dental variation, morphology, and oral health in the Ra's al-Hamra community (Qurum, sultanate of Oman, 5th-4th millennia BC). *Am J Phys Anthropol.* 1989;78(4):575-94.
21. Jurmain R. Paleoepidemiology of a central California prehistoric population from CA-Ala-329: dental disease. *Am J Phys Anthropol.* 1990;81(3):333-42.
22. Littleton J, Frohlich B. Fish-eaters and farmers: dental pathology in the Arabian Gulf. *Am J Phys Anthropol.* 1993;92(4):427-47.
23. Kerr NW. The prevalence and natural history of periodontal disease in Britain from prehistoric to modern times. *Br Dent J.* 1998;185(10):527-35.
24. Adler CJ, Dobney K, Weyrich LS, Kaidonis J, Walker AW, Haak W, et al. Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nat Genet.* 2013;45(4):450-5e1.
25. Warinner C, Rodrigues JF, Vyas R, Trachsel C, Shved N, Grossmann J, et al. Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity. *Nat Genet.* 2014;46(4):336-44.
26. Warinner C, Herbig A, Mann A, Fellows Yates JA, Weiss CL, Burbano HA, et al. A Robust Framework for Microbial Archaeology. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2017;18:321-56.
27. Mann AE, Sabin S, Ziesemer K, Vagene AJ, Schroeder H, Ozga AT, et al. Differential preservation of endogenous human and microbial DNA in dental calculus and dentin. *Sci Rep.* 2018;8(1):9822.
28. Cabot E, Chevet P. Volume 2, tome 1. La bataille du Mans des 12-14 décembre 1793 : la mémoire du sol. Texte. INRAP; 2015.

29. Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*. 1984;312(5991):282-4.
30. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-50.
31. Pääbo S, Gifford JA, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Research*. 1988.
32. Paabo S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(6):1939-43.
33. Cooper A, Poinar HN. Ancient DNA: do it right or not at all. *Science*. 2000;289(5482):1139.
34. Willerslev E, Cooper A. Ancient DNA. *Proc Biol Sci*. 2005;272(1558):3-16.
35. Shapiro B, Rambaut A, Gilbert MT. No proof that typhoid caused the Plague of Athens (a reply to Papagrigorakis et al.). *Int J Infect Dis*. 2006;10(4):334-5; author reply 5-6.
36. Gilbert MT, Cuccui J, White W, Lynnerup N, Titball RW, Cooper A, et al. Absence of *Yersinia pestis*-specific DNA in human teeth from five European excavations of putative plague victims. *Microbiology*. 2004;150(Pt 2):341-54.
37. Green RE, Krause J, Ptak SE, Briggs AW, Ronan MT, Simons JF, et al. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature*. 2006;444(7117):330-6.
38. Poinar HN, Schwarz C, Qi J, Shapiro B, Macphee RD, Buigues B, et al. Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science*. 2006;311(5759):392-4.
39. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437(7057):376-80.
40. Krause J, Briggs AW, Kircher M, Maricic T, Zwyns N, Derevianko A, et al. A complete mtDNA genome of an early modern human from Kostenki, Russia. *Curr Biol*. 2010;20(3):231-6.
41. Miller W, Drautz DI, Ratan A, Pusey B, Qi J, Lesk AM, et al. Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature*. 2008;456(7220):387-90.
42. Rasmussen M, Li Y, Lindgreen S, Pedersen JS, Albrechtsen A, Moltke I, et al. Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature*. 2010;463(7282):757-62.
43. Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, et al. A draft sequence of the Neandertal genome. *Science*. 2010;328(5979):710-22.
44. Orlando L, Ginolhac A, Zhang G, Froese D, Albrechtsen A, Stiller M, et al. Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature*. 2013;499(7456):74-8.

45. Meyer M, Fu Q, Aximu-Petri A, Glocke I, Nickel B, Arsuaga JL, et al. A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos. *Nature*. 2014;505(7483):403-6.
46. Meyer M, Arsuaga JL, de Filippo C, Nagel S, Aximu-Petri A, Nickel B, et al. Nuclear DNA sequences from the Middle Pleistocene Sima de los Huesos hominins. *Nature*. 2016;531(7595):504-7.
47. Bos KI, Schuenemann VJ, Golding GB, Burbano HA, Waglechner N, Coombes BK, et al. A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Nature*. 2011;478(7370):506-10.
48. Briggs AW, Stenzel U, Johnson PL, Green RE, Kelso J, Prufer K, et al. Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(37):14616-21.
49. Kirsanow K, Burger J. Ancient human DNA. *Ann Anat*. 2012;194(1):121-32.
50. Orlando L, Haani C. Du nouveau pour l'ADN ancien. *Société Française de Génétique*. 2000;16.
51. Dabney J, Knapp M, Glocke I, Gansauge MT, Weihmann A, Nickel B, et al. Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(39):15758-63.
52. Smith CI, Chamberlain AT, Riley MS, Stringer C, Collins MJ. The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *J Hum Evol*. 2003;45(3):203-17.
53. Adler C, Haak W, Donlon D, Cooper A, Dersarkissian C, DNA ACfA. Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. 2011.
54. Higgins D, Austin JJ. Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review. *Sci Justice*. 2013;53(4):433-41.
55. Paabo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, et al. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet*. 2004;38:645-79.
56. Lindahl T. Recovery of antediluvian DNA. *Nature*. 1993;365(6448):700.
57. Kehlmaier C, Barlow A, Hastings AK, Vamberger M, Paijmans JL, Steadman DW, et al. Tropical ancient DNA reveals relationships of the extinct Bahamian giant tortoise *Chelonoidis alburyorum*. *Proc Biol Sci*. 2017;284(1846).
58. Hauswirth WW, Dickel CD, Rowold DJ, Hauswirth MA. Inter- and intrapopulation studies of ancient humans. *Experientia*. 1994;50(6):585-91.

59. Tsai YL, Olson BH. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58(7):2292-5.
60. Kreader CA. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(3):1102-6.
61. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Forensic Sci.* 1994;39(2):362-72.
62. Marciniak S, Klunk J, Devault A, Enk J, Poinar HN. Ancient human genomics: the methodology behind reconstructing evolutionary pathways. *J Hum Evol.* 2015;79:21-34.
63. Der Sarkissian C, Allentoft ME, Avila-Arcos MC, Barnett R, Campos PF, Cappellini E, et al. Ancient genomics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1660):20130387.
64. Allentoft ME, Collins M, Harker D, Haile J, Oskam CL, Hale ML, et al. The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proc Biol Sci.* 2012;279(1748):4724-33.
65. Rizzi E, Lari M, Gigli E, De Bellis G, Caramelli D. Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genet Sel Evol.* 2012;44:21.
66. Mitchell D, Willerslev E, Hansen A. Damage and repair of ancient DNA. *Mutat Res.* 2005;571(1-2):265-76.
67. Hoss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Paabo S. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(7):1304-7.
68. Bennett EA, Massilani D, Lizzo G, Daligault J, Geigl EM, Grange T. Library construction for ancient genomics: single strand or double strand? *Biotechniques.* 2014;56(6):289-90, 92-6, 98, passim.
69. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 1993;362(6422):709-15.
70. Paabo S, Irwin DM, Wilson AC. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *J Biol Chem.* 1990;265(8):4718-21.
71. Lindahl T. The Croonian Lecture, 1996: endogenous damage to DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1996;351(1347):1529-38.
72. Kistler L, Ware R, Smith O, Collins M, Allaby RG. A new model for ancient DNA decay based on paleogenomic meta-analysis. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(11):6310-20.

73. Geigl E. Palaeogenetics of cattle domestication: Methodological challenges for the study of fossil bones preserved in the domestication centre in Southwest Asia. *Comptes rendus Palevol*. 2008.
74. Keyser-Tracqui C, Crubezy E, Ludes B. Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia. *Am J Hum Genet*. 2003;73(2):247-60.
75. Champlot S, Berthelot C, Pruvost M, Bennett EA, Grange T, Geigl EM. An efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications. *PLoS One*. 2010;5(9).
76. Leonard JA, Shanks O, Hofreiter M, Kreuz E, Hodges L, Ream W, et al. Animal DNA in PCR reagents plagues ancient DNA research. *Journal of Archaeological Science*. 2007;34(9):1361-6.
77. Erlwein O, Robinson MJ, Dustan S, Weber J, Kaye S, McClure MO. DNA extraction columns contaminated with murine sequences. *PLoS One*. 2011;6(8):e23484.
78. Theves C, Senescau A, Vanin S, Keyser C, Ricaut FX, Alekseev AN, et al. Molecular identification of bacteria by total sequence screening: determining the cause of death in ancient human subjects. *PLoS One*. 2011;6(7):e21733.
79. Maricic T, Paabo S. Optimization of 454 sequencing library preparation from small amounts of DNA permits sequence determination of both DNA strands. *Biotechniques*. 2009;46(1):51-2, 4-7.
80. Meyer M, Kircher M. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harb Protoc*. 2010;2010(6):pdb.prot5448.
81. Der Sarkissian C, Pichereau V, Dupont C, Ilsoe PC, Perrigault M, Butler P, et al. Ancient DNA analysis identifies marine mollusc shells as new metagenomic archives of the past. *Mol Ecol Resour*. 2017;17(5):835-53.
82. Willerslev E, Davison J, Moora M, Zobel M, Coissac E, Edwards ME, et al. Fifty thousand years of Arctic vegetation and megafaunal diet. *Nature*. 2014;506(7486):47-51.
83. Willmann C, Mata X, Hanghoej K, Tonasso L, Tisseyre L, Jeziorski C, et al. Oral health status in historic population: Macroscopic and metagenomic evidence. *PLoS One*. 2018;13(5):e0196482.
84. Warinner C, Speller C, Collins MJ. A new era in palaeomicrobiology: prospects for ancient dental calculus as a long-term record of the human oral microbiome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015;370(1660):20130376.

85. Hansen HB, Damgaard PB, Margaryan A, Stenderup J, Lynnerup N, Willerslev E, et al. Comparing Ancient DNA Preservation in Petrous Bone and Tooth Cementum. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170940.
86. Yuan S, Cohen DB, Ravel J, Abdo Z, Forney LJ. Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PLoS One*. 2012;7(3):e33865.
87. Querfurth R, Fischer A, Schweiger MR, Lehrach H, Mertes F. Creation and application of immortalized bait libraries for targeted enrichment and next-generation sequencing. *Biotechniques*. 2012;52(6):375-80.
88. Gansauge MT, Meyer M. Single-stranded DNA library preparation for the sequencing of ancient or damaged DNA. *Nat Protoc*. 2013;8(4):737-48.
89. Illumina. <https://www.youtube.com/user/IlluminaInc/videos>.
90. Leonardi M, Librado P, Der Sarkissian C, Schubert M, Alfarhan AH, Alquraishi SA, et al. Evolutionary Patterns and Processes: Lessons from Ancient DNA. *Syst Biol*. 2017;66(1):e1-e29.
91. Mertes F, Elsharawy A, Sauer S, van Helvoort JM, van der Zaag PJ, Franke A, et al. Targeted enrichment of genomic DNA regions for next-generation sequencing. *Brief Funct Genomics*. 2011;10(6):374-86.
92. Schuenemann VJ, Bos K, DeWitte S, Schmedes S, Jamieson J, Mittnik A, et al. Targeted enrichment of ancient pathogens yielding the pPCP1 plasmid of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(38):E746-52.
93. Devault AM, Golding GB, Waglechner N, Enk JM, Kuch M, Tien JH, et al. Second-pandemic strain of *Vibrio cholerae* from the Philadelphia cholera outbreak of 1849. *N Engl J Med*. 2014;370(4):334-40.
94. Feldman M, Harbeck M, Keller M, Spyrou MA, Rott A, Trautmann B, et al. A High-Coverage *Yersinia pestis* Genome from a Sixth-Century Justinianic Plague Victim. *Mol Biol Evol*. 2016;33(11):2911-23.
95. Ziesemer KA, Ramos-Madriral J, Mann AE, Brandt BW, Sankaranarayanan K, Ozga AT, et al. The efficacy of whole human genome capture on ancient dental calculus and dentin. *Am J Phys Anthropol*. 2019;168(3):496-509.
96. Wagner DM, Klunk J, Harbeck M, Devault A, Waglechner N, Sahl JW, et al. *Yersinia pestis* and the plague of Justinian 541-543 AD: a genomic analysis. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(4):319-26.

97. Ji Y, Ashton L, Pedley SM, Edwards DP, Tang Y, Nakamura A, et al. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecol Lett.* 2013;16(10):1245-57.
98. Pedersen MW, Overballe-Petersen S, Ermini L, Sarkissian CD, Haile J, Hellstrom M, et al. Ancient and modern environmental DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1660):20130383.
99. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem.* 2009;55(5):856-66.
100. Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol Ecol.* 2012;21(8):2045-50.
101. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data 2018 [Available from: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>].
102. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal.* 2011.
103. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-20.
104. Schubert M, Lindgreen S, Orlando L. AdapterRemoval v2: rapid adapter trimming, identification, and read merging. *BMC Res Notes.* 2016;9:88.
105. Breitwieser FP, Lu J, Salzberg SL. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Brief Bioinform.* 2017.
106. Lindgreen S, Adair KL, Gardner PP. An evaluation of the accuracy and speed of metagenome analysis tools. *Sci Rep.* 2016;6:19233.
107. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010;26(5):589-95.
108. Jo H, Koh G. Faster single-end alignment generation utilizing multi-thread for BWA. *Biomed Mater Eng.* 2015;26 Suppl 1:S1791-6.
109. Li H. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078-9.
110. Ginolhac A, Rasmussen M, Gilbert MT, Willerslev E, Orlando L. mapDamage: testing for damage patterns in ancient DNA sequences. *Bioinformatics.* 2011;27(15):2153-5.
111. Jonsson H, Ginolhac A, Schubert M, Johnson PL, Orlando L. mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics.* 2013;29(13):1682-4.

112. Weissensteiner H, Forer L, Fuchsberger C, Schopf B, Kloss-Brandstatter A, Specht G, et al. mtDNA-Server: next-generation sequencing data analysis of human mitochondrial DNA in the cloud. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W64-9.
113. Pignatelli M, Aparicio G, Blanquer I, Hernandez V, Moya A, Tamames J. Metagenomics reveals our incomplete knowledge of global diversity. *Bioinformatics.* 24. England2008. p. 2124-5.
114. Segata N, Waldron L, Ballarini A, Narasimhan V, Jousson O, Huttenhower C. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nat Methods.* 2012;9(8):811-4.
115. Truong DT, Tett A, Pasolli E, Huttenhower C, Segata N. Microbial strain-level population structure and genetic diversity from metagenomes. *Genome Res.* 2017;27(4):626-38.
116. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.*9(4):357-9.
117. Louvel G, Der Sarkissian C, Hanghoj K, Orlando L. metaBIT, an integrative and automated metagenomic pipeline for analysing microbial profiles from high-throughput sequencing shotgun data. *Mol Ecol Resour.* 2016;16(6):1415-27.
118. Velsko IM, Frantz LAF, Herbig A, Larson G, Warinner C. Selection of Appropriate Metagenome Taxonomic Classifiers for Ancient Microbiome Research. *mSystems.* 2018;3(4).
119. Herbig A, Maixner F, Bos KI, Zink A, Krause J, Huson DH. MALT: Fast alignment and analysis of metagenomic DNA sequence data applied to the Tyrolean Iceman. 2016.
120. Vagene AJ, Herbig A, Campana MG, Robles Garcia NM, Warinner C, Sabin S, et al. *Salmonella enterica* genomes from victims of a major sixteenth-century epidemic in Mexico. *Nat Ecol Evol.* 2018;2(3):520-8.
121. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215(3):403-10.
122. Kunin AA, Evdokimova AY, Moiseeva NS. Age-related differences of tooth enamel morphochemistry in health and dental caries. *EPMA J.* 2015;6(1).
123. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed).*3:711-35.
124. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent.* 2010;38(9):687-97.
125. Charon J. *Parodontie médicale. Innovations cliniques, 2e édition.* CdP, editor2009.

126. Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2008;35(8 Suppl):282-5.
127. Iwata T, Yamato M, Ishikawa I, Ando T, Okano T. Tissue engineering in periodontal tissue. *Anat Rec (Hoboken)*. 2014;297(1):16-25.
128. Lavigne SE, Molto JE. System of measurement of the severity of periodontal disease in past populations. *International journal of Osteoarchaeology*. 1995.
129. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science*. 2009;326(5960):1694-7.
130. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens*. 2013;2(2):288-356.
131. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 7. United States 2010. p. 335-6.
132. Lang N, Mombelli A, Attstrom R. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 5th ed 2008.
133. Seneviratne CJ, Zhang CF, Samaranayake LP. Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin J Dent Res*. 2011;14(2):87-94.
134. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):95-108.
135. Zijng V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmur R, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One*. 2010;5(2):e9321.
136. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:7-15.
137. Franklin MJ, Chang C, Akiyama T, Bothner B. New Technologies for Studying Biofilms. *Microbiol Spectr*. 2015;3(4).
138. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2005;38:72-122.
139. Hillson S. *Teeth*. Second Edition. ed. Press CU, editor 2005.
140. Buckley S, Usai D, Jakob T, Radini A, Hardy K. Dental Calculus Reveals Unique Insights into Food Items, Cooking and Plant Processing in Prehistoric Central Sudan. *PLoS One*. 92014.

141. Liebe-Harkort C, Astvaldsdottir A, Tranaeus S. Visual and Radiographic Assessment of Dental Caries by Osteologists: A Validity and Reliability Study. *International Journal of Osteoarchaeology*. 2011;21(1):55-65.
142. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *The Lancet*. 2007;369(9555):51-9.
143. Sheiham A. Dietary effects on dental diseases. *Public Health Nutr*. 2001;4(2b):569-91.
144. Hillson S. Recording dental caries in archaeological human remains. *International Journal of Osteoarchaeology*. 2001;11(4):249-89.
145. Larsen CS, Shavit R, Griffin MC. Dental Caries Evidence for Dietary Change : An Archaeological Context. *Advances in Dental Anthropology*. 1991:179-202.
146. Moynihan PJ. The role of diet and nutrition in the etiology and prevention of oral diseases. *Bull World Health Organ*. 2005;83(9):694-9.
147. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011;90(3):294-303.
148. Zhan L. Rebalancing the Caries Microbiome Dysbiosis: Targeted Treatment and Sugar Alcohols. *Adv Dent Res*. 2018;29(1):110-6.
149. Takahashi K, Correia Ade S, Cunha RF. Molar incisor hypomineralization. *J Clin Pediatr Dent*. 2009;33(3):193-7.
150. Kutsch VK. Dental caries: an updated medical model of risk assessment. *J Prosthet Dent*. 2014;111(4):280-5.
151. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000*. 2012;60(1):15-39.
152. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005;366(9499):1809-20.
153. Wasterlain SN, Cunha E, Hillson S. Periodontal disease in a Portuguese identified skeletal sample from the late nineteenth and early twentieth centuries. *Am J Phys Anthropol*. 2011;145(1):30-42.
154. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 2014;93(11):1045-53.
155. Teles R, Teles F, Frias-Lopez J, Paster B, Haffajee A. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontol 2000*. 2013;62(1):95-162.
156. Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, et al. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis,

and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol*. 2009;80(9):1421-32.

157. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, et al. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res*. 2014;2014:476068.

158. Friedrich V, Gruber C, Nimeth I, Pabinger S, Sekot G, Posch G, et al. Outer membrane vesicles of *Tannerella forsythia*: biogenesis, composition, and virulence. *Mol Oral Microbiol*. 2015;30(6):451-73.

159. Contreras A, Moreno SM, Jaramillo A, Pelaez M, Duque A, Botero JE, et al. Periodontal microbiology in Latin America. *Periodontol 2000*. 2015;67(1):58-86.

160. El Bokl MA, Shawky A, Riad GS, Abdel Fattah HS, Shalaby H, Nady A, et al. Procoagulant versus anticoagulant factors in cirrhotic patients. *Arab J Gastroenterol*. 2014;15(3-4):123-9.

161. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997;14:9-11.

162. Hasan A, Palmer RM. A clinical guide to periodontology: pathology of periodontal disease. *Br Dent J*. 2014;216(8):457-61.

163. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2013;62(1):59-94.

164. Zimmermann H, Hagenfeld D, Diercke K, El-Sayed N, Fricke J, Greiser KH, et al. Pocket depth and bleeding on probing and their associations with dental, lifestyle, socioeconomic and blood variables: a cross-sectional, multicenter feasibility study of the German National Cohort. *BMC Oral Health*. 2015;15:7.

165. Warren KR, Postolache TT, Groer ME, Pinjari O, Kelly DL, Reynolds MA. Role of chronic stress and depression in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2014;64(1):127-38.

166. Longo PL, Dabdoub S, Kumar P, Artese HPC, Dib SA, Romito GA, et al. Glycemic Status Affects the Subgingival Microbiome of Diabetic Patients. *J Clin Periodontol*. 2018.

167. Nordendahl E, Gustafsson A, Norhammar A, Nasman P, Ryden L, Kjellstrom B. Severe Periodontitis Is Associated with Myocardial Infarction in Females. *J Dent Res*. 2018:22034518765735.

168. Martinez-Rivera JI, Xibille-Friedmann DX, Gonzalez-Christen J, de la Garza-Ramos MA, Carrillo-Vazquez SM, Montiel-Hernandez JL. Salivary ammonia levels and *Tannerella forsythia* are associated with rheumatoid arthritis: A cross sectional study. *Clin Exp Dent Res*. 2017;3(3):107-14.

169. Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Frequency and levels of candidate endodontic pathogens in acute apical abscesses as compared to asymptomatic apical periodontitis. *PLoS One*. 2018;13(1):e0190469.
170. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod*. 2010;36(8):1277-88.
171. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(6):348-81.
172. Ogden A. *Advances in human palaeopathology*. Pinhasi R, Mays S, editors. Chichester, England; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2008.
173. Segura-Egea JJ, Martin-Gonzalez J, Castellanos-Cosano L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. *Int Endod J*. 2015;48(10):933-51.
174. Sundqvist G. *Bacteriological studies of necrotic dental pulps (dissertation)*. Umeå, Sweden: University of Umeå.; 1976.
175. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *European Journal of Oral Sciences*. 1981;89(4):321-8.
176. Haapasalo M. *Bacteroides spp. in dental root canal infections*. *Endod Dent Traumatol*. 1989;5(1):1-10.
177. Sundqvist G, Johansson E, Sjogren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod*. 1989;15(1):13-9.
178. Jiang S, Gao X, Jin L, Lo EC. Salivary Microbiome Diversity in Caries-Free and Caries-Affected Children. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12).
179. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(2):255-73.
180. Abbott PV. The periapical space--a dynamic interface. *Aust Endod J*. 2002;28(3):96-107.
181. Abbott PV. Classification, diagnosis and clinical manifestations of apical periodontitis. *Endodontic Topics*. 2004;8(1):36-54.
182. Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;94(3):281-93.
183. Simon S, Machtou P, Pertot W. *Endodontie*. CdP, editor 2012.
184. Dias G, Tayles N. 'Abscess cavity'—a misnomer. *International Journal of Osteoarchaeology*. 1997;7(5):548-54.

185. Nair PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000*. 1997;13:121-48.
186. Yucha JM, Pokines JT, Bartelink EJ. A Comparative Taphonomic Analysis of 24 Trophy Skulls from Modern Forensic Cases. *J Forensic Sci*. 2017;62(5):1266-78.
187. Cann RL. Genetic clues to dispersal in human populations: retracing the past from the present. *Science*. 2001;291(5509):1742-8.
188. Ozga AT, Nieves-Colon MA, Honap TP, Sankaranarayanan K, Hofman CA, Milner GR, et al. Successful enrichment and recovery of whole mitochondrial genomes from ancient human dental calculus. *Am J Phys Anthropol*. 2016;160(2):220-8.
189. Warinner C, Speller C, Collins MJ, Lewis CM, Jr. Ancient human microbiomes. *J Hum Evol*. 2015;79:125-36.
190. Ziesemer KA, Mann AE, Sankaranarayanan K, Schroeder H, Ozga AT, Brandt BW, et al. Intrinsic challenges in ancient microbiome reconstruction using 16S rRNA gene amplification. *Sci Rep*. 2015;5:16498.
191. Henry AG, Ungar PS, Passey BH, Sponheimer M, Rossouw L, Bamford M, et al. The diet of *Australopithecus sediba*. *Nature*. 2012;487(7405):90-3.
192. Hardy K, Buckley S, Collins MJ, Estalrich A, Brothwell D, Copeland L, et al. Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften*. 2012;99(8):617-26.
193. Hans R, Preus OJM, Knut A, Selvig, Pia Bennike. Ancient bacterial DNA (aDNA) in dental calculus from archaeological human remains. 2011;38(8):1827–31.
194. Velsko IM, Overmyer KA, Speller C, Klaus L, Collins MJ, Loe L, et al. The dental calculus metabolome in modern and historic samples. *Metabolomics*. 2017;13(11):134.
195. Limbo J. The frequency and pattern of dental caries in archaeological populations from Estonia. *Papers on Anthropology*. 2013;22:121-32.
196. Rudney JD, Katz RV, Brand JW. Interobserver reliability of methods for paleopathological diagnosis of dental caries. *Am J Phys Anthropol*. 1983;62(3):243-8.
197. Poole DF, Tratman EK. Post-mortem changes in human teeth from late upper palaeolithic/mesolithic occupants of English limestone cave. *Arch Oral Biol*. 1978;23(12):1115-20.
198. Sperber GH. Dental Wear: Attrition, Erosion, and Abrasion-A Palaeo-Odontological Approach. *Dent J (Basel)*. 2017;5(2).
199. Moore WJ, Corbett E. The distribution of dental caries in ancient British populations. II. Iron Age, Romano-British and Mediaeval periods. *Caries Res*. 1973;7(2):139-53.

200. Lingstrom P, Borrman H. Distribution of dental caries in an early 17th century swedish population with special reference to diet. *International Journal of Osteoarchaeology*. 1999.
201. Oxilia G, Peresani M, Romandini M, Matteucci C, Spiteri CD, Henry AG, et al. Earliest evidence of dental caries manipulation in the Late Upper Palaeolithic. *Sci Rep*. 2015;5:12150.
202. Peter KP, Mute BR, Pitale UM, Shetty S, Hc S, Satpute PS. Prevalence of periodontal disease and characterization of its extent and severity in an adult population - an observational study. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(12):Zc04-7.
203. Brothwell DR. Digging Up Bones. In: Press CU, editor. First edition ed: Oxford University Press; 1965. p. 155.
204. Kerr N. A method of assessing periodontal status in archaeologically derived skeletal material. *Journal of paleopathology*. 1988.
205. Davies DM, Picton DC, Alexander AG. An objective method of assessing the periodontal condition in human skulls. *J Periodontal Res*. 1969;4(1):74-7.
206. Lavelle CL, Moore WJ. Alveolar bone resorption in anglo-saxon and seventeenth century mandibles. *J Periodontal Res*. 1969;4(1):70-3.
207. Goldberg HJ, Weintraub JA, Roghmann KJ, Cornwell WS. Measuring periodontal disease in ancient populations: root and wear indices in study of American Indian skulls. *J Periodontol*. 1976;47(6):348-51.
208. Kingsmill V. Chronic periodontitis in an eighteenth century population. *Br Dent J*. 1991;170(3):118-20.
209. Whittaker D. Quantitative studies on age changes in the teeth and surrounding structures in archaeological material: a review. *J R Soc Med*. 1992;85(2):97-101.
210. Mortensen H, Winther JE, Birn H. Periapical granulomas and cysts. An investigation of 1,600 cases. *Scand J Dent Res*. 1970;78(3):241-50.
211. Tomczyk J, Turska-Szybka A, Zalewska M, Olczak-Kowalczyk D. Reliability of the Assessment of Periodontal Disease in Historical Populations. *International journal of Osteoarchaeology*. 2016.
212. Rawski AA, Brehmer B, Knutsson K, Petersson K, Reit C, Rohlin M. The major factors that influence endodontic retreatment decisions. *Swed Dent J*. 2003;27(1):23-9.
213. Ricucci D, Pascon EA, Ford TR, Langeland K. Epithelium and bacteria in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(2):239-49.
214. Araujo JP, Lemos CA, Miniello TG, Alves FA. The relevance of clinical and radiographic features of jaw lesions: A prospective study. *Braz Oral Res*. 2016;30(1):e96.

215. Peterson SN, Snesrud E, Schork NJ, Bretz WA. Dental caries pathogenicity: a genomic and metagenomic perspective. *Int Dent J.* 2011;61 Suppl 1:11-22.
216. Weyrich LS, Duchene S, Soubrier J, Arriola L, Llamas B, Breen J, et al. Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus. *Nature.* 2017;544(7650):357-61.
217. Godechot J. *France and the Atlantic Revolution of the Eighteenth Century, 1770-1799* The Free Press; First Amer ed edition (1965); 1965.
218. Larousse É. *Encyclopédie Larousse en ligne - Révolution française 1789-1799.* 2019.
219. Martin J. *La Vendée et sa guerre, les logiques de l'événement.* 1985.
220. Mathiez A. *La Révolution française.* Manufacture L, editor2006.
221. Huchet F. *Les premiers jours de la guerre de Vendée en Maine-et-Loire (2-22 mars 1793).* Analyse d'une insurrection. 1988.
222. Crosefinte J. *L'armement du combattant vendéen.*1989.
223. Larousse É. *Encyclopédie Larousse en ligne - guerre de Vendée.* 2019.
224. Petitfrère C. *La Vendée en l'an II : défaite et répression.* 1995.
225. Cabot E, Chevet P, Duchesne S. La bataille du Mans, apports archéo anthropologiques à l'étude des guerres de Vendée, 10-13 décembre 1793. *Antropo, ISSN-e 1578-2603, Vol 27,* 2012. 2012.
226. Chardon H. *Les vendéens dans la Sarthe.* Le Mans1871.
227. La Rochejaquelein M-V. *Mémoires de Mme la marquise de La Rochejaquelein , écrits par elle-même, et rédigés par M. de Barante* 1823.
228. Theves C, Cabot E, Bouakaze C, Chevet P, Crubezy E, Balaesque P. About 42% of 154 remains from the "Battle of Le Mans", France (1793) belong to women and children: Morphological and genetic evidence. *Forensic Sci Int.* 2016;262:30-6.
229. Gilbert M, Rudbeck L, Willerslev E, Hansen A, Smith C, Penkman K, et al. Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy.* 2005.
230. Champfaily L. *Study of the genetic continuity between late 18th century population and contemporary populations from the French "Pays de la Loire" region by comparaison of their mitochondrial DNA.:* Université Toulouse 3 Paul Sabatier; 2015.
231. Delon S. *Changements des pools génétiques en Europe : ce que nous disent les lignées paternelles et la comparaison des lignées contemporaines avec une population archéologique. :* Université Paul Sabatier Toulouse 3; 2015.

232. Bibaut M. Le massacre du Mans du 13 décembre 1793. Etude anthropologique et dentaire d'une population.: Paris Descartes; 2013.
233. Nebenhaus M. Etude anthropologique et dentaire de deux charniers datant de la guerre de Vendée, 1793. 2011.
234. Keyser-Tracqui C, Ludes B. Methods for the study of ancient DNA. *Methods Mol Biol.* 2005;297:253-64.
235. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10) [Internet]. 2016. Available from: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#/K00-K14>.
236. Roberts C, Manchester K. The archaeology of disease. The History Press ed2010.
237. Dias GJ, Prasad K, Santos AL. Pathogenesis of apical periodontal cysts: guidelines for diagnosis in palaeopathology. *International Journal of Osteoarchaeology.* 2007;17(6):619-26.
238. Oliveira RE, Neves WA. Oral health in prehistoric San Pedro de Atacama oases, Northern Chile. *Homo.* 2015;66(6):492-507.
239. Damgaard PB, Margaryan A, Schroeder H, Orlando L, Willerslev E, Allentoft ME. Improving access to endogenous DNA in ancient bones and teeth. *Sci Rep.* 2015;5:11184.
240. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 1999;23(2):147.
241. Schubert M, Ginolhac A, Lindgreen S, Thompson JF, Al-Rasheid KA, Willerslev E, et al. Improving ancient DNA read mapping against modern reference genomes. *BMC Genomics.* 2012;13:178.
242. Herbig A, Maixner F, Bos K, Zink A, Krause J, Huson D. MALT : fast alignment and analysis of metagenomic DNA sequence data applied to the Tyrolean Iceman. *BioRxiv* : 050559. 2016.
243. Schubert M, Ermini L, Der Sarkissian C, Jonsson H, Ginolhac A, Schaefer R, et al. Characterization of ancient and modern genomes by SNP detection and phylogenomic and metagenomic analysis using PALEOMIX. *Nat Protoc.* 2014;9(5):1056-82.
244. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 29. United States2011. p. 24-6.
245. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* 2013;14(2):178-92.

246. Janket SJ, Baird AE, Chuang SK, Jones JA. Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95(5):559-69.
247. Darre L, Vergnes JN, Gourdy P, Sixou M. Efficacy of periodontal treatment on glycaemic control in diabetic patients: A meta-analysis of interventional studies. *Diabetes Metab.* 2008;34(5):497-506.
248. Rosenstein ED, Greenwald RA, Kushner LJ, Weissmann G. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation.* 2004;28(6):311-8.
249. de Pablo P, Dietrich T, McAlindon TE. Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. *J Rheumatol.* 2008;35(1):70-6.
250. Vergnes JN, Sixou M. Preterm low birth weight and maternal periodontal status: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196(2):135.e1-7.
251. Otomo-Corgel J, Pucher JJ, Rethman MP, Reynolds MA. State of the science: chronic periodontitis and systemic health. *J Evid Based Dent Pract.* 2012;12(3 Suppl):20-8.
252. Nabet C, Lelong N, Colombier ML, Sixou M, Musset AM, Goffinet F, et al. Maternal periodontitis and the causes of preterm birth: the case-control Epipap study. *J Clin Periodontol.* 2010;37(1):37-45.
253. Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, et al. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med.* 2007;356(9):911-20.

ABSTRACT

Recent developments in High-Throughput DNA sequencing (HTS) technologies and ancient DNA (aDNA) research have opened access to the characterization of the microbial communities within past populations. Most studies have, however, relied on the analysis of dental calculus as one particular material type particularly prone to the molecular preservation of ancient microbial biofilms and potential of entire teeth for microbial characterization, both of healthy communities and pathogens in ancient individuals, remains overlooked. In this study, we used shotgun sequencing to characterize the bacterial composition from historical subjects showing macroscopic evidence of oral pathologies.

The objectives of this work were 1) to identify, in an 18th century population of western France, subjects with specific oral pathologies: dental caries; periodontal diseases and periapical inflammatory lesions; 2) to characterize the oral flora of these subjects in terms of its taxonomic composition; and 3) to determine whether it was possible to detect the presence of oral pathogenic bacteria involved in periapical inflammatory lesions, caries and parodontopathies, from a healthy tooth.

The presence of *Streptococcus mutans* and also *Rothia dentocariosa*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Olsenella uli* and *Parvimonas micra* was confirmed through the presence of typical signatures of post-mortem DNA damage at an average depth-of-coverage ranging from 0.5 to 7X, with a minimum of 35% (from 35 to 93%) of the positions in the genome covered at least once. Each sampled tooth showed a specific bacterial signature associated with carious or periodontal pathologies. This work demonstrates that from a healthy independent tooth, without visible macroscopic pathology, we can identify a signature of specific pathogens and deduce the oral health status of an individual.

RESUME

Le récent développement des technologies de séquençage de l'ADN ancien (ADNa) à haut débit (High-Throughput DNA sequencing : HTS) a permis l'accès et la caractérisation des communautés microbiennes dans les populations du passé. La plupart des analyses se sont appuyées sur l'étude du tartre dentaire, car il permet la préservation de biofilms microbiens anciens. L'analyse de la dent entière pour la caractérisation des microbiomes commensaux et pathogènes chez les sujets archéologiques, demeure quant à elle négligée. Dans cette étude, nous avons utilisé le séquençage shotgun pour caractériser le microbiome bactérien de sujets anciens présentant des signes macroscopiques et radiologiques de pathologies bucco-dentaires. Les objectifs de ce travail étaient 1) d'identifier, dans une population du XVIIIe siècle de l'Ouest de la France, les sujets présentant des pathologies bucco-dentaires spécifiques : caries dentaires ; parodontopathie et Lésions Inflammatoires Péri-radicales d'Origine Endodontique (LIPOE); 2) de caractériser la flore orale de ces sujets au niveau de sa composition taxonomique et 3) de déterminer s'il était possible, à partir d'une dent saine, de mettre en évidence la présence de bactéries pathogènes orales impliquées dans les LIPOE, les caries et les parodontopathies.

La présence de *Streptococcus mutans* ainsi que de *Rothia dentocariosa*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Olsenella uli* et *Parvimonas micra* a été confirmée avec une profondeur moyenne comprise entre 0.5 à 7X, et un minimum de 35% (de 35 à 93%) du génome couvert au moins une fois. Chaque dent échantillonnée présentait une signature bactérienne spécifique associée à des pathologies carieuses ou parodontales. Ce travail démontre qu'à partir d'une dent saine et isolée, nous pouvons identifier des agents pathogènes spécifiques et en déduire l'état de santé buccodentaire d'un individu.

