

**UNIVERSITE DE STRASBOURG**

**FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE**

**Année 2018**

**N° 72**

**THESE**

Présentée pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire

le 13 décembre 2018.

par

Laura KRUMENACKER

Née le 14 mars 1993 à STRASBOURG

**L'OS PETREUX, UNE ALTERNATIVE A L'ORGANE DENTAIRE EN  
PALEOGENETIQUE?**

JURY

Président : Professeur François CLAUSS

Assesseurs : Professeur Christine KEYSER

Docteur Olivier ETIENNE

Docteur Florence FIORETTI



**FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE DE STRASBOURG**

Doyen : Professeur C. TADDEI-GROSS

Doyens honoraires : Professeur R. FRANK  
Professeur M. LEIZE  
Professeur Y. HAIKEL

Professeurs émérites : Professeur W. BACON  
Professeur H. TENENBAUM

Responsable des Services Administratifs : Mme F. DITZ-ROUGEL

**Professeurs des Universités**

V. BALL	Ingénierie Chimique, Énergétique - Génie des Procédés
A. BLOCH-ZUPAN	Sciences Biologiques
F. CLAUSS	Odontologie Pédiatrique
J-L. DAVIDEAU	Parodontologie
Y. HAIKEL	Odontologie Conservatrice - Endodontie
O. HUCK	Parodontologie
M-C. MANIERE	Odontologie Pédiatrique
F. MEYER	Sciences Biologiques
M. MINOUX	Odontologie Conservatrice - Endodontie
A-M. MUSSET	Prévention - Épidémiologie - Économie de la Santé - Odontologie Légale
C. TADDEI-GROSS	Prothèses
B. WALTER	Prothèses

**Maîtres de Conférences**

S. BAHI-GROSS	Chirurgie Buccale - Pathologie et Thérapeutique - Anesthésiologie et Réanimation
L. BIGEARD	Prévention - Épidémiologie - Économie de la Santé - Odontologie Légale
Y. BOLENDER	Orthopédie Dento-Faciale
F. BORNERT	Chirurgie Buccale - Pathologie et Thérapeutique - Anesthésiologie et Réanimation
A. BOUKARI	Chirurgie Buccale - Pathologie et Thérapeutique - Anesthésiologie et Réanimation
O. ETIENNE	Prothèses
F. FIORETTE	Odontologie Conservatrice - Endodontie
C-I. GROS	Sciences Anatomiques et Physiologiques, Oculodentiques - Biomatériaux - Biophysique - Radiologie
S. JUNG	Sciences Biologiques
N. LADHARI	Sciences Anatomiques et Physiologiques, Oculodentiques - Biomatériaux - Biophysique - Radiologie
D. OFFNER	Prévention - Épidémiologie - Économie de la Santé - Odontologie Légale
R. SERFATY	Odontologie Conservatrice - Endodontie
M. SOELL	Parodontologie
D. WAGNER	Orthopédie Dento-Faciale
E. WALTMANN	Prothèses

**Équipes de Recherche**

N. JESSEL	INSERM / Directeur de Recherche
Ph. LAVALLE	INSERM / Directeur de Recherche
H. LESOT	CNRS / Directeur de Recherche
M-H. METZ-BOUTIGUE	INSERM / Directeur de Recherche
P. SCHAAF	UdS / Professeur des Universités / Directeur d'Unité
B. SENER	INSERM / Directeur de Recherche

# Remerciements

## **Aux membres du jury :**

A Monsieur le Professeur François CLAUSS,

Vous me faites l'honneur de présider ce Jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde considération et de mes remerciements pour le temps consacré à ce travail.

A Madame la Professeure Christine KEYSER,

Vous m'avez fait l'honneur de diriger ce travail. Je trouve ici l'opportunité de vous exprimer ma sincère reconnaissance pour m'avoir ouvert les portes de l'Institut de Médecine légale de STRASBOURG et confié ce sujet avec enthousiasme. Je vous remercie de tout cœur pour votre disponibilité et votre patience au cours de ces années de rédaction ainsi que de m'avoir accompagné depuis mes premiers pas dans un laboratoire jusqu'à la rédaction de la conclusion de ce travail fort intéressant. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde admiration et de ma gratitude pour avoir permis la réalisation de ce projet dans des conditions exceptionnelles.

A Monsieur le Docteur Olivier ETIENNE,

Vous m'avez fait l'honneur de co-diriger ce travail en me permettant de traiter un sujet dans un domaine qui me tenait particulièrement à cœur. Ce fut une réelle chance pour moi de réaliser mon stage actif dans votre cabinet et d'avoir pu bénéficier de votre réseau de connaissances ainsi que de votre grande expérience dans de nombreux domaines. Veuillez trouver ici l'expression de mon admiration et de mes sincères remerciements pour avoir rendu ce travail possible.

A Madame la Docteure Florence FIORETTI,

Vous me faites l'honneur de participer à ce jury de thèse. J'ai eu la chance de bénéficier de votre expertise au sein de l'unité 1260 de l'INSERM ce qui m'a permis de compléter ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mes remerciements pour le temps consacré à ce travail.

## **A tous ceux qui ont participé à l'élaboration de ce travail :**

A Monsieur le Professeur Jean-Jacques BRAUN,

Je tiens à vous remercier pour notre entrevue qui m'a permis d'approcher un peu plus des mystères de l'os pétreux. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour votre participation à l'élaboration de ce travail.

A toute l'équipe de l'Institut Médico-Légal de la faculté de médecine de STRASBOURG,

Je souhaite vous remercier pour votre accueil chaleureux, vos encouragements et nos pauses de midi très animées.

A Angéla GONZALEZ, merci d'avoir été présente à chaque étape, de m'avoir fait découvrir les entrailles de l'Institut et d'avoir partagé avec moi votre passion pour votre métier. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre patience et votre disponibilité. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour tout ce temps passé en corrections et relectures.

A Catherine CANNET, merci de m'avoir fait découvrir le monde merveilleux de l'histologie. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements pour ce travail fantastique sur l'histologie de la dent et de l'os pétreux.

A Vincent, Clémence et Laura, merci pour vos précieux conseils depuis le tout début.

A toute l'équipe de l'unité 1260 de l'INSERM,

Je vous remercie pour votre accueil et votre investissement dans ce travail.

A Nadia JESSEL, merci de m'avoir reçue dans votre unité et d'avoir participé à la réalisation de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

A Hervé GEGOUT, merci pour vos précieuses explications et pour votre patience afin de réaliser des coupes de dents parfaites. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance pour le temps consacré à ce travail.

A tous ceux qui ont rendu possible le travail histologique réalisé,

Je vous exprime toute ma reconnaissance pour avoir accepté de faire avancer notre connaissance du monde jour après jour.

A Héléne, merci d'avoir fait don de tes précieuses dents de sagesse au nom de la science.

## **A mes proches :**

A mes chers parents et mon frère, pour leur soutien indéfectible à chaque instant. Pour leurs nombreuses relectures et leurs encouragements. Merci pour le bonheur que vous m'avez apporté, je vous aime très fort.

A mes grands-parents, pour leur affection et leur sollicitude à toute épreuve. Merci d'être présent à mes côtés et toujours à l'écoute de mes aventures.

A toute ma famille en général et les amis de la famille, pour votre affection et votre accompagnement au long de ces six longues années d'études. Merci pour votre soutien indispensable et votre compréhension.

A mes amis, de longue date et plus récents, merci pour votre amitié malgré parfois la distance. Merci pour tous ces moments inoubliables partagés.

A toute l'équipe du cabinet, le Docteur Alain AZUELOS et Solène, merci pour vos encouragements au fil de ce travail, pour votre compréhension et pour m'avoir permis d'entrer dans la vie professionnelle dans des conditions exceptionnelles.

**UNIVERSITE DE STRASBOURG**

**FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE**

**Année 2018**

**N° 72**

**THESE**

Présentée pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire

le 13 décembre 2018.

par

Laura KRUMENACKER

Née le 14 mars 1993 à STRASBOURG

**L'OS PETREUX, UNE ALTERNATIVE A L'ORGANE DENTAIRE EN  
PALEOGENETIQUE?**

JURY

Président : Professeur François CLAUSS

Assesseurs : Professeur Christine KEYSER

Docteur Olivier ETIENNE

Docteur Florence FIORETTI

# Table des matières

<b>Liste des figures</b> .....	<b>6</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>8</b>
<b>Liste des annexes</b> .....	<b>8</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>9</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>10</b>
I. Généralités .....	10
I.1. La molécule d'ADN .....	10
I.2. Particularités de l'ADN ancien.....	11
I.3. Les marqueurs moléculaires ou polymorphismes génétiques.....	13
II. Bref historique de la paléogénétique .....	14
III. Intérêts et limites de la paléogénétique .....	14
III.1. Intérêts de la paléogénétique .....	14
III.2. Limites de la paléogénétique .....	15
IV. Substrats biologiques en paléogénétique .....	15
<b>Chapitre 1 : Description embryologique, anatomique et histologique de la dent et de l'os pétreux</b> .....	<b>18</b>
I. Embryogenèse de la région céphalique .....	18
I.1. Rappel : la mise en place des trois feuilletts embryonnaires lors de la gastrulation .....	18
I.2. Développement embryonnaire bucco-dentaire .....	19
I.3. Développement embryonnaire de la capsule otique .....	23
I.3.1. Formation du chondrocrâne .....	23
I.3.2. Développement du labyrinthe osseux ou capsule otique .....	23
II. Description anatomique de la dent et de la capsule otique .....	26
II.1. Anatomie dentaire .....	26

II.1.1. Généralités .....	26
II.1.2. Morphologie dentaire .....	27
II.1.2.1. La couronne.....	27
II.1.2.2. La racine.....	27
II.1.2.3. Les cinq faces d'une dent.....	28
II.2. Anatomie de la capsule otique .....	29
II.2.1. Rappel historique de l'étude anatomique de l'os temporal.....	30
II.2.2. Anatomie de l'os temporal .....	31
II.2.2.1. L'écaille.....	33
II.2.2.2. L'os tympanal .....	33
II.2.2.3. Le rocher .....	34
II.2.2.3.1. Les faces du rocher.....	34
II.2.2.3.2. Les cavités du rocher .....	36
II.2.2.4. La capsule otique .....	36
II.2.2.4.1. Le labyrinthe postérieur .....	38
II.2.2.4.1.1. Le vestibule .....	38
II.2.2.4.1.2. Les canaux semi-circulaires.....	39
II.2.2.4.1.3. L'aqueduc du vestibule .....	40
II.2.2.4.2. Le labyrinthe antérieur.....	40
II.2.2.4.2.1. Le limaçon osseux .....	40
II.2.2.4.2.2. L'aqueduc du limaçon .....	41
III. Description histologique de la dent et de la capsule otique .....	42
III.1. Histologie des tissus dentaires.....	42
III.1.1. L'émail .....	42
III.1.2. La dentine .....	42
III.1.3. La pulpe .....	43
III.1.4. Le ciment.....	43

III.2. Histologie de l'os pétreux .....	44
III.2.1. Organisation des fibres de collagène .....	44
III.2.2. Organisation des couches osseuses .....	44
III.2.3. Remodelage au cours du temps .....	46
<b>Chapitre 2 : Matériels et méthodes .....</b>	<b>47</b>
I. Préparation des échantillons histologiques pour la microscopie optique.....	47
I. 1. Réalisation de coupes histologiques à partir d'un échantillon dentaire .....	47
I.1.1. Protocole appliqué par l'unité 1260 de l'INSERM .....	47
I.1.2. Protocole appliqué par le laboratoire d'histomorphométrie de l'IML .....	49
I. 2. Réalisation de coupes histologiques à partir d'un échantillon d'os pétreux.	52
II. Préparation des os pétreux et des dents et analyses de biologie moléculaire ..	53
II.1. Echantillons analysés.....	53
II.2. Prévention des contaminations .....	54
II.3. Sélection et préparation des échantillons.....	55
II.3.1. Sélection des échantillons dentaires.....	55
II.3.2. Préparation des échantillons.....	55
II.3.2.1. Les échantillons dentaires .....	55
II.3.2.2. Les échantillons d'os pétreux .....	57
II.4. Extraction de l'ADN .....	58
II.5. Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ....	59
II.5.1. Analyse de l'ADN nucléaire autosomal ou caractérisation de profils généétiques individuels .....	59
II.5.2. Analyse des produits amplifiés .....	59
<b>Chapitre 3 : Résultats.....</b>	<b>60</b>
I. Analyse histologique des dents .....	60
I.1. Analyse de la dent après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine.....	60
I.2. Analyse de la dent après coloration au rouge Sirius ou Picro-Sirius et observation à la lumière polarisée.....	61

II. Analyse histologique de l'os pétreux .....	64
II.1. Analyse de l'os pétreux après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine .....	64
II.2. Analyse de l'os pétreux après la coloration au rouge Sirius ou Picro-Sirius, puis observation à la lumière polarisée .....	64
III. Analyse des STR autosomaux par électrophorèse capillaire .....	69
III.1. Stratégie de l'étude à partir des marqueurs STR .....	69
III.2. Interprétation d'un profil génétique autosomal .....	70
III.3. Comparaison des profils STRa obtenus pour les paires os pétreux/dent issues d'un même individu .....	74
<b>Discussion et conclusion .....</b>	<b>75</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>79</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>81</b>

## Liste des figures

**Figure 1** : Structure de l'ADN

**Figure 2** : Dégradation post-mortem subies par la molécule d'ADN

**Figure 3** : Polymorphismes ponctuels de séquence et de longueur de l'ADN

**Figure 4** : Les trois feuillets embryonnaires

**Figure 5** : Développement des bourgeons faciaux

**Figure 6** : Développement d'une incisive

**Figure 7** : Développement embryologique détaillé de la partie cochléaire du labyrinthe osseux

**Figure 8** : Schéma de la denture temporaire

**Figure 9** : Schéma de la denture permanente

**Figure 10** : Schéma d'une section de molaire mandibulaire humaine et de ses structures de soutien

**Figure 11** : Exemple d'illustration des différentes faces d'une dent

**Figure 12** : Lithographie en couleur de CARB conservée dans la bibliothèque universitaire de Strasbourg

**Figure 13** : Rapports de l'os temporal

**Figure 14** : Constitution de l'os temporal

**Figure 15** : Vue latérale du tympanal et des trois parties de l'écaille horizontale

**Figure 16** : Face postéro-supérieure d'un rocher gauche

**Figure 17** : Face antéro-supérieure d'un rocher droit

**Figure 18** : Vue inférieure d'un rocher droit

**Figure 19** : Forme et situation du labyrinthe osseux

**Figure 20** : Projection du labyrinthe osseux droit sur la base interne du crâne

**Figure 21** : Schéma des labyrinthes osseux et membraneux

**Figure 22** : Labyrinthe osseux droit, vue antéro-latérale après ablation de de l'os environnant et labyrinthe osseux droit disséqué avec le labyrinthe membraneux ôté

**Figure 23** : Paroi externe du vestibule osseux

**Figure 24** : Les canaux semi-circulaires : orientations et dimensions

**Figure 25** : Orientation dans l'espace des canaux semi-circulaires

**Figure 26** : Constitution du limaçon

**Figure 27** : Organisation schématique des différentes couches osseuses au sein de l'os pétreux

**Figure 28** : Scie microtomique

**Figures 29a et 29b** : LMR®-SOL et Decalcifier II®

**Figure 30** : Coupe incluse dans de la paraffine

**Figure 31** : Microtome permettant de réaliser les coupes histologiques

**Figure 32** : De gauche à droite : vue vestibulaire et palatine avant et après découpe de la dent sélectionnée

**Figure 33** : Automate de déshydratation sous vide « Tissue Tek, VIP AI 6 »

**Figures 34a et 34b** : Station d'inclusion en paraffine « Tissue Tek III » et dent incluse en paraffine

**Figure 35** : Microtome « Jung Autocut »

**Figure 36** : Scie oscillante « Clean Cut »

**Figure 37** : Installation du cryobroyeur

**Figures 38a et 38b** : Irradiateur Bio-Link et tubes pour le cryobroyage

**Figure 39** : Cuve du cryobroyeur

**Figure 40** : Prélèvement de l'os pétreux à partir de la partie supérieure du crâne

**Figures 41a et 41b** : Fragment d'os pétreux avant et après abrasion

**Figure 42** : Obtention d'une poudre par forage de l'os pétreux

**Figures 43** : Appareils d'amplification et d'analyse

**Figure 44** : Coupe histologique d'une dent de sagesse mandibulaire (38), sectionnée selon un plan sagittal (coloration H/E)

**Figure 45** : Coupe histologique d'une dent de sagesse mandibulaire (38), sectionnée selon un plan sagittal (coloration PS + polarisation)

**Figure 46** : Coupe histologique de l'os pétreux au niveau d'un canal semi-circulaire, sectionné selon un plan sagittal (coloration H/E)

**Figure 47** : Coupe histologique de l'os pétreux au niveau d'un canal semi-circulaire, sectionné selon un plan sagittal (coloration PS + polarisation)

**Figure 48** : Coupe histologique d'un os cortical centrée sur un ostéon secondaire (coloration PS + polarisation)

**Figure 49** : Taille des allèles amplifiés par le kit GlobalFiler® pour chacun des loci STR

**Figure 50** : Exemple d'un profil génétique obtenu après amplification des marqueurs STR ciblés par le kit GlobalFiler®

**Figure 51** : Comparaison des amplifications obtenues à partir d'une dent et d'un os pétreux pour un même individu

**Figure 52** : Analyse de l'ensemble des marqueurs STRa

## **Liste des tableaux**

**Tableau 1** : Prélèvements effectués lors de l'étude

**Tableau 2** : Liste des échantillons

**Tableau 3** : Classement des marqueurs génétiques autosomaux par taille

## **Liste des annexes**

**Annexe 1** : Intensités RFU obtenues pour chaque marqueur STRa lorsque le substrat utilisé est une dent

**Annexe 2** : Intensités RFU obtenues pour chaque marqueur STRa lorsque le substrat utilisé est un os pétreux

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ADNa** : ADN ancien

**ADNmt** : ADN mitochondrial

**ADNnu** : ADN nucléaire

**DTT** : Dithiothréitol

**EC** : Couche Enchondrale

**EDTA** : Éthylènediaminetétraacétique ou Acide Éthylènediaminetétraacétique

**H/E** : Hématoxyline / Éosine

**IML** : Institut Médico-Légal

**INSERM** : Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale

**NGS** : Next-Generation Sequencing

**OE** : Couche Endostale

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**pb** : paire de bases

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**POL** : Couche Périostale Interne

**PS** : Picro-Sirius

**RFU** : Relative Fluorescence Units

**SNP** : Single-Nucleotide Polymorphism

**STR** : Short Tandem Repeat

**STRa** : Short Tandem Repeat Autosomaux

**UV** : Ultraviolet

# Introduction

Ce travail de thèse a été réalisé au sein d'une équipe de recherche qui s'attache à retracer l'histoire des populations humaines du passé grâce à l'étude de l'acide désoxyribonucléique (ADN) extrait de restes humains datant de plusieurs centaines à plusieurs milliers d'années. Ces études, dites d'ADN ancien ou de paléogénétique, reposent avant tout sur le substrat biologique utilisé comme source d'ADN d'où l'importance accordée au choix de ce substrat.

Dans cette introduction seront présentés les différentes notions élémentaires concernant la molécule d'ADN, les particularités de l'ADN ancien, ainsi que les marqueurs moléculaires utilisés lors d'identifications génétiques humaines. Les notions concernant la paléogénétique seront ensuite développées à travers un bref rappel historique permettant de mettre en évidence l'importance des substrats biologiques fréquemment retrouvés en contexte archéologique.

## I. Généralités

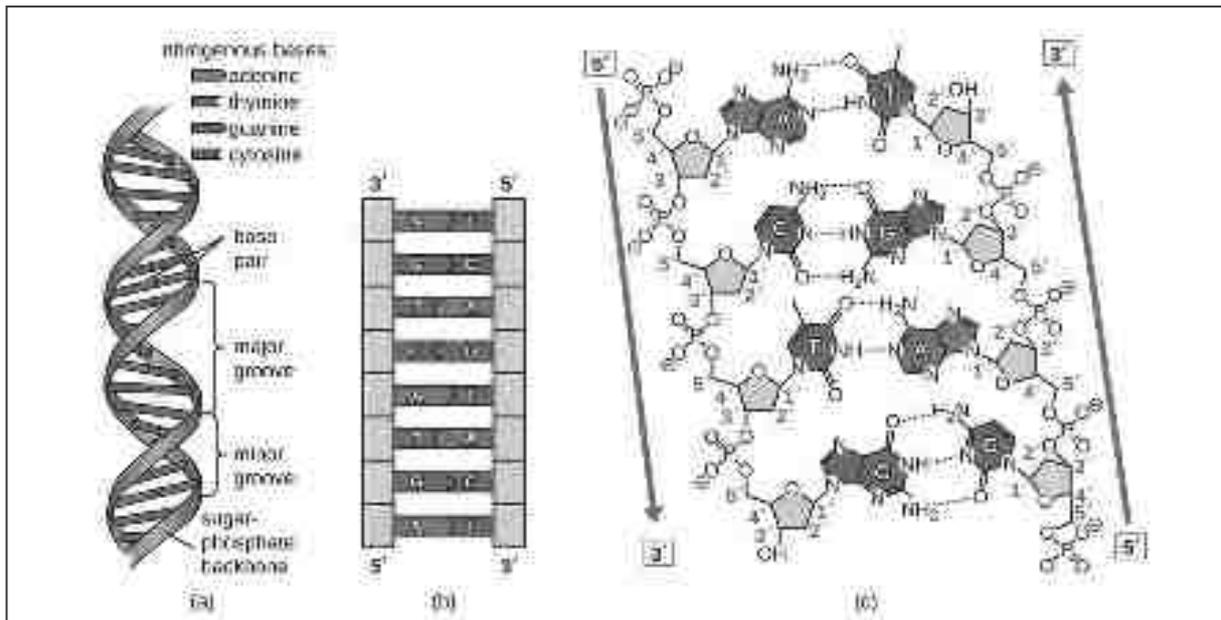
### I.1. La molécule d'ADN

L'ADN est une macromolécule support de l'information génétique chez tous les organismes vivants (à l'exception de quelques virus). Elle est formée de deux chaînes de polymères formant une structure en double hélice (1). Chaque brin est constitué de quatre nucléotides composés d'un groupe phosphate, d'un sucre et de l'une des quatre bases suivantes : Adénine, Thymine, Guanine ou Cytosine (A, T, G ou C). Ces bases s'associent entre elles de manière complémentaire, ainsi l'adénine est complémentaire de la thymine et la guanine de la cytosine. Les nombreuses liaisons phosphodiester 3'-5' confère à la molécule d'ADN une orientation de lecture de l'extrémité 5' phosphate vers l'extrémité 3' hydroxyle (Figure 1).

Chez l'Homme, deux types d'ADN coexistent au sein d'une cellule : l'ADN nucléaire (ADNnu) retrouvé dans le noyau des cellules (sauf pour les globules rouges) et présent sous forme de chromosomes (22 paires d'autosomes ou chromosomes homologues et une paire de chromosomes sexuels, XX pour les femmes et XY pour les hommes)

et l'ADN mitochondrial (ADNmt) présent dans les mitochondries du cytoplasme des cellules.

L'ADNnu présente une transmission biparentale excepté pour le chromosome Y. En effet, ce dernier est uniquement transmis de père en fils et permet l'étude des lignées paternelles. L'ADNmt présente une transmission exclusivement uniparentale de la mère aux enfants, ce qui permet l'étude des lignées maternelles.



**Figure 1 : Structure de l'ADN.**

a) Structure de la double hélice d'ADN découverte par Watson et Crick en 1953.

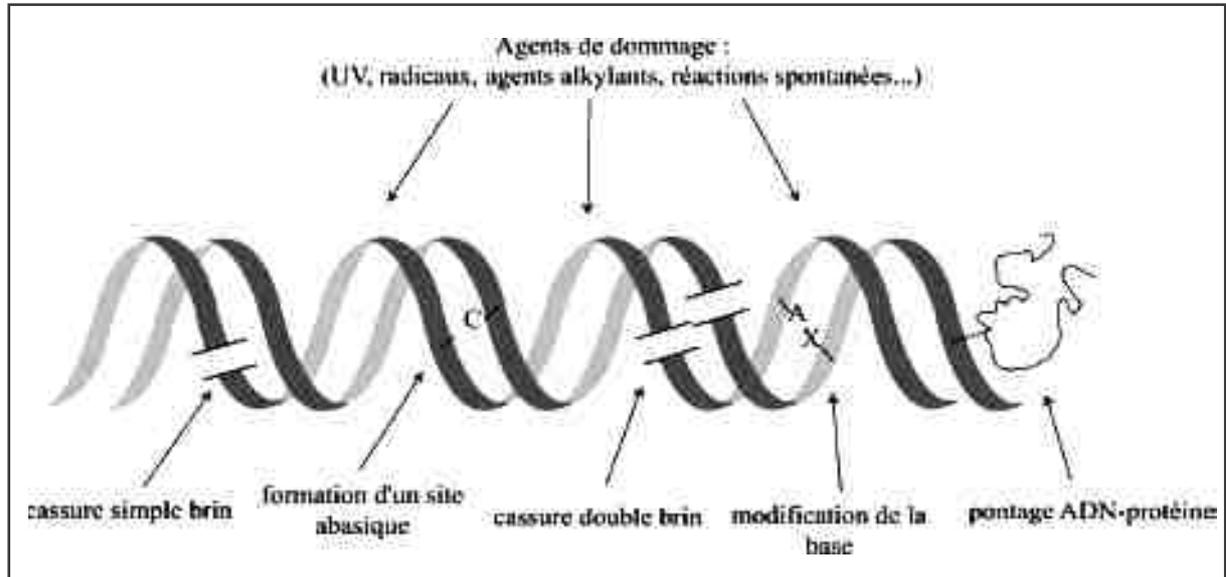
b) La stabilité de la double hélice résulte de l'association des deux chaînes polynucléotidiques liées par des liaisons hydrogène entre chaque paire de bases complémentaires.

c) Deux liaisons hydrogène relient l'Adénine (A) et la thymine (T), tandis que trois liaisons hydrogène relient la cytosine (C) et la Guanine (G).

## I.2. Particularités de l'ADN ancien

L'ADN ancien (ADNa) présente des caractéristiques spécifiques qui le distingue d'un ADN contemporain. En effet, dès la mort d'un organisme, les mécanismes cellulaires de réparation de l'ADN cessent immédiatement, et les cellules subissent rapidement une autolyse, par l'action d'endo- et d'exo-nucléases. En plus de ces dégradations enzymatiques rapides, des processus chimiques, plus lents, vont également contribuer à sa dégradation. Les phénomènes chimiques sont surtout des hydrolyses et/ou des oxydations qui pourront provoquer des coupures simples ou double brin d'ADN mais aussi la formation de bases modifiées ou de sites abasiques (2) (3) (4) (Figure 2).

D'autres phénomènes chimiques conduiront plutôt à la formation de liaisons intra- et/ou inter-moléculaires, produisant par exemple des complexes ADN-protéine (5).



**Figure 2 : Dégradations post-mortem subies par la molécule d'ADN.**  
D'après Jobling *et al.*, 2004. (6)

Au vu de ces multiples processus de dégradation post-mortem, l'étude de l'ADNa représente un véritable défi, la quantité et la qualité de l'ADN disponible se trouvant fortement diminuées.

Le choix du substrat d'analyse peut aussi impacter la réussite d'une étude d'ADNa. Si beaucoup de tissus cellulaires différents peuvent être source d'ADN (tissus mous, ongles, cheveux, os et dents), les dents et les os font parties des substrats privilégiés car ils peuvent être aisément soumis à des décontaminations de surface. En effet, l'ADNa présente un risque élevé d'être contaminé par des molécules d'ADN contemporain qui, n'étant ni fragmentées, ni dégradées, seront préférentiellement amplifiées lors de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Ce risque de contamination (par les personnes ayant accès aux échantillons anciens, le matériel utilisé ou encore les réactifs employés) est présent tout au long du processus analytique, ce qui implique des précautions rigoureuses à prendre tout au long du traitement des échantillons anciens. Plusieurs stratégies permettent néanmoins de minimiser ces risques de contamination (7) (8).



## **II. Bref historique de la paléogénétique**

L'histoire de la paléogénétique a commencé au milieu des années 1980 avec le clonage moléculaire par transformation bactérienne d'une séquence d'ADN issue d'un spécimen taxidermisé de quagga, une espèce d'équidé aujourd'hui éteinte (9). Cette étude a été suivie de peu par le clonage de la première séquence humaine ancienne issue du tissu mou d'une momie égyptienne de 2500 ans (10). Par la suite, les paléogénéticiens se sont détournés des tissus ayant subi des traitements conservateurs pour s'intéresser aux vestiges les plus représentés en contexte archéologique : les os et les dents. Dans le même temps, la technique d'amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) a été mise au point, permettant de cibler in vitro des fragments d'ADN et d'en obtenir plusieurs millions de copies (11). L'examen attentif des séquences anciennes amplifiées a néanmoins mis en évidence l'extrême sensibilité de la PCR aux contaminations par de l'ADN moderne exogène. Ainsi, de l'ADN extrait d'un dinosaure vieux de 80 millions d'années (12) s'est révélé être une séquence humaine.

Depuis, des avancées spectaculaires ont été réalisées, notamment ces dernières années grâce au développement des systèmes de séquençage haut débit. Ces systèmes permettent l'analyse simultanée de milliards de séquences présentes sur la totalité des molécules d'ADN anciennes voire l'analyse de génomes complets (d'où l'émergence du terme paléogénomique en remplacement de paléogénétique). Ces nouvelles technologies de séquençage (NGS) ont également permis de reculer les limites du temps puisque les plus anciennes séquences génomiques caractérisées à ce jour (celles d'un cheval ancestral) datent de 700 000 ans.

## **III. Intérêts et limites de la paléogénétique**

### **III.1. Intérêts de la paléogénétique**

Nombreuses sont les applications de la paléogénétique, qui permet notamment de définir la position phylogénétique d'espèces aujourd'hui disparues, de répondre à des questions concernant l'évolution de l'humanité, de retracer les voies empruntées lors des vastes migrations humaines préhistoriques, d'évaluer les conditions d'hygiène des populations du passé, de suivre l'émergence de nouvelles pathologies ou la survenue

de grandes épidémies ou encore d'évaluer l'impact de grandes transformations comme celle de la Néolithisation.

### **III.2. Limites de la paléogénétique**

Les travaux concernant l'ADN ancien sont particulièrement délicats, leur réussite dépendant de nombreux éléments. Les conditions taphonomiques, comprenant toutes les altérations physiques, biologiques et chimiques subies par les squelettes, ainsi que les conditions environnementales, sont des facteurs clefs dans la préservation à long terme de l'ADN ancien. En effet, certains environnements sont plus favorables que d'autres à la préservation de l'ADN, celui-ci persistant bien mieux dans les climats froids notamment (13) (14).

De plus, les risques de contamination sont particulièrement importants lorsque les études portent sur l'espèce humaine (15), nécessitant l'adoption de règles de travail très strictes dès le prélèvement des échantillons ainsi que le respect de plusieurs critères d'authenticité. Il est donc primordial de sélectionner avec soin les échantillons de tissus post-mortem à analyser, non seulement afin de maximiser la proportion d'ADN endogène présente mais aussi pour minimiser tout risque de contamination.

### **IV. Substrats biologiques en paléogénétique**

Tous les vestiges humains ne sont pas source de matériel génétique et, s'il est possible d'extraire de l'ADN à partir de tissus mous momifiés, l'essentiel des analyses paléogénétiques ont, jusque récemment, porté sur des tissus durs tels que les os et les dents (16). Ces restes représentent un microenvironnement particulièrement favorable à la conservation de l'ADN grâce à l'adsorption des acides nucléiques sur une matrice minérale, l'hydroxyapatite (17) (18) (19) (20). Concernant les os, une large préférence a souvent été accordée aux os longs tels les tibias et les fémurs dont la corticale, relativement dense permet un rendement d'extraction supérieur à l'os spongieux. Les dents représentent quant à elles un substrat d'analyse optimal du fait des faibles possibilités de contamination de la pulpe dentaire par de l'ADN exogène et de l'absence de certains inhibiteurs retrouvés dans d'autres fossiles. Elles ont pour ces raisons été qualifiées de « coffre-fort de l'ADN ancien » (21).

Pourtant, en 2014, Gamba et son équipe (22) ont mis en évidence que la partie pétreuse de l'os temporal pourrait être un substrat encore plus intéressant que les dents ou les os. En effet, dans leur étude, ces auteurs ont montré que le taux d'ADN endogène obtenu à partir de d'os pétreux est 4 à 16 fois supérieur à celui obtenu à partir d'éléments dentaires et jusqu'à 183 fois supérieur à celui obtenu à partir d'autres éléments osseux (côtes, os métacarpiens ou métatarsiens). L'année suivante, Pinhasi et son équipe ont affirmé que c'est la partie la plus dense de l'os pétreux, correspondant à la capsule otique, qui permet d'obtenir le taux d'ADN endogène le plus intéressant (23). L'os pétreux a ainsi pris une place de choix pour l'analyse de l'ADN ancien grâce aux travaux menés notamment par Zupanič Pajnič et son équipe (24) qui, en s'intéressant à des restes squelettiques datant de la seconde guerre mondiale ont utilisé l'os pétreux pour confirmer des résultats obtenus à partir de prélèvements dentaires. Depuis, plusieurs équipes ont commencé à s'intéresser plus sérieusement à cette partie squelettique, si bien que récemment, l'équipe de Sirak (25) a décrit une méthode moins destructive permettant de prélever de l'os pétreux tout en préservant la structure crâniale, permettant de généraliser le recours à ce substrat. La même année, Haber et son équipe (26) ont basé leurs analyses exclusivement sur l'os pétreux pour séquencer le génome d'individus datant de l'âge du Bronze. Plus récemment, Pilli et son équipe (27) ont comparé trois éléments squelettiques (fémur, dent et os pétreux) provenant du même individu et démontré que l'os pétreux est le meilleur élément squelettique en matière de quantité et de préservation de l'ADN, tant ancien que récent.

Enfin, en janvier 2018, Margaryan et ses collaborateurs (28) ont qualifié l'os pétreux de « most desired skeletal element in ancient DNA research due to its high endogenous DNA content ».

Dans ce travail de recherche, nous essayerons de comprendre cet engouement pour l'os pétreux mais surtout nous tenterons de mettre en lumière les caractéristiques qui le rendent si particulier en matière de préservation de l'ADN ancien comparativement au substrat dentaire. Pour mener à bien cette étude, nous établirons une description de ces deux substrats à partir de leurs données embryologiques, anatomiques, histologiques, ainsi qu'à partir d'éléments expérimentaux provenant de l'analyse d'échantillons anciens (os pétreux et dents) de l'équipe d'Anthropologie Moléculaire

de l'Institut de Médecine Légale (IML) de Strasbourg. L'unité 1260 de l'INSERM (Faculté de médecine de Strasbourg) ainsi que le laboratoire d'histomorphométrie de l'IML nous permettront de compléter certains éléments histologiques. Grâce à l'ensemble de ces données, nous discuterons les résultats obtenus et tenterons d'apporter une réponse aux questions suivantes : l'os pétreux est-il systématiquement la source d'ADN la plus intéressante ? Est-il susceptible de représenter le substrat optimal en paléogénétique ?

# **Chapitre 1 : Description embryologique, anatomique et histologique de la dent et de l'os pétreux**

Au cours de ce chapitre dédié à la description embryologique, anatomique et histologique de la dent et de l'os pétreux, les caractéristiques propres à chacun de ces substrats biologiques seront développées, ce qui nous permettra de mieux comprendre ce qui rend si particulier l'os pétreux, et plus précisément la capsule otique.

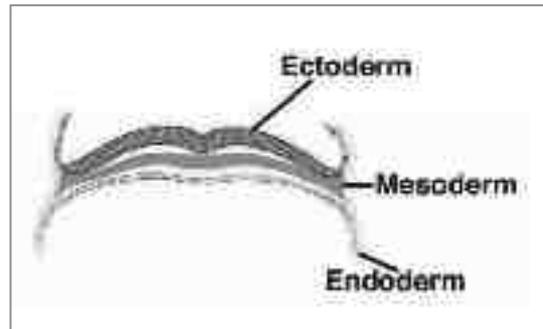
## **I. Embryogenèse de la région céphalique**

Dans cette partie, nous nous attacherons à décrire principalement le développement embryologique de la région céphalique commune aux dents et à la capsule otique. En effet, le développement de ces deux structures se réalise à partir des feuillettes du mésoderme et de l'ectoderme.

### **I.1. Rappel : la mise en place des trois feuillettes embryonnaires lors de la gastrulation**

Au cours de la troisième semaine du développement embryonnaire, les cellules s'organisent en trois feuillettes bien distincts : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme (Figure 4) (29). C'est à partir de ces trois feuillettes embryonnaires que vont se constituer tous les organes et les systèmes fonctionnels du corps humain.

- L'endoderme (intestin primitif) est à l'origine de la muqueuse, des glandes, de l'appareil respiratoire et du tube digestif incluant la vessie.
- Le mésoderme (ou mésenchyme) est le feuillette intermédiaire qui se différencie en deux structures : le mésoblaste, qui présente des potentialités multiples (notamment ostéogène et myogène), et la corde, qui est à l'origine du squelette axial primitif.
- L'ectoderme est lui à l'origine des couches externes (épiderme, muqueuses, émail dentaire), mais également du système nerveux et sensoriel (placodes sensorielles, oreille interne, cristallin de l'œil).



**Figure 4 : Les trois feuillets embryonnaires.**

Les trois feuillets embryonnaires au cours de la 3<sup>ème</sup> semaine du développement embryonnaire. D'après Morneau Bruno, La gastrulation, Structure multi-couches, 2016. (30)

## I.2. Développement embryonnaire bucco-dentaire

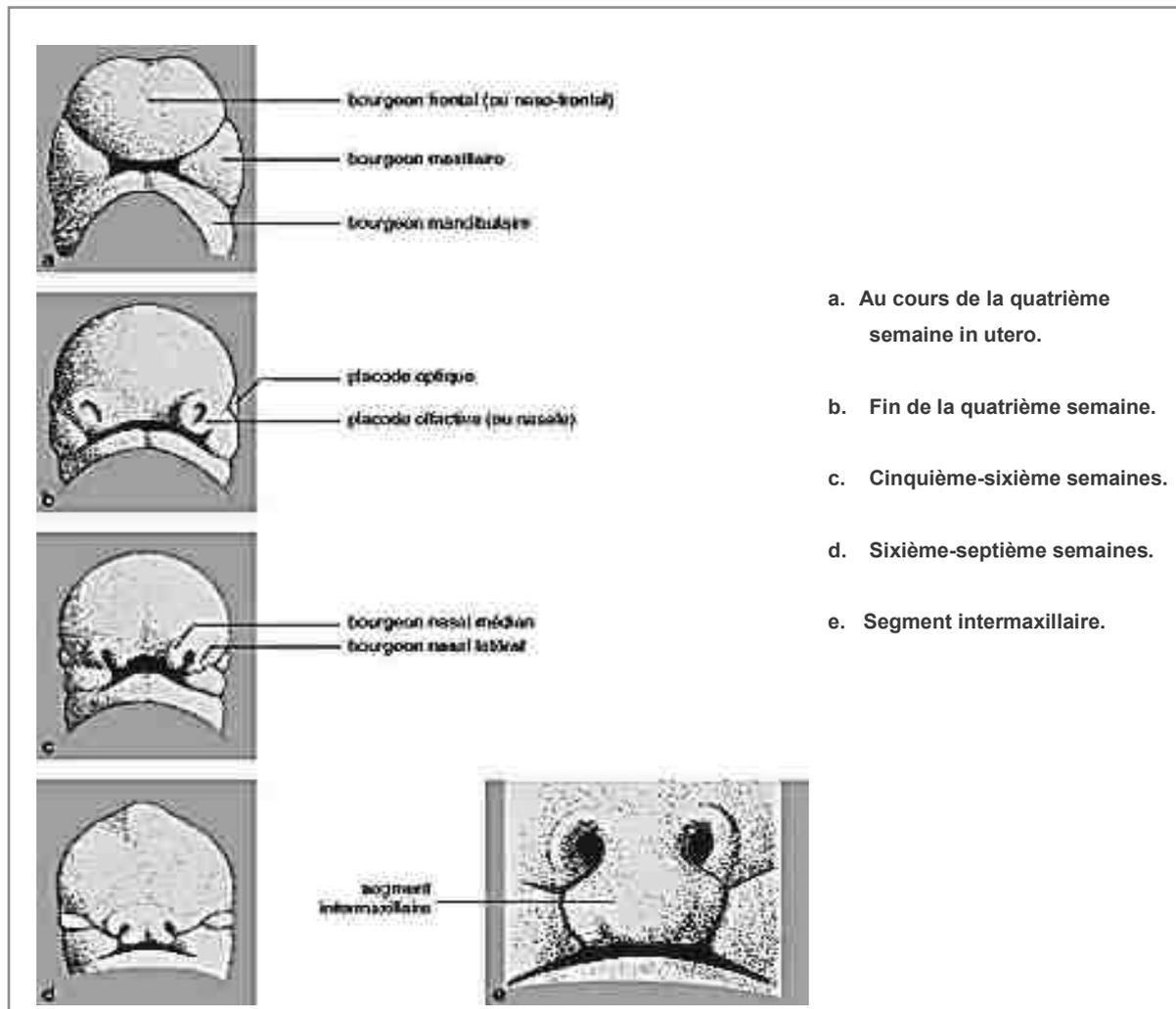
Dans la région céphalique, le mésoderme constituera les bourgeons faciaux en partant vers l'avant et en progressant vers le bas. A partir de la quatrième semaine *in utero*, les bourgeons faciaux (Figure 5) qui sont au nombre de cinq vont s'organiser autour du stomodeum (ou bouche primitive) de la manière suivante :

- Le bourgeon frontal : le plus volumineux, impair et médian, forme le plafond du stomodeum. Sa face inférieure porte les deux placodes olfactives.
- Les deux bourgeons maxillaires : ils forment les berges latérales du stomodeum et sont à l'origine des portions latérales des lèvres supérieures.
- Les deux bourgeons mandibulaires : ils confluent sur la ligne médiane pour former le plancher du stomodeum ou lèvre inférieure.

Puis, au cours de la quatrième semaine *in utero*, les bourgeons faciaux, à l'exception du bourgeon frontal, s'organisent et participent à la formation des étages moyen et inférieur de la face et d'une partie du cou. Entre les sixième et septième semaines, les bourgeons maxillaires, par l'intermédiaire des bourgeons nasaux médians, fusionnent sur la ligne médiane, formant ainsi le segment intermaxillaire qui sera à l'origine du philtrum de la lèvre supérieure, des quatre incisives supérieures et du palais primaire, c'est-à-dire la portion du palais en avant du foramen incisif.

En arrière du foramen incisif, le palais est dit secondaire et se forme plus tardivement, entre les huitième et douzième semaines *in utero*. Les processus palatins, excroissance des bourgeons maxillaires, vont fusionner au niveau du raphé palatin médian. L'ensemble constitué par le palais primaire et le palais secondaire forme le

palais osseux définitif et permet la séparation du stomodeum en fosses nasales (au-dessus) et cavité buccale (en-dessous).



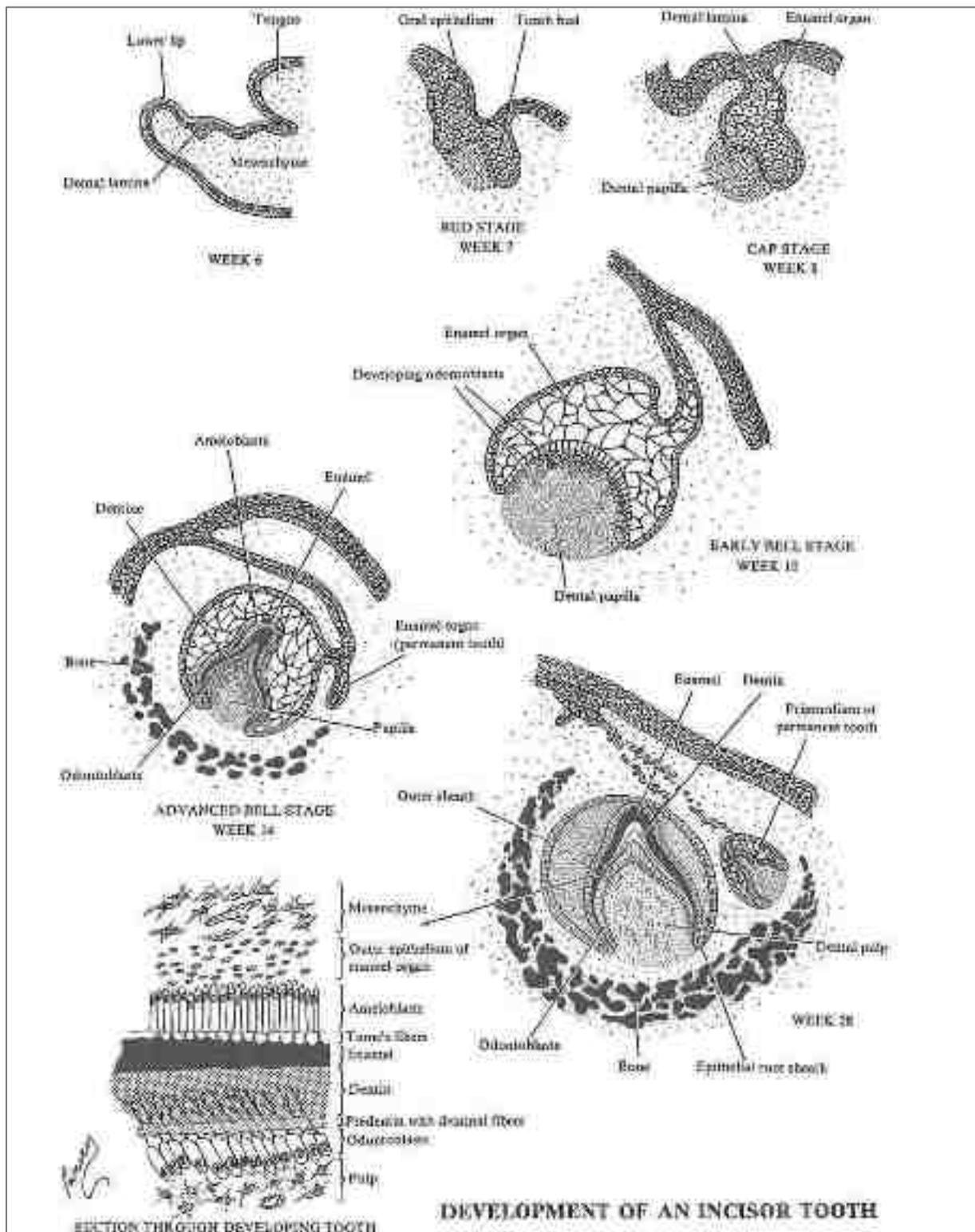
**Figure 5 : Développement des bourgeons faciaux.**

D'après le Collège hospitalo-universitaire français de chirurgie maxillo-faciale et stomatologie, 2011. (31)

Vers le deuxième mois (Figure 6), des épaissements se forment au niveau du revêtement épithélial du stomodeum pour s'enfoncer dans le mésenchyme sous-jacent et former la lame primitive, puis par prolongement à partir de la sixième semaine de développement, la lame dentaire. Cette structure épithéliale va prendre la forme d'une cupule, puis d'une cloche afin de donner l'émail. Sous la couche épithéliale, le mésenchyme, en se condensant, donnera la dentine, la pulpe ainsi que la racine dentaire. Rappelons que chez l'homme, deux séries de dents se succèdent et que le développement de la couronne est antérieur à celui de la racine. Les deux dentures se développent de la même manière mais pas simultanément. Les bourgeons

correspondant aux futures dents déciduales se forment au cours de la huitième semaine, tandis que ceux des futures dents permanentes se forment à partir de la lame dentaire à partir de la dixième semaine de développement *in utero*. Les dents déciduales font leur éruption à travers la muqueuse orale, qui devient alors la gencive, entre les sixième et trente-neuvième mois postnataux. Les bourgeons des dents permanentes vont encore se développer entre l'âge de 4 et 21 ans pour faire leur éruption entre 6 et 25 ans.

Pour conclure, on peut noter ici que les dents possèdent une double origine, à la fois épithéliale et mésenchymateuse. De plus, leur apparition s'étale dans le temps et dans l'espace.



**Figure 6 : Développement d'une incisive.**

D'après Pansky Ben, Review of Medical Embryologie, Macmillan USA, 1982. (32)

### I.3. Développement embryonnaire de la capsule otique

Le développement de la capsule otique va être abordé en deux points. Le premier, plus général, concernera la formation du chondrocrâne qui en s'ossifiant est à l'origine des capsules auditives, et le deuxième, plus précis, concernera exclusivement le développement du labyrinthe osseux ou capsule otique.

#### I.3.1. Formation du chondrocrâne

Le mésoderme de l'extrémité céphalique, décrit précédemment, se condense autour de la corde pour former la plaque basilaire (29). Celle-ci se transforme progressivement en cartilage et émet des prolongements vers les ébauches des organes des sens. Ces prolongements cartilagineux constituent les capsules périsensorielles olfactives, optiques et auditives. Vers le deuxième mois, cet ensemble réalise le stade de chondrocrâne. En s'ossifiant, ce chondrocrâne est à l'origine de nombreuses structures crânielles, dont l'os pétreux et le labyrinthe osseux. En résumé, on considère le chondrocrâne comme une étape intermédiaire entre le mésoderme et certains os dits alors d'origine enchondrale.

#### I.3.2. Développement du labyrinthe osseux ou capsule otique

Le mésenchyme entourant le labyrinthe membraneux, ensemble de cavités à parois membraneuses contenues dans le labyrinthe osseux, se différencie dès la sixième semaine en une couche profonde, ébauche des espaces péri-lymphatiques et de leur contenu, et une couche superficielle, ébauche du modèle cartilagineux (33) (34). Ce modèle cartilagineux apparaît vers la huitième semaine et sa transformation osseuse se réalise progressivement en dehors de quelques zones qui resteront cartilagineuses (29). Le développement osseux primitif est presque terminé au sixième mois intra-utérin, on observe alors trois couches distinctes :

- Une couche interne ou os endostal, fine couche d'os de type périchondral tapissant uniformément la surface interne du labyrinthe osseux.
- Une couche externe ou os périostal, de même nature et qui va donner naissance à l'os pétreux proprement dit.

- Une couche moyenne d'origine cartilagineuse, qui se forme grâce à des bourgeons vasculaires qui amènent les ostéoblastes à l'intérieur du cartilage et qui vont s'ossifier directement (os primitif = os intrachondral).

Après le sixième mois intra-utérin, un os de remplacement apparaît progressivement à la surface de l'os intrachondral qui persistera par îlots jusqu'à l'âge adulte. C'est l'ossification enchondrale qui s'arrête à la dernière semaine du terme. Après celui-ci, aucune modification ne survient. On peut ainsi remarquer que la capsule otique est une structure particulière possédant une constitution unique dans l'organisme liée à sa double origine embryologique, endochondrale et intrachondrale. Cette double origine explique l'absence de pouvoir régénérateur après fracture de la capsule otique. En effet, elle ne fabrique pas de cal osseux car l'ossification endochondrale liée à un mécanisme avant l'âge adulte maintient l'os intrachondrale dans son état d'os primitif malgré le processus d'ossification endochondrale.

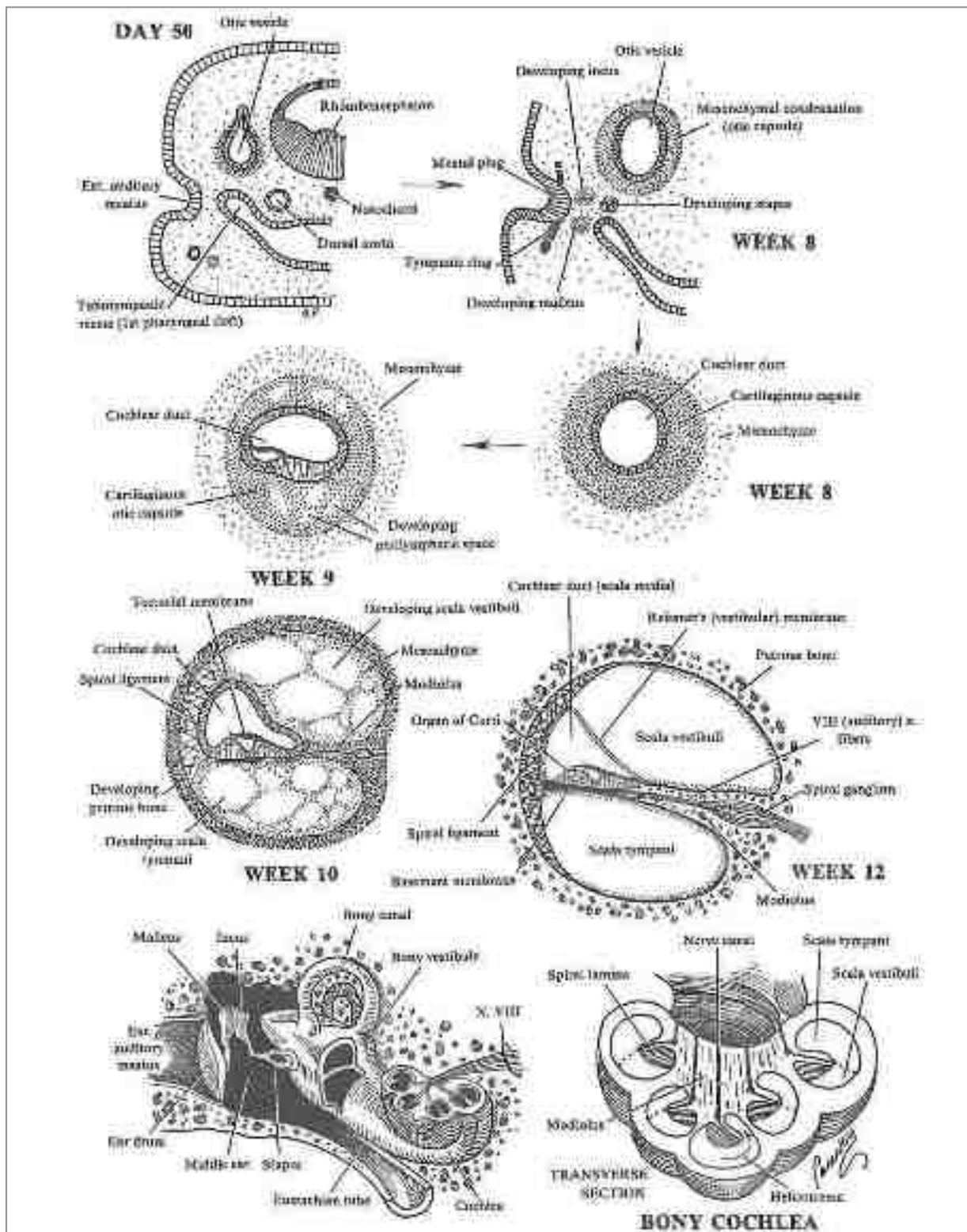


Figure 7 : Développement embryologique détaillée de la partie cochléaire du labyrinthe osseux. D'après Pansky Ben, Review of Medical Embryologie, Macmillan USA, 1982. (32)

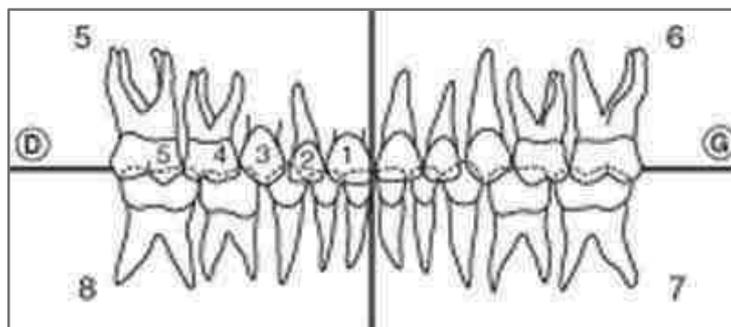
## II. Description anatomique de la dent et de la capsule otique

Après avoir décrit le développement bucco-dentaire ainsi que celui de la capsule otique, les deux substrats les plus intéressants pour l'étude consacrée à l'analyse moléculaire de restes anciens, nous allons nous appliquer à les décrire sur le plan anatomique.

### II.1. Anatomie dentaire

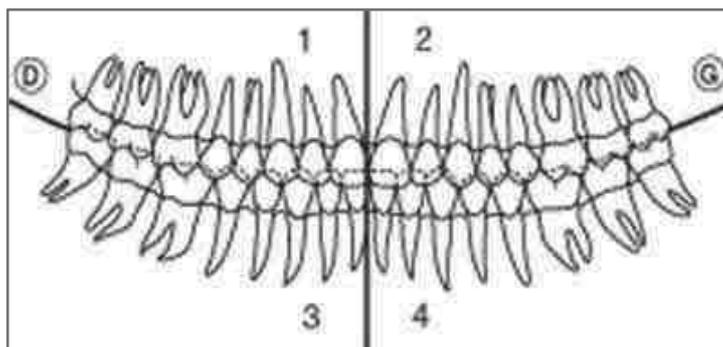
#### II.1.1. Généralités

Les dents sont des organes appartenant à l'appareil digestif, elles se situent dans la cavité orale et possèdent de nombreux rôles : elles se destinent principalement à la mastication mais participent également à la phonation et à la déglutition, de plus elles ont un rôle esthétique indiscutable chez l'Homme. La denture correspond à l'ensemble des dents de la cavité orale. Chez l'Homme, on constate la présence de deux dentures se faisant suite : la denture déciduale chez l'enfant puis la denture permanente ou définitive. La denture déciduale comprend vingt dents soit deux incisives, une canine et deux molaires par hémi-arcade (Figure 8). Quant à la denture permanente, elle comprend trente-deux dents, soit deux incisives, une canine, deux prémolaires et trois molaires par hémi-arcade (Figure 9). L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a établi une nomenclature internationale chiffrée permettant de situer chaque dent et composée de deux chiffres arabes, le premier désignant l'hémi-arcade dentaire et le deuxième la situation de la dent sur l'hémi-arcade.



**Figure 8 : Schéma de la denture temporaire.**

D'après le Collège hospitalo-universitaire français de chirurgie maxillo-faciale et stomatologie, 2011. (31)



**Figure 9 : Schéma de la denture permanente.**

D'après le Collège hospitalo-universitaire français de chirurgie maxillo-faciale et stomatologie, 2011. (31)

## II.1.2. Morphologie dentaire

Chaque dent est paire, asymétrique à l'examen minutieux et présente deux parties, la couronne et la racine (Figure 7), ainsi que cinq faces.

### II.1.2.1. La couronne

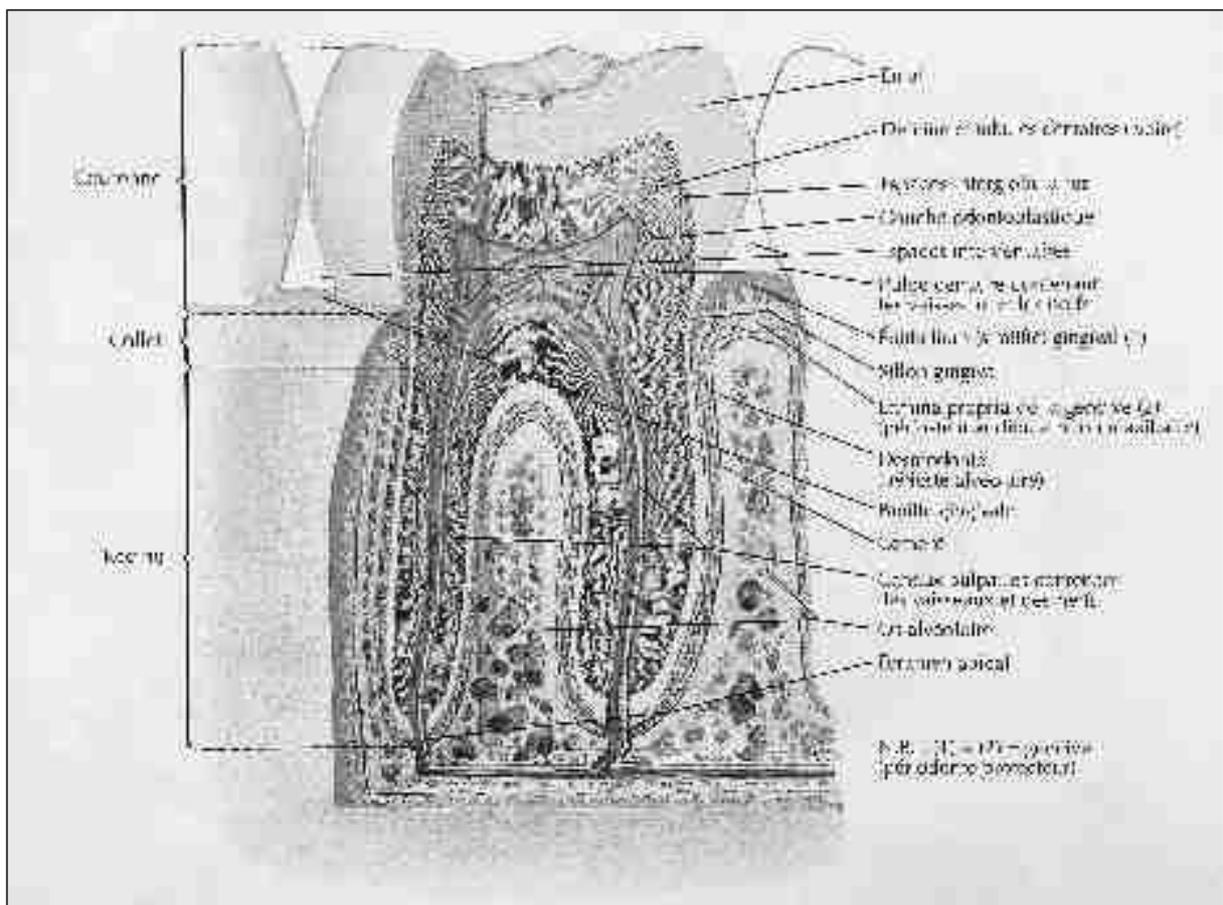
La couronne correspond à la partie de la dent exposée en bouche. On peut décrire trois couches distinctes. L'émail correspond à la couche la plus externe tandis que la couche intermédiaire est composée de dentine. Au centre de la couronne se trouve la chambre pulpaire (ou pulpe camérale), prolongement du canal pulpaire, qui constitue la couche la plus profonde et permet l'innervation et la vascularisation de la dent. On retrouve une zone de transition entre la couronne et la racine nommée le collet.

### II.1.2.2. La racine

Une dent peut présenter une à plusieurs racines et celles-ci sont également constituées de trois couches. La première couche correspond au cément qui recouvre la surface externe des racines tandis que, comme au niveau de la couronne, la couche intermédiaire est constituée de dentine. Au centre de la racine se trouve le canal pulpaire, assurant l'innervation et la vascularisation en provenance des apex. Les racines sont ancrées dans l'os alvéolaire des os maxillaires (maxillaire et mandibule) par les différents éléments du parodonte (gencive, desmodonte ou ligament alvéolo-dentaire, cément et os alvéolaire) (Figure 10).

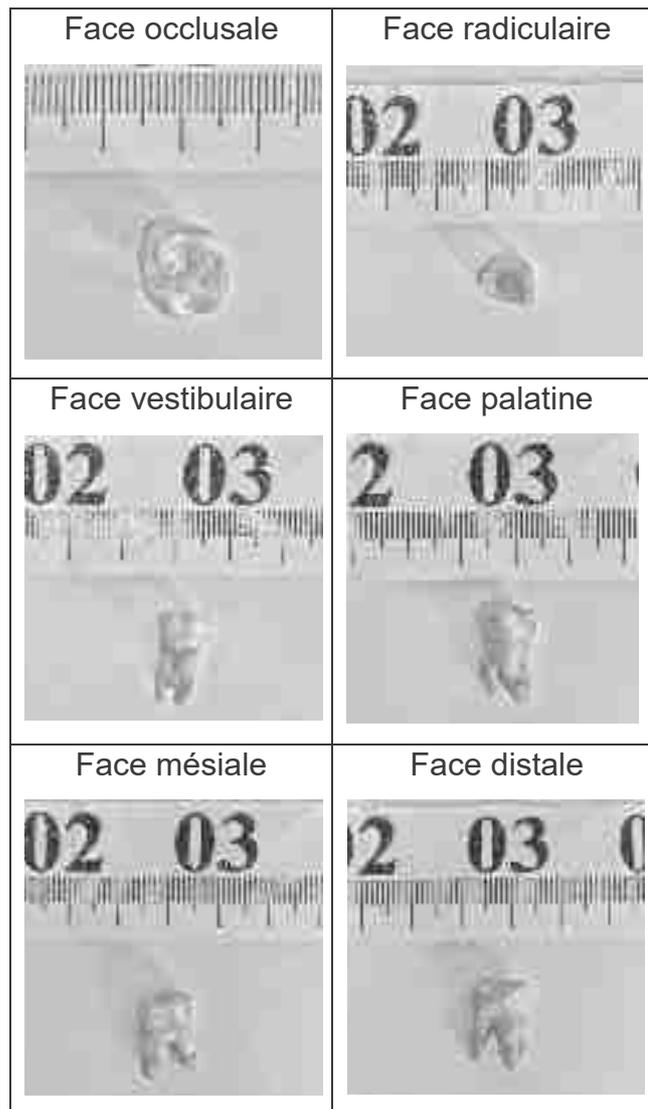
### II.1.2.3. Les cinq faces d'une dent

Chaque dent présente cinq faces (Figure 11). Deux correspondent aux faces de contact, avec une face mésiale regardant vers la ligne médiane de l'arcade ainsi qu'une face distale regardant vers l'extrémité de l'arcade. La face vestibulaire correspond à celle en contact avec les lèvres ou les joues tandis que la face palatine (ou linguale) est en regard du palais (ou de la langue). La dernière, la face occlusale, regarde l'arcade dentaire opposée. La figure 11 représente en plus une photographie d'une « face radiculaire », permettant la documentation de l'état des racines dans le cadre de nos travaux.



**Figure 10 : Schéma d'une section de molaire mandibulaire humaine et de ses structures de soutien.**

D'après Franck H. Netter, Atlas d'anatomie humaine, 5<sup>ème</sup> édition, 2011, p57. (35)



**Figure 11 : Exemple d'illustration des différentes faces d'une dent.**

Cette dent correspond à une seconde molaire maxillaire gauche (ou 26) provenant d'un scellé de l'Institut de Médecine Légale de Strasbourg.

## II.2. Anatomie de la capsule otique

La capsule otique (ou labyrinthe osseux) correspond à un ensemble de cavités situées dans le rocher (ou partie pétreuse) de l'os temporal et contenant l'ensemble des structures de l'oreille interne constituées par l'organe de l'équilibre ainsi que celui de l'audition. C'est une structure particulièrement complexe et avant de s'intéresser à l'anatomie de la capsule otique en elle-même, nous allons brièvement décrire l'os temporal ainsi que le rocher.

### II.2.1. Rappel historique de l'étude anatomique de l'os temporal

L'anatomie de l'os temporal est réputée une des plus complexes de tous les os du corps humain. Ce n'est donc qu'en 1924 qu'un professeur d'anatomie, Philippe BELLOCQ (1888-1962), ancien directeur de l'Institut d'Anatomie Normale de la Faculté de Médecine de Strasbourg (Figure 12), s'intéresse à sa complexité dans un ouvrage fondamental intitulé « la monographie sur l'os temporal chez l'adulte : iconographie et description de l'os et de ses cavités. Strasbourg, Les éditions de Strasbourg-Médical, 1924, 127 pages ».

Plus récemment, en 2013, le professeur Francis VEILLON, chef du service de radiologie à l'hôpital de Hautepierre de Strasbourg, dirige une équipe d'experts internationaux afin de publier un ouvrage en six volumes consacré exclusivement à l'imagerie de l'oreille et de l'os temporal (34).

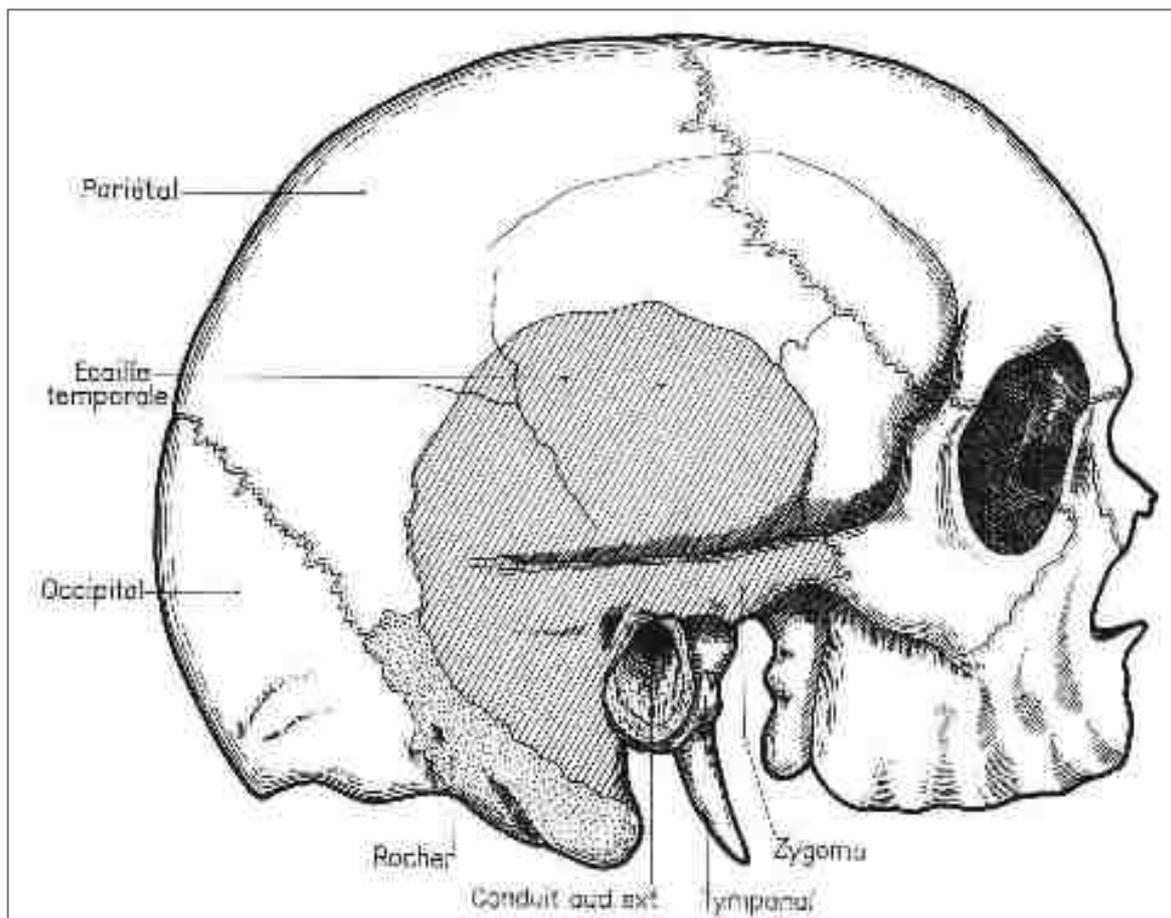


**Figure 12 : Lithographie en couleur de CARB conservée dans la bibliothèque universitaire de Strasbourg.**

Quelques Professeurs de la Faculté de Médecine de Strasbourg.  
Librairie de la Mésange Strasbourg Lithographie couleurs T.B.E. A - salissures 100 x 65 cm. Le professeur Philippe BELLOCQ est le deuxième en partant de la droite (petit encadré).

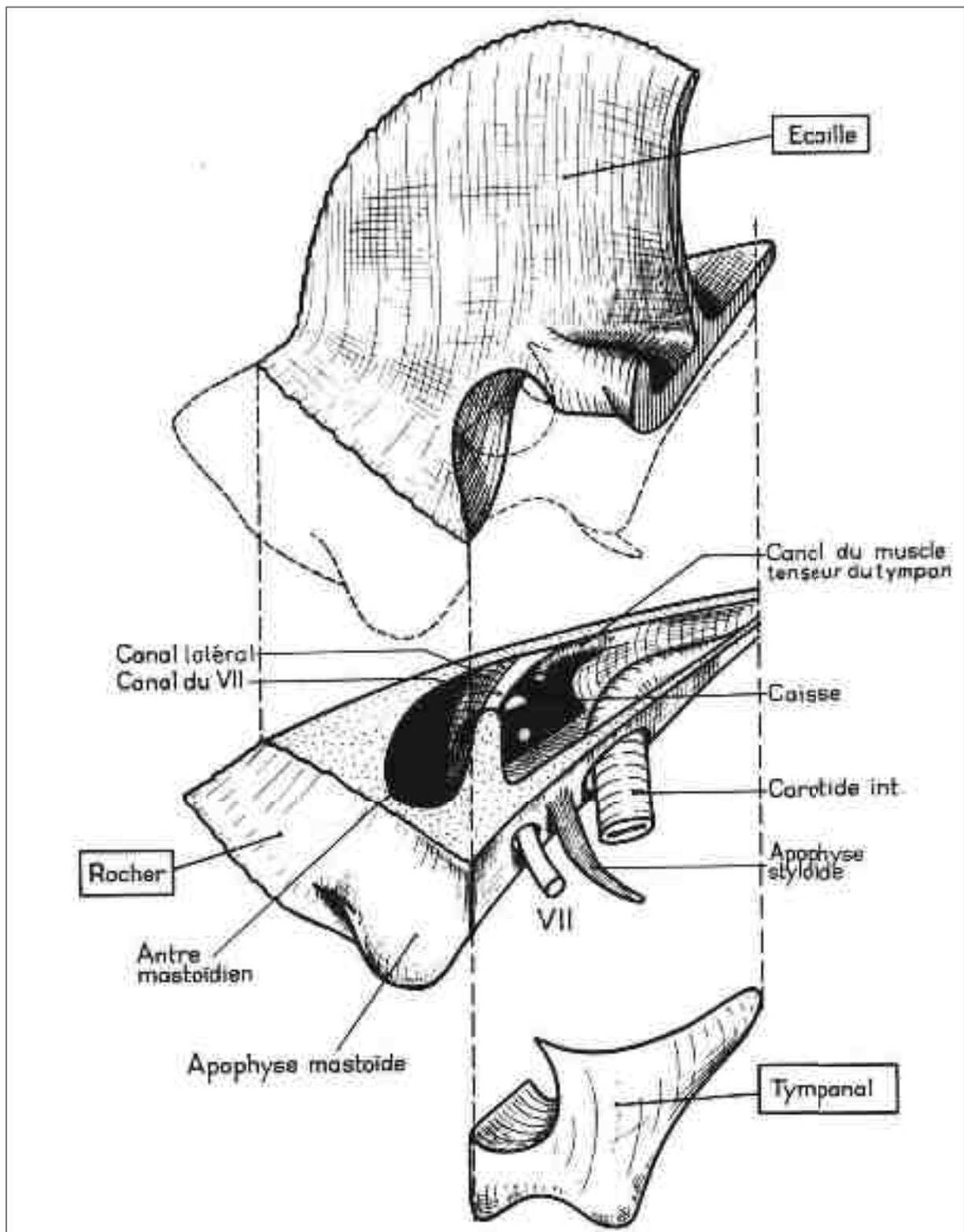
### III.2.2. Anatomie de l'os temporal

L'os temporal tient son nom de son appartenance à la région de la tempe (située dans la partie inférieure et latérale du crâne), du latin *tempus-temporis*, qui signifie « le temps » car c'est à ce niveau que le temps se marque par l'apparition des premiers cheveux blancs. Cet os pair, localisé en arrière du sphénoïde, en avant et en dehors de l'occipital et au-dessous du pariétal, participe à la formation de la cavité crânienne, de la fosse temporale et de la face inférieure de la base du crâne. Il s'articule avec cinq autres os : l'occipital, le pariétal, le sphénoïde, la mandibule et le zygomatique. Il offre un point d'appui à la mandibule, ceinture en dehors la fosse temporale par son processus zygomatique et surtout, il renferme les organes de l'équilibration et de l'audition (Figure 13) (36). L'os temporal est composé de trois parties : l'écaïlle ou partie squameuse, l'os tympanal ou partie tympanique et le rocher ou partie pétreuse (Figure 14) (33).



**Figure 13 : Rapports de l'os temporal.**

D'après Legent F, Perlemuter L, Vandembrouck C. Cahiers d'anatomie O. R. L., 2<sup>ème</sup> édition. 1968 – 1975 Masson et Compagnie, Editeurs, Paris. N° d'impression : 966-74. ISBN : 2.225-41393-2. (29)



**Figure 14 : Constitution de l'os temporal.**

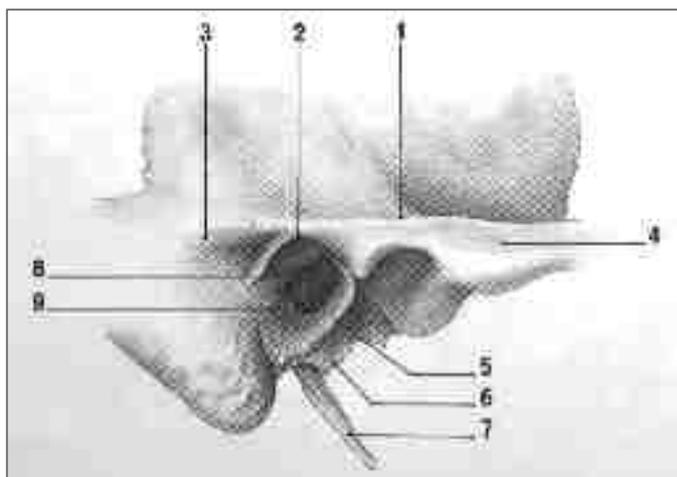
D'après Legent F, Perlemuter L, Vandenbrouck C. Cahiers d'anatomie O. R. L., 2<sup>ème</sup> édition. 1968 – 1975 Masson et Compagnie, Editeurs, Paris. N° d'impression : 966-74. ISBN : 2.225-41393-2. (29)

### II.2.2.1. L'écaille

Le premier élément correspond à une partie verticale qui est une lame osseuse participant à la formation de la voûte crânienne et s'articulant avec l'os sphénoïdal à l'avant et l'os pariétal à l'arrière. Le deuxième élément correspond à une partie horizontale comprenant une portion antérieure « préméatique » (formant le toit de l'articulation temporo-mandibulaire), une portion « sus-méatique » (constituant le toit du méat acoustique externe) et une portion « rétroméatique » orientée horizontalement (33). Le dernier élément correspond à une partie verticale contenant également une portion « rétroméatique » contribuant à la formation de la paroi postérieure du méat acoustique externe.

### II.2.2.2. L'os tympanal

L'os tympanal se présente chez l'adulte sous la forme d'une gouttière prolongée vers le bas par un éperon osseux correspondant au processus vaginal, en avant du processus styloïde (Figure 15) (33). C'est donc un trois quarts de cylindre ouvert vers le haut et l'arrière auquel on décrit deux versants. Un premier versant antérieur, mince et fragile, forme la paroi antérieure du méat acoustique externe ; tandis que le second versant, postérieur, forme la partie inférieure de la paroi postérieure de ce même méat.



1. Ecaille horizontale préméatique
2. Ecaille horizontale sus-méatique
3. Ecaille horizontale rétroméatique
4. Processus zygomatique
5. Paroi antérieure de l'os tympanal
6. Processus vaginal de l'os tympanal
7. Processus styloïde
8. Ecaille rétroméatique verticale
9. Paroi postérieure de l'os tympanal

**Figure 15 : Vue latérale du tympanal et des trois parties de l'écaille horizontale.**

D'après Veillon F. Imagerie de l'oreille. Flammarion Médecine-Sciences. 1991. 483 p. ISBN : 2-257-15520-3. (33)

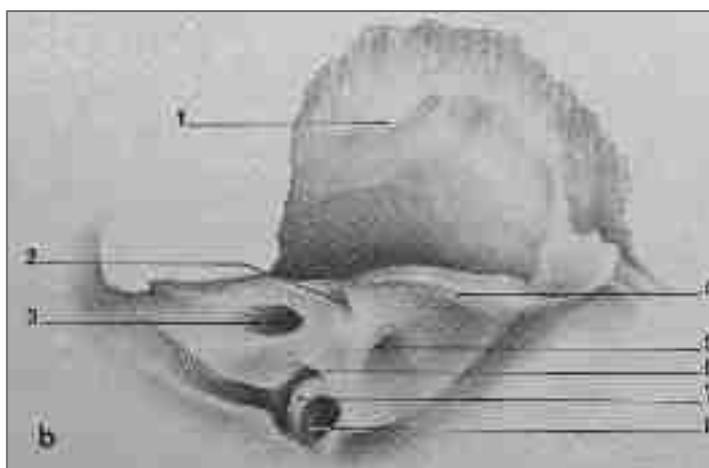
### II.2.2.3. Le rocher

On considère que le rocher correspond à une pyramide couchée dans un plan horizontal avec un sommet antérieur et médial, et une base postérieure et latérale comportant trois faces, une base et trois cavités principales (33).

#### II.2.2.3.1. Les faces du rocher

Les trois faces que l'on décrit communément au rocher sont postéro-supérieure, antéro-supérieure et inférieure.

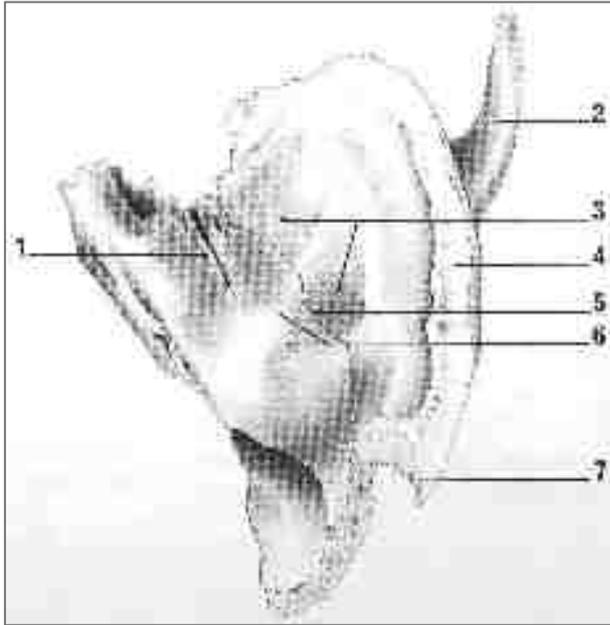
- La face postéro-supérieure, endocrânienne, appartient à la fosse crânienne postérieure et est percée de quatre orifices : le méat acoustique interne, la fosse subarcuata, la fossette unguéale et l'orifice d'aboutement de l'aqueduc du limaçon (Figure 16).
- La face antéro-supérieure, endocrânienne également, est la face cérébrale contre laquelle se place le lobe temporal. Elle comprend l'eminencia arcuata, le toit de l'oreille moyenne ou tegmen tympani, les orifices de passage des nerfs pétreux ainsi que la dépression du ganglion trigéminal (Figure 17).
- La face inférieure, exocrânienne, peut être segmentée en deux parties : une partie antéro-inférieure dans laquelle s'ouvre la trompe auditive, et une partie postéro-inférieure où se place l'orifice inférieur du canal carotidien, en partie le foramen jugulaire, l'orifice inférieur du canal tympanique et le trou stylo-mastoïdien (Figure 18).



- 1.Face endocrânienne de l'écaïlle verticale
- 2.Fossa subarcuata
- 3.Méat acoustique interne
- 4.Gouttière du sinus pétreux supérieur
- 5.Fossette unguéale
- 6.Ouverture interne de l'aqueduc de la cochlée
- 7.Epine jugulaire
- 8.Foramen jugulaire

**Figure 16 : Face postéro-supérieure d'un rocher gauche.**

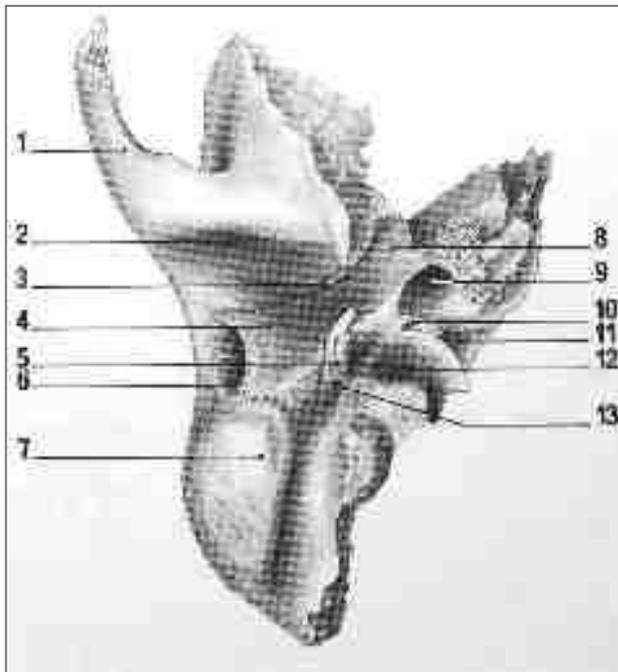
D'après Veillon F. Imagerie de l'oreille. Flammarion Médecine-Sciences. 1991. 483 p. ISBN : 2-257-15520-3. (33)



1. Face antéro-externe du rocher
2. Processus zygomatique
3. Ecaille horizontale
4. Ecaille verticale
5. Suture pétro-squameuse supérieure
6. Rocher (toit de la cavité tympanique)
7. Sinus sigmoïde

**Figure 17 : Face antéro-supérieure d'un rocher droit.**

D'après Veillon F. Imagerie de l'oreille. Flammarion Médecine-Sciences. 1991. 483 p. ISBN : 2-257-15520-3. (33)



1. Processus zygomatique
2. Ecaille horizontale préméatique
3. Prolongement inférieur du tegmen tympanique séparant l'écaille en avant de l'os tympanal en arrière
4. Os tympanal
5. Processus styloïde
6. Méat acoustique externe
7. Mastoïde
8. Trompe auditive
9. Orifice inférieur du canal carotidien
10. Canal tympanique
11. Ouverture de l'aqueduc du limaçon
12. Foramen jugulaire
13. Trou stylo-mastoïdien

**Figure 18 : Vue inférieure d'un rocher droit.**

D'après Veillon F. Imagerie de l'oreille. Flammarion Médecine-Sciences. 1991. 483 p. ISBN : 2-257-15520-3. (33)

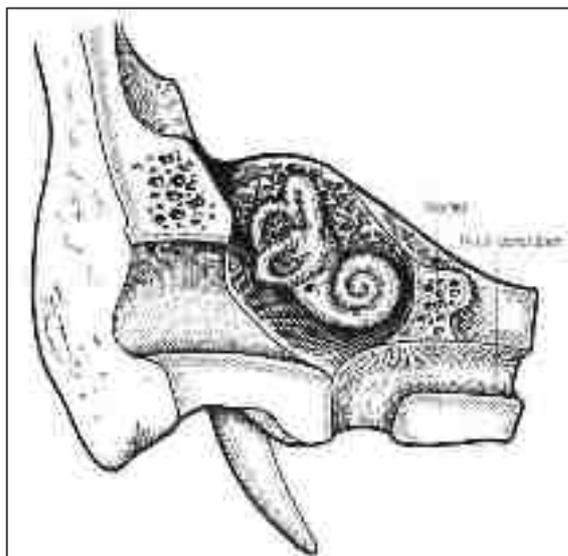
#### II.2.2.3.2. Les cavités du rocher

Le rocher participe à la formation des trois cavités majeures enfermant les organes de l'audition et de l'équilibration.

- L'oreille externe (cavité la plus externe) correspond au conduit auditif externe.
- L'oreille moyenne (cavité intermédiaire) comprend la caisse du tympan et communique avec l'antre mastoïdien en arrière et la trompe d'Eustache en avant.
- L'oreille interne (cavité la plus interne) constitue un moule osseux appelé labyrinthe osseux ou encore capsule otique qui vient épouser la forme des structures sensorielles membranaires sous-jacentes de l'organe de l'audition en avant et de l'équilibration en arrière.

#### II.2.2.4. La capsule otique

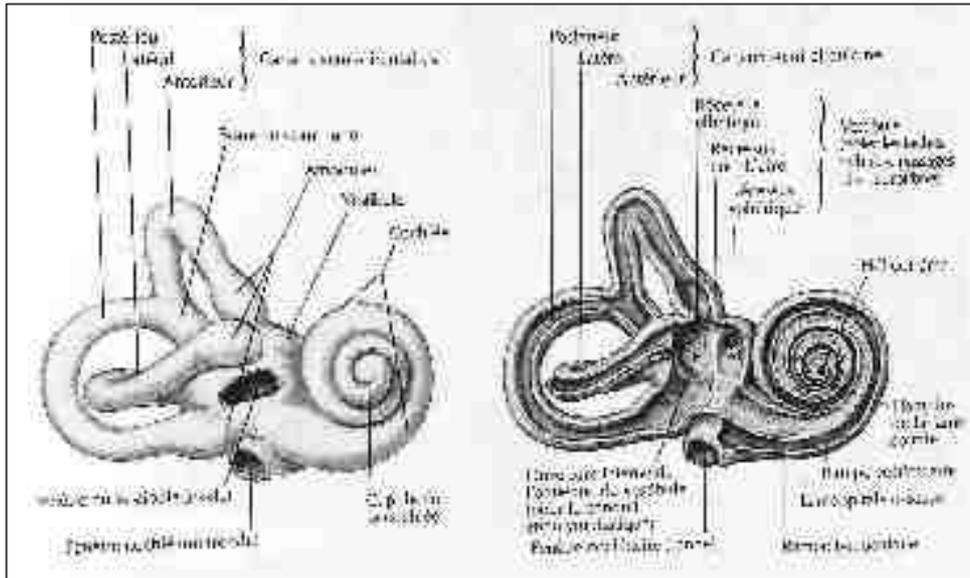
La capsule otique ou labyrinthe osseux est une structure majeure de l'oreille interne (Figures 19 et 20). Elle constitue une capsule d'os compact autour du labyrinthe membraneux et en épouse les contours tout en demeurant séparée par les espaces péri-lymphatiques (Figure 21) (29). Pairs et pratiquement symétriques, les labyrinthes présentent une densité osseuse augmentée de leurs parois limitantes.



**Figure 19 : Forme et situation du labyrinthe osseux.**

D'après Legent F, Perlemuter L, Vandembrouck C. Cahiers d'anatomie O. R. L., 2<sup>ème</sup> édition. 1968 -1975 Masson et Compagnie, Editeurs, Paris. N° d'impression : 966-74. ISBN : 2.225-41393-2. (29)



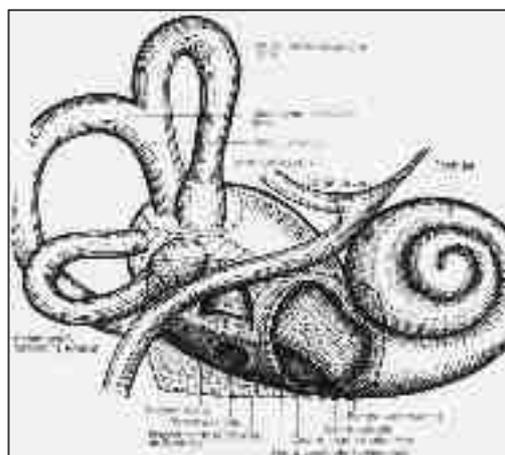


**Figure 22 : Labyrinthe osseux droit, vue antéro-latérale après ablation de de l'os environnant (à gauche) et labyrinthe osseux droit disséqué avec le labyrinthe membraneux ôté (à droite).**  
 D'après Franck H. Netter, Atlas d'anatomie humaine, 5<sup>ème</sup> édition, 2011, p95. (35)

#### II.2.2.4.1. Le labyrinthe postérieur

##### II.2.2.4.1.1. Le vestibule

Le vestibule constitue la partie centrale du labyrinthe, entre le conduit auditif interne et la caisse du tympan (Figure 23). Il est de forme ovoïde, irrégulier, plus haut que large. Ses parois sont creusées par les orifices des canaux semi-circulaires, l'abouchement du limaçon et de l'aqueduc du vestibule et les fenêtres ovale et ronde.

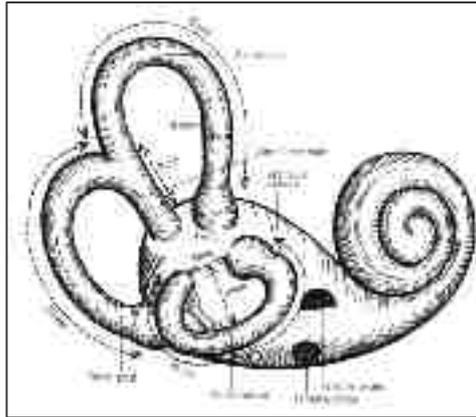


**Figure 23 : Paroi externe du vestibule osseux.**

D'après Legent F, Perlemuter L, Vandenbrouck C. Cahiers d'anatomie O. R. L., 2<sup>ème</sup> édition. 1968-1975 Masson et Compagnie, Editeurs, Paris. N° d'impression : 966-74. ISBN : 2.225-41393-2. (29)

#### II.2.2.4.1.2. Les canaux semi-circulaires

Les canaux semi-circulaires sont trois tubes creux en forme de boucle incomplète de 7 à 8 mm de diamètre. Ils sont ouverts dans le vestibule par leurs deux extrémités. Une de leurs extrémités, l'extrémité ampullaire, est dilatée pour permettre le passage d'un réseau nerveux (Figure 24).

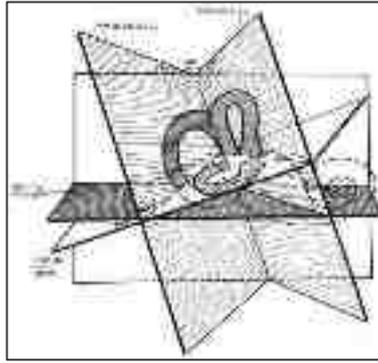


**Figure 24 : Les canaux semi-circulaires : orientations et dimensions.**

D'après Legent F, Perlemuter L, Vandembrouck C. Cahiers d'anatomie O. R. L., 2<sup>ème</sup> édition. 1968 – 1975 Masson et Compagnie, Editeurs, Paris. N° d'impression : 966-74. ISBN : 2.225-41393-2. (29)

Les canaux semi-circulaires correspondent aux canaux : externe (ou horizontal), supérieur (ou antérieur) et postérieur. Le canal externe (le plus court) est de 15 mm de long. Tandis que le canal postérieur (le plus long) est de 20 mm.

La section circulaire ou ovalaire de ces canaux à un diamètre qui varie entre 0,5 mm et 1,5 mm et leur orientation a un très grand intérêt physiologique. En effet, elle permet de percevoir les mouvements de la tête dans les trois dimensions de l'espace, intervenant dans l'équilibre (Figure 25).



**Figure 25 : Orientation dans l'espace des canaux semi-circulaires.**

D'après Legent F, Perlemuter L, Vandembrouck C. Cahiers d'anatomie O. R. L., 2<sup>ème</sup> édition. 1968 -1975 Masson et Compagnie, Editeurs, Paris. N° d'impression : 966-74. ISBN : 2.225-41393-2. (29)

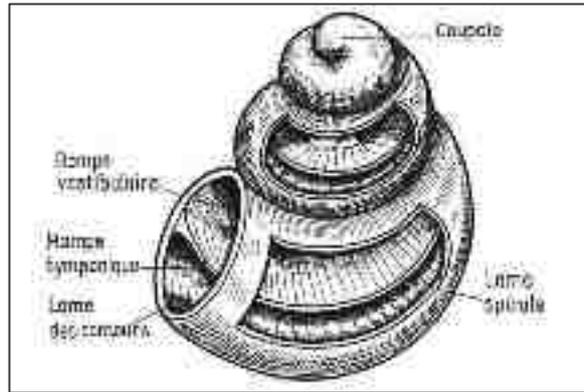
#### *II.2.2.4.1.3. L'aqueduc du vestibule*

L'aqueduc du vestibule est un canal très étroit qui relie le vestibule à l'endocrâne et contient le canal endolymphatique ainsi qu'une veine satellite.

#### *II.2.2.4.2. Le labyrinthe antérieur*

##### *II.2.2.4.2.1. Le limaçon osseux*

Le limaçon osseux ou cochlée doit son nom à sa forme de coquille d'escargot. Il contient les organes essentiels à l'audition. Il est formé d'un seul bloc osseux avec un noyau central (ou columelle) en forme de cône à sommet tronqué et partiellement évidé (Figure 26), d'un tube osseux (ou lame des contours) s'enroulant autour de la columelle et qui décrit des spires au rayon progressivement décroissant s'emboitant partiellement et d'une lamelle osseuse (ou lame spirale) parcourant la lame des contours sur presque tout son trajet. La lame spirale sépare ainsi la lame des contours en deux compartiments : un compartiment supérieur (ou rampe vestibulaire) et un compartiment inférieur (ou rampe tympanique).



**Figure 26 : Constitution du limaçon.**

D'après Legent F, Perlemuter L, Vandembrouck C. Cahiers d'anatomie O. R. L., 2<sup>ème</sup> édition. 1968 – 1975 Masson et Compagnie, Editeurs, Paris. N° d'impression : 966-74. ISBN : 2.225-41393-2. (29)

#### *II.2.2.4.2.2. L'aqueduc du limaçon*

L'aqueduc du limaçon correspond à un canalicule osseux plus étroit que l'aqueduc du vestibule. Classiquement, il met en rapport les espaces péri-lymphatiques du limaçon avec les espaces sous-arachnoïdiens de la fosse cérébelleuse.

### **III. Description histologique de la dent et de la capsule otique**

Dans cette dernière partie, nous allons décrire la structure des tissus constituant la dent ainsi que l'os pétreux. Ces deux substrats constituent des structures histologiques complexes et très organisées, ainsi la dent présente quatre tissus principaux tandis que la structure de l'os pétreux a été jusqu'à présent peu décrite dans la littérature.

#### **III.1. Histologie des tissus dentaires**

La dent est essentiellement composée de dentine, recouverte d'émail au niveau de la couronne et de cément au niveau de la racine. Elle est creusée par la cavité pulpaire comprenant le paquet vasculo-nerveux de la dent et communiquant avec le reste de l'organisme par le foramen apical ou apex (Figure 10).

##### **III.1.1. L'émail**

L'émail, recouvrant la couronne de la dent, est le tissu le plus dur du corps humain et le plus calcifié, c'est une structure acellulaire recouvrant la couronne de la dent. Ce tissu permet la protection des organismes cellulaires de la dent des conditions extérieures telles que la chaleur, l'humidité ou les bactéries.

L'émail dentaire est composé à 96% d'un réseau de cristaux d'hydroxyapatite de calcium sous forme de prismes orientés perpendiculairement à la dentine sous-jacente. A cette structure minérale s'ajoute une matrice organique et de l'eau. C'est un tissu qui a la particularité de se déminéraliser et se reminéraliser constamment dans la cavité buccale.

L'émail est synthétisé par les améloblastes qui disparaissent une fois le processus de maturation achevé, de ce fait l'émail détruit ne peut être régénéré par la suite.

Le complexe dentino-pulpaire est la structure dentaire principale et contrairement à l'émail, il contient beaucoup de cellules.

##### **III.1.2. La dentine**

La dentine est un tissu plus dur que l'os mais moins que l'émail, il est présent au niveau de la couronne et de la racine et circonscrit la pulpe.

C'est un tissu minéralisé et avasculaire, perforé par un grand nombre de canalicules dentinaires parallèles qui s'étendent de la pulpe vers la périphérie et contenant les prolongements des odontoblastes eux-mêmes situés à l'orifice pulpaire des canalicules. Ces odontoblastes permettent la sécrétion de dentine tout au long de la vie en réaction aux agressions subies par la dent.

Elle comprend une partie minérale à 70% composée de cristaux d'hydroxyapatite et de phosphate de calcium amorphe en petite quantité, ainsi qu'une partie organique, principalement du collagène, et de l'eau. Généralement la dentine ne contient pas de cellules nucléées mais des odontoblastes peuvent se retrouver piégés dans ce tissu lors de l'apposition de dentine tertiaire.

### III.1.3. La pulpe

La pulpe est un tissu conjonctif lâche, hautement vascularisé et innervé, riche en odontoblastes, fibroblastes, histiocytes, macrophages, plasmocytes, polynucléaires neutrophiles, cellules nerveuses et cellules mésenchymateuses indifférenciées. Elle a des fonctions nutritives, sensorielles et réparatrices. Bien qu'étant un tissu riche en cellules, celui-ci peut être altéré si la dent est âgée ou dégradée ; en effet, face à une agression, la pulpe va se rétracter et on va avoir une réaction de défense entraînant la formation de dentine, dite tertiaire.

On peut décrire la pulpe coronaire dans la chambre pulpaire (ou camérale) et la pulpe radiculaire dans le ou les canaux pulpaires. Elle est connectée aux tissus parodontaux par l'intermédiaire de l'apex et les canaux accessoires et latéraux.

### III.1.4. Le ciment

Le ciment est le tissu recouvrant la surface des racines depuis la jonction amélo-cémentaire jusqu'à l'apex, c'est un tissu avasculaire, non innervé et minéralisé. On lui reconnaît deux types, en fonction de la présence de cellules ou non :

- Le ciment cellulaire, similaire en composition physique et chimique à l'os, bien que, contrairement à celui-ci, il ne se remodèle pas au cours de la vie d'un individu mais augmente en épaisseur. Il est présent principalement au niveau de la portion apicale des racines et de la zone de furcation des molaires, c'est

une matrice cellulaire minéralisée comportant des cémentoblastes et des cémentocytes recouvrant le ciment acellulaire.

- Le ciment acellulaire, une matrice collagénique minéralisée sans éléments cellulaires qui recouvre la totalité de la racine.

Il est composé également d'une phase minérale de cristaux d'hydroxyapatite correspondant à 65% de sa structure et d'une phase organique. Sa minéralisation va former des petits îlots de croissance centrifuges lui conférant une structure irrégulière.

Pour résumer, la dent est le tissu le plus minéralisé du corps mais également le plus dur et le plus stable chimiquement (37).

### **III.2. Histologie de l'os pétreux**

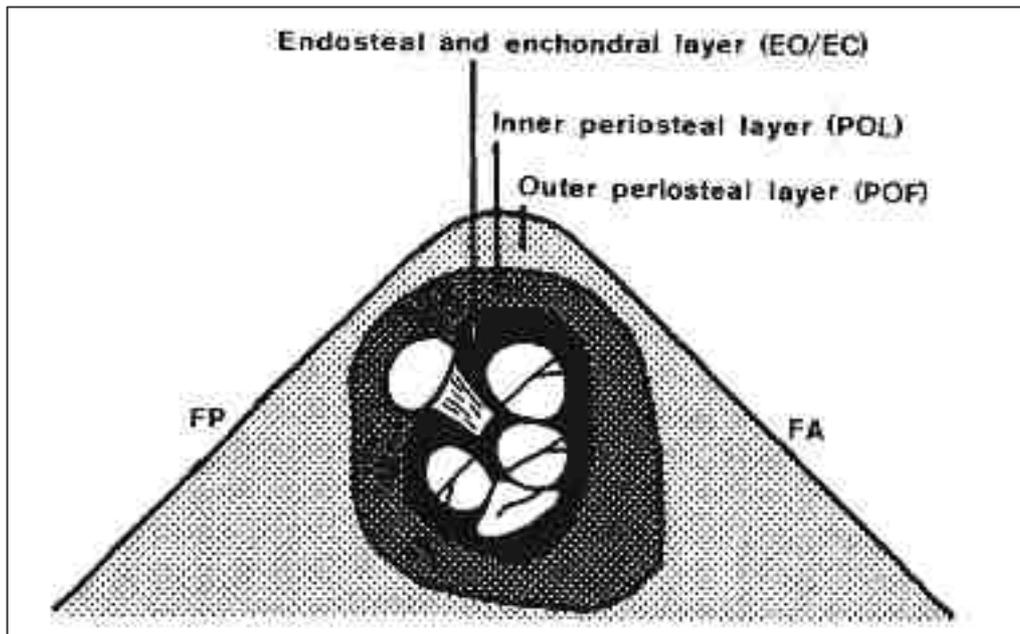
Il est à noter que jusqu'à présent peu de publications se sont attachées à décrire histologiquement l'os pétreux. De ce fait, pour cette partie, une publication de Doden *et al.* datant de 1984 (38) constituera notre support.

#### III.2.1. Organisation des fibres de collagène

Les fibres de collagène présentent une organisation particulière au niveau du labyrinthe osseux. En effet, celles-ci s'organisent selon un motif irrégulier, comparable à une toile d'araignée tandis que dans les couches périostées extérieures, les fibres de collagènes sont parallèles à la surface de l'os pétreux, probablement afin de contrer un éventuel stress mécanique.

#### III.2.2. Organisation des couches osseuses

La capsule otique est constituée de trois couches osseuses distinctes : une couche endostale (OE), une couche enchondrale (EC) et enfin une couche périostale interne (POL) (Figure 27).



**Figure 27 : Organisation schématique des différentes couches osseuses au sein de l'os pétreux.**

FA correspond à la face antérieure tandis que FP à la face postérieure.  
D'après Doden *et al*, 1984. (38)

La couche endostale tapisse l'extérieur du labyrinthe membraneux de façon discontinue sur 0,1 à 0,2 mm d'épaisseur. Sa minéralisation est homogène et on peut y remarquer un certain nombre de canaux vasculaires. Elle se prolonge dans la columelle, une structure spongieuse et hautement vascularisée qui contient souvent des traces « chondrales ».

La couche enchondrale enveloppe la couche endostale et le labyrinthe membraneux. Son épaisseur varie entre 0,8 mm au niveau de la cochlée et 0,2 à 0,3 mm au niveau des canaux semi-circulaires. Sa minéralisation est similaire à la couche endostale mais on y retrouve des traces « chondrales » intégrées dans des espaces interglobulaires hyperminéralisés, eux-mêmes circonscrits par des liasses de fibres de collagène organisées de façon circulaire. On y retrouve également de larges canaux vasculaires ainsi que des structures similaires à des ostéons dans des zones de tissus osseux hautement minéralisés.

La couche périostale interne connecte les parties endostale et enchondrale du labyrinthe osseux avec les structures extérieures de l'os pétreux. Elle comble l'espace entre les canaux semi-circulaires. Elle présente deux niveaux de minéralisation et les canaux vasculaires varient en taille et forme et sont délimités par des lamelles d'os hautement minéralisé. Les fibres de collagène sont orientées transversalement et s'entrelacent mais sans orientation prédominante. Dans la région de la cochlée, les

canaux vasculaires sont parallèles à l'axe de la pyramide mais entre les canaux semi-circulaires ils sont perpendiculaires à leurs lumières.

### III.2.3. Remodelage au cours du temps

L'os pétreux est différent de tous les autres éléments squelettiques du corps humain. Le remodelage d'os fibreux à lamellaire s'effectue dans tous les os, mais au niveau de l'os pétreux ce remodelage s'effectue uniquement au niveau de la couche périostale externe.

On peut remarquer qu'au cours du développement fœtal la capsule otique chondrale est progressivement remplacée au cours d'un processus d'ossification. Or certains éléments chondraux sont inclus par apposition osseuse et persistent car cette structure ne subit aucune résorption. Alors que de l'os fibreux se forme autour de la couche chondrale, au même moment la couche endostale s'ossifie au sein de la capsule. Cette dernière peut être comparée aux lamelles circonférentielles internes retrouvées dans les os longs.

Après son achèvement à l'âge de deux ans, la capsule otique ne subit plus aucune modification.

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Dans ce travail, nous avons tenté de décrypter les caractéristiques de l'os pétreux et d'établir la pertinence de son utilisation comme source d'ADN ancien en menant des analyses histologiques et de biologie moléculaire que nous décrivons ci-après.

### I. Préparation des échantillons histologiques pour la microscopie optique

Des coupes histologiques ont été réalisées à partir d'échantillons de dents et d'os pétreux frais afin de pouvoir étudier et comparer leurs structures au microscope optique.

#### I. 1. Réalisation de coupes histologiques à partir d'un échantillon dentaire

La réalisation de coupes histologiques à partir de dents est une opération délicate nécessitant un matériel particulièrement adapté à la dureté de cet organe. Cette opération a donc été confiée à deux laboratoires spécialisés : l'unité 1260 de l'INSERM et le laboratoire d'histomorphométrie de l'IML de Strasbourg qui ont chacun mis en œuvre des protocoles différents.

##### I.1.1. Protocole appliqué par l'unité 1260 de l'INSERM

L'échantillon traité était une dent de sagesse mandibulaire provenant d'un individu de sexe féminin âgée d'une vingtaine d'années et ne présentant aucune pathologie. Directement après l'extraction atraumatique de la dent, celle-ci a été conservée dans du Formaldéhyde en solution à 4%.

Une fois réceptionnée au sein de l'unité 1260 de l'INSERM, l'échantillon a été inclus dans de la paraffine afin que puissent être réalisées des coupes de 1 mm d'épaisseur à la scie microtomique (Figure 28). Ces coupes ont ensuite été déparaffinées à l'aide d'un solvant spécial (LMR®-SOL) avant de procéder à leur déminéralisation pendant 6 heures à 37 degrés, avec agitateur, à l'aide d'une solution de décalcification à base d'acide chlorhydrique (Decalcifier II®, Leica, pH =1) (Figures 29a et 29b). Après un rinçage à l'eau distillée, les coupes ont été immergées dans une solution tampon (PBS,

pH=7,4) durant 24 heures afin de rétablir le pH des préparations. Les coupes ont alors été déshydratées par immersions successives dans des volumes d'alcool de degrés croissants (une nuit dans de l'alcool à 70°, deux fois une heure dans de l'alcool à 95° et enfin deux fois deux heures dans de l'alcool à 100%) et dans du LMR®-SOL (deux fois une heure). Elles ont ensuite été immergées dans de la paraffine liquide durant une nuit, avant d'être incluses (Figure 30). A l'aide d'un microtome (Figure 31) de nouvelles coupes d'une épaisseur de 10 µm ont alors été réalisées suivies des deux colorations suivantes :

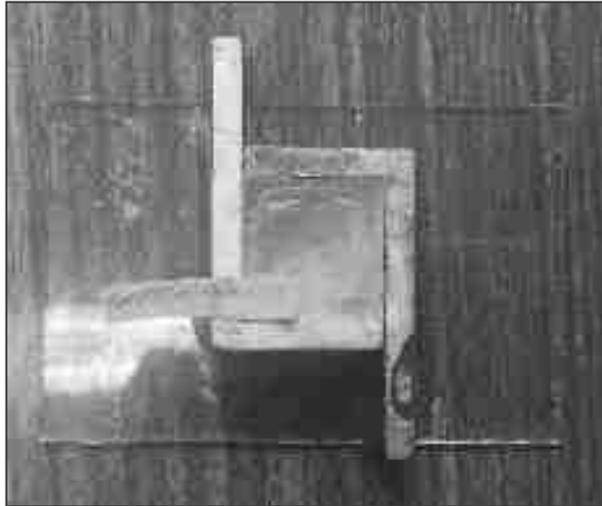
- Hématoxyline / Eosine (H/E) pour l'étude de la morphologie générale ;
- Picro-Sirius (PS) pour la mise en évidence du collagène et de la micro-anatomie osseuse et leur observation en lumière polarisée.



Figure 28 : Scie microtomique.



Figures 29a (à gauche) : LMR®-SOL et 29b (à droite) : Decalcifier II®



**Figure 30 : Coupe incluse dans de la paraffine.**

De la paraffine liquide est coulée dans un moule contenant la coupe, après une nuit le bloc de paraffine incluant la coupe est démoulé.



**Figure 31 : Microtome permettant réaliser les coupes histologiques.**

#### I.1.2. Protocole appliqué par le laboratoire d'histomorphométrie de l'IML

L'échantillon traité était une dent de sagesse mandibulaire gauche (ou 38) présentant une lésion carieuse occlusale et provenant d'un individu de sexe féminin âgé d'une quarantaine d'années ne présentant aucune pathologie.

La dent a été fixée dans du formol à 10% tamponné (pH = 7,2) pendant 6 semaines afin de stabiliser les structures tissulaires. A l'issue de la fixation, elle a été coupée

selon un plan sagittal à l'aide d'une scie diamantée montée sur une Dremel® afin d'exposer tant la pulpe camérale que canalaire (Figure 32).



**Figure 32 : De gauche à droite : vue vestibulaire et palatine avant et après découpe de la dent sélectionnée.**

La dent a ensuite été décalcifiée dans du liquide de Kristensen (39), composé d'acide formique et de formate de sodium. Cette méthode de décalcification utilise un acide faible et est de ce fait moins agressive pour le tissu calcifié. Le temps de décalcification a été de 7 jours.

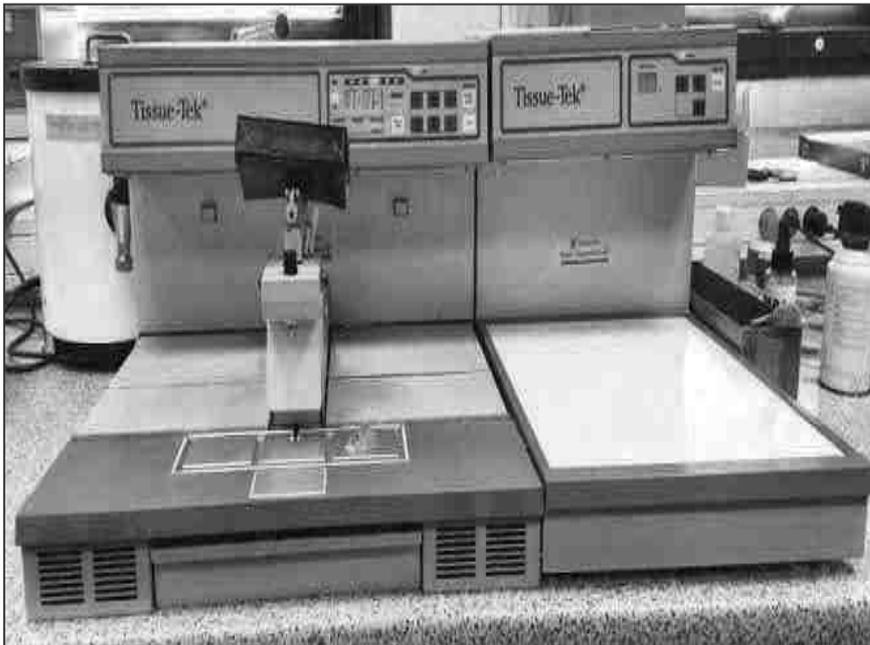
A la fin de la décalcification, les fragments dentaires ont été rincés 2 heures sous eau courante puis déshydratés dans un automate de déshydratation sous vide "Tissue-Tek, VIP 6 AI", Sakura® (Figure 33), selon le schéma appliqué aux organes de routine (cycle de 19h : éthanol de 50% à 100% puis xylène). A l'issue de la déshydratation, les échantillons ont été inclus en paraffine à l'aide d'une station d'inclusion en paraffine "Tissue Tek III", Sakura® (Figures 34a et 34b). L'inclusion des échantillons a été réalisée dans une paraffine dont le point de fusion est de 62 - 64°C (Peel-a-way paraffin embedding wax, Ref: 19304-01, EMS, Philadelphia). Cette paraffine à haut point de fusion permet d'assurer une meilleure matrice d'enrobage aux tissus calcifiés et une coupe plus aisée.

Des coupes de 5µm ont été faites avec un microtome "Jung Autocut", Leica® (Figure 35) et les colorations suivantes réalisées :

- Hématoxyline / Eosine (H/E) pour l'étude de la morphologie générale ;
- Picro-Sirius (PS) pour la mise en évidence du collagène et de la micro-anatomie osseuse et leur observation en lumière polarisée (40) (41) (42).



Figure 33 : Automate de déshydratation sous vide "Tissue Tek, VIP AI 6".



Figures 34a : Station d'inclusion en paraffine « Tissue Tek III » et 34b : Dent incluse en paraffine.



**Figure 35: Microtome « Jung Autocut ».**

## **I. 2. Réalisation de coupes histologiques à partir d'un échantillon d'os pétreux**

Le prélèvement d'os temporal humain a été réalisé à partir d'un don de corps testamentaire à la science<sup>1</sup>. Une fois prélevé par le laboratoire d'histomorphométrie de l'IML de Strasbourg, le fragment d'os temporal a été fixé dans du formol à 10% tamponné (pH = 7,2) pendant 6 semaines. A l'issue de la fixation, l'os temporal a été coupé selon un plan sagittal, à l'aide d'une scie oscillante pour autopsie "Clean-cut" Surgipath® (Figure 36), afin d'exposer la partie pétreuse de l'os. Les fragments osseux ont été décalcifiés dans la même solution que pour la dent (liquide de Kristensen). Le temps de décalcification a été de 18 jours.

Le protocole de la technique histologique de traitement de l'os pétreux (déshydratation, inclusion en paraffine, coupe et colorations) a été identique à celui utilisé pour traiter la dent.



**Figure 36 : Scie oscillante « Clean-Cut »**

---

<sup>1</sup> Le don des corps aux facultés de médecine en vue de la recherche scientifique et de l'enseignement médical se fonde sur l'article 3 de la loi du 15 novembre 1887 traitant de la liberté des funérailles. Ce don est testamentaire, donc *ante-mortem*. Il est explicite quant au consentement au don et quant au devenir du don, à visée de recherche par le biais de l'article R. 2213-13 du code général des collectivités territoriales (confirmé par le décret n°2011-121 du 28 janvier 2011), qui dispose que ce don a pour destination un établissement de santé, de formation ou de recherche.

## II. Préparation des os pétreux et des dents et analyses de biologie moléculaire

### II.1. Echantillons analysés

Pour cette étude, lorsque cela a été possible, nous avons associé à chacun des os pétreux analysés, une dent provenant du même individu afin que puisse être réalisée une analyse comparative des deux types de substrat (Tableau 1).

Un ensemble de 33 sujets a été analysé (Tableau 2). Parmi eux, 27 sont des échantillons anciens provenant de divers sites de fouilles et datant de différentes époques historiques : 22 proviennent de sites hongrois datés du X<sup>ème</sup> siècle (43) (44), 2 sont issus d'individus inhumés entre 390 et 110 av. J-C sur le site de fouille de Marsal en France (département 54), 3 proviennent d'une nécropole de l'Altai-Mongol de l'âge du Bronze. Les 6 autres échantillons proviennent de cas relatifs à des enquêtes décès dans le cadre desquelles un profil génétique a dû être établi.

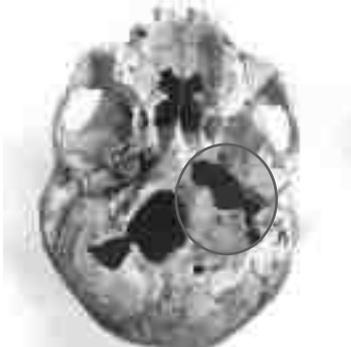
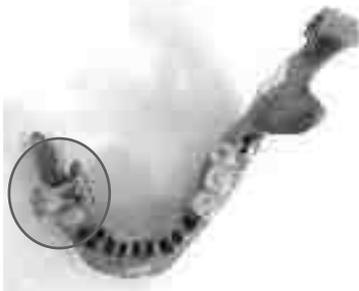
Echantillons à la réception	Prélèvements effectués
<p>Crâne</p> 	<p>Os pétreux</p> 
<p>Mandibule</p> 	<p>Dent</p> 

Tableau 1 : Prélèvements effectués lors de l'étude.

Nbr	Echantillons	Provenance	Datation
1	Karos I. Gr3	Hongrie	Xème siècle
2	Karos II. Gr11		
3	Karos II. Gr14		
4	Karos II. Gr16		
5	Karos II. Gr29		
6	Karos II. Gr52		
7	Karos II. Gr60		
8	Karos II. Gr61		
9	Karos III. Gr11		
10	Rétk-Paro Gr1		
11	Rétk-Paro Gr2		
12	Tis-Bas Gr13		
13	Rakamaz Gr1		
14	Rakamaz Gr2		
15	Bodrog Gr1		
16	Bodrog Gr3		
17	Tisza		
18	Tuzsér		
19	Nagy 1		
20	Nagy 2		
21	Nagy 6		
22	Örmé		
23	Mars ind.7	Site de Marsal, France	Entre 390 et 110 siècle avant J-C
24	Mars ind.8		
25	ST7	Altaï, Mongolie	Entre 1er et IIIème siècle avant J-C
26	ST32		
27	ST72		
28	Par ind.1	France	
29	Par ind.2		
30	indX		
31	Ad n°1		
32	Enf n°2		
33	Ad n°3		

**Tableau 2 : Liste des échantillons.**

## II.2. Prévention des contaminations

Comme l'amplification d'un ADN ancien est beaucoup moins efficace que l'amplification d'un ADN contemporain, la présence de quelques molécules d'ADN exogène est suffisante pour masquer l'amplification d'ADN ancien endogène. Il est donc fondamental d'empêcher toutes contaminations en travaillant dans des locaux adaptés et réservés à l'étude d'ADN dégradés (locaux en surpression équipés de lampes UV et d'un matériel spécifique) ainsi qu'en travaillant de manière très rigoureuse (port de blouses, gants, masques, charlottes et sur-chaussures ; sens de

circulation des échantillons ; décontamination systématique des locaux et paillasse, génotypage des personnes au contact des échantillons...).

## **II.3. Sélection et préparation des échantillons**

### II.3.1. Sélection des échantillons dentaires

La quantité d'ADN présente dans une dent dépend de plusieurs facteurs tels que le type de dent, l'âge dentaire du donneur ou encore l'intégrité de la structure (45) (46). Les dents pluriradiculées (molaires et prémolaires) sont à privilégier car elles présentent une surface radiculaire et un volume pulpaire plus important. De plus, elles sont plus susceptibles de rester ancrées dans l'os alvéolaire, participant à leur protection vis-à-vis du milieu extérieur. Lors de la sélection des dents, des apex fermés ont été privilégiés. En effet, si le processus d'apexification n'est pas achevé le risque de contamination est plus important. Enfin, comme toutes lésions (fissures, lésions carieuses, tartre radiculaire important...) peuvent favoriser l'entrée de bactéries et donc la contamination de l'échantillon, les dents abimées ont été écartées.

### II.3.2. Préparation des échantillons

#### II.3.2.1. Les échantillons dentaires

Les dents ont été méticuleusement nettoyées à l'aide d'une compresse stérile imbibée d'une solution oxydante, rincées à l'eau stérile puis séchées à l'éthanol. Elles ont ensuite été décontaminées par exposition aux UV courts à raison de trente minutes par face avant d'être réduites en poudre par cryobroyage au moyen d'un cryobroyeur à azote liquide (6870 Freezer/Mill) (Figure 37).

Le matériel nécessaire pour le cryobroyage (tubes cryogéniques, bouchons et percuteurs) a préalablement été désinfecté, rincé, séché et exposé à un irradiateur Bio-Link 254nm (Crosslinker) (Figures 38a et 38b). Une fois décontaminés, les tubes cryogéniques sont insérés dans un compartiment (Figure 39). Le cryobroyage s'effectue par un système de dépolarisation permettant au percuteur de broyer l'échantillon enfermé dans le tube cryogénique par des mouvements de va et vient très rapides le tout se déroulant dans l'azote liquide à -195,79 °C.



**Figure 37 : Installation du cryobroyeur.**

A droite la bouteille d'azote liquide et à gauche le Freezer/Mill. On peut également observer des gants et une visière de protection permettant de manipuler des objets à des températures extrêmes et de se protéger des projections.



**Figures 38a (à gauche) : Irradiateur Bio-Link et et 38b (à droite) : Tubes pour le cryobroyage.**

On peut visualiser l'irradiateur Bio-Link 254nm (Crosslinker) qui permet d'exposer le petit matériel à un rayonnement ultraviolet (à gauche) et matériel pour le cryobroyage (à droite).



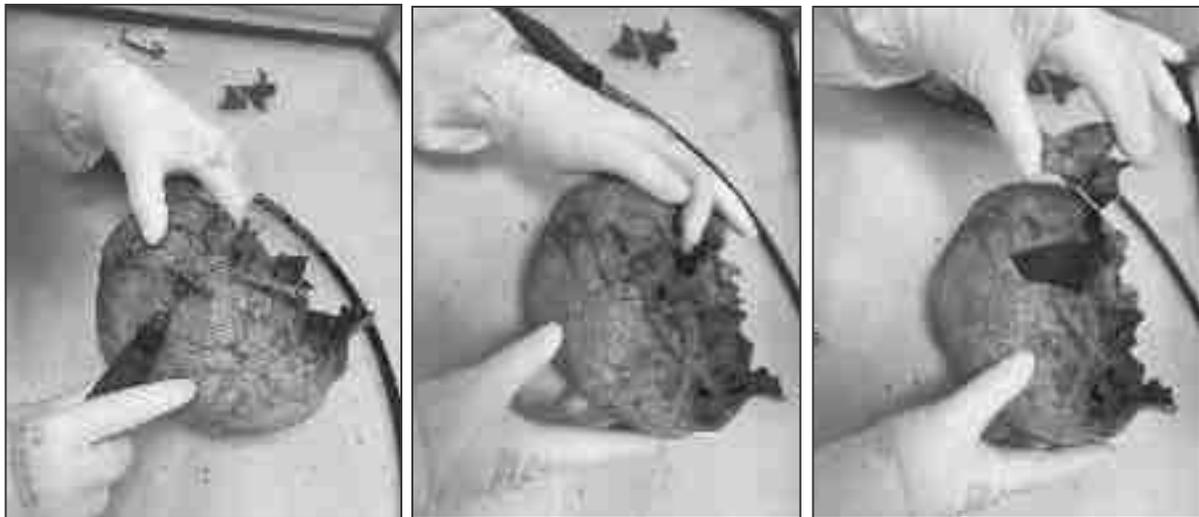
**Figure 39 : Cuve du cryobroyeur.**

Le dispositif au centre permet de mettre en place les tubes pour le cryobroyage.

### II.3.2.2. Les échantillons d'os pétreux

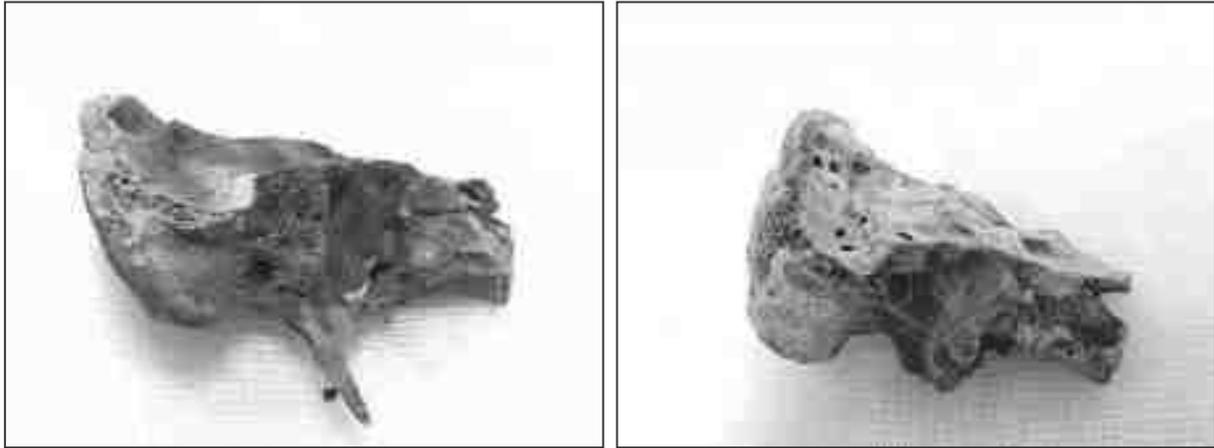
La préparation des échantillons d'os pétreux a différé selon le type de prélèvement crânien réceptionné. En effet, si dans certains cas des pétreux isolés nous ont été confiés, dans d'autres cas, il a été nécessaire d'isoler la partie pétreuse d'une structure crâniale osseuse plus ou moins complète.

Cette opération s'est effectuée sous une hotte d'aspiration, avec des instruments préalablement décontaminés, séchés, rincés et exposés à un rayonnement UV. La partie osseuse correspondant à l'os pétreux a été isolée en coupant à l'aide d'une scie montée sur une Dremel® (Figure 40). Il s'agit d'une opération délicate qui permet néanmoins le repositionnement de la pièce prélevée une fois les analyses effectuées.



**Figure 40 : Prélèvement de l'os pétreux à partir de la partie supérieure du crâne.**  
Découpe à l'aide d'une scie montée sur une Dremel®, repositionnement possible après prélèvement.

A l'aide d'une fraise montée sur la Dremel®, la surface externe de la portion osseuse a été abrasée afin d'éliminer d'éventuels contaminants, en insistant plus particulièrement au niveau de la zone correspondant à la capsule otique et des cavités présentes sur la surface osseuse (Figures 41a et 41b). Par la suite, le prélèvement de la poudre correspondant à la zone de la capsule otique a été réalisé à l'aide d'une fraise boule (Figure 42), afin de récupérer une fine poudre qui se déverse dans une petite coupelle en plastique. Trois prélèvements de poudre correspondant à des profondeurs différentes ont été réalisés pour chaque os pétreux. Ces prélèvements ont ensuite été conservés dans trois microtubes de 2 mL soigneusement annotés.



**Figures 41a (à gauche) : Fragment d'os pétreux avant et 41b (à droite) : après abrasion.**  
Après abrasion de sa surface, l'os présente une couleur nettement plus claire.



**Figure 42 : Obtention d'une poudre par forage de l'os pétreux.**  
La poudre prélevée est plus blanche lors du forage en profondeur.

#### II.4. Extraction de l'ADN

A partir des poudres d'os et de dents (environ 250 mg pour une extraction), une étape de déminéralisation peut être effectuée. Elle consiste en une incubation pendant toute une nuit (ou environ 18 heures) dans 1 ml d'EDTA (0.5M), sous agitation et à température ambiante. L'extraction proprement dite a été effectuée grâce à un tampon d'extraction composé d'EDTA (0.5M), de DTT (1M) et de protéinase K (20mg/ml) lors d'une deuxième incubation d'une nuit à 50°C. L'ADN ainsi extrait a ensuite été purifié sur des colonnes de silice puis concentré sur des colonnes Amicon.

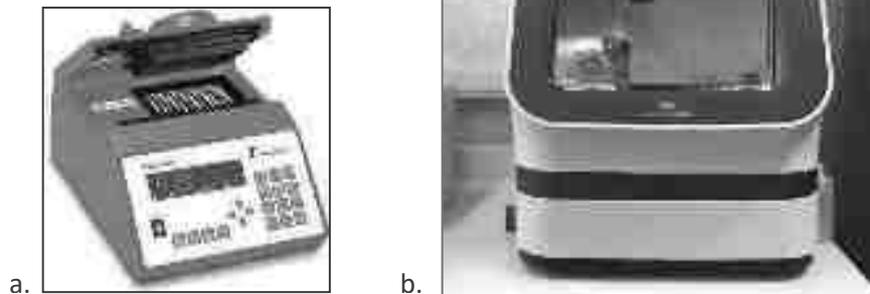
## II.5. Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

### II.5.1. Analyse de l'ADN nucléaire autosomal ou caractérisation de profils génétiques individuels

L'analyse de marqueurs microsatellites (ou STR pour Short Tandem Repeats) a été réalisée au moyen d'un kit commercial d'identification génétique humaine, il s'agit du kit d'amplification PCR GlobalFiler® (Thermo Fisher Scientific). Celui-ci permet l'analyse simultanée de 24 marqueurs génétiques dont 21 marqueurs autosomaux (D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S13), deux marqueurs du chromosome Y (DYS391, Y indel) et un marqueur pour la détermination du sexe (gène de l'amélogénine ou AMEL).

### II.5.2. Analyse des produits amplifiés

Les réactions d'amplifications PCR ont été réalisées au moyen d'un thermocycleur (Biometra) en suivant les recommandations du fournisseur pour le kit d'amplification précédemment présenté. Les produits d'amplification ou amplicons ont été ensuite analysés au moyen d'un séquenceur automatique 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) en utilisant du polymère (POP7) avec une nappe capillaire de 50 cm (Figures 43a et 43b). Les profils génétiques ont été analysés à l'aide du logiciel « GeneMapper® ».



**Figures 43 : Appareils d'amplification et d'analyse**

43a. Thermocycleur Biometra et

43b. Séquenceur automatique 3500 Genetic Analyzer.

## Chapitre 3 : Résultats

Cette partie de présentation des résultats s'attache à l'analyse descriptive des coupes histologiques de dents et d'os pétreux frais observées en microscopie optique, ainsi qu'à l'analyse des résultats des amplifications de loci STR autosomaux à partir d'ADN extraits de restes squelettiques anciens et/ou dégradés.

### I. Analyse histologique des dents

Deux dents de sagesse mandibulaires ont été traitées en vue d'analyses histologiques mais seule la dent traitée par le laboratoire d'histomorphométrie de l'IML fera l'objet d'une description ; en effet, le traitement, les colorations et les coupes ont été réalisés dans les mêmes conditions expérimentales que pour l'os pétreux, ce qui permet une comparaison de ces deux substrats.

#### I.1. Analyse de la dent après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine

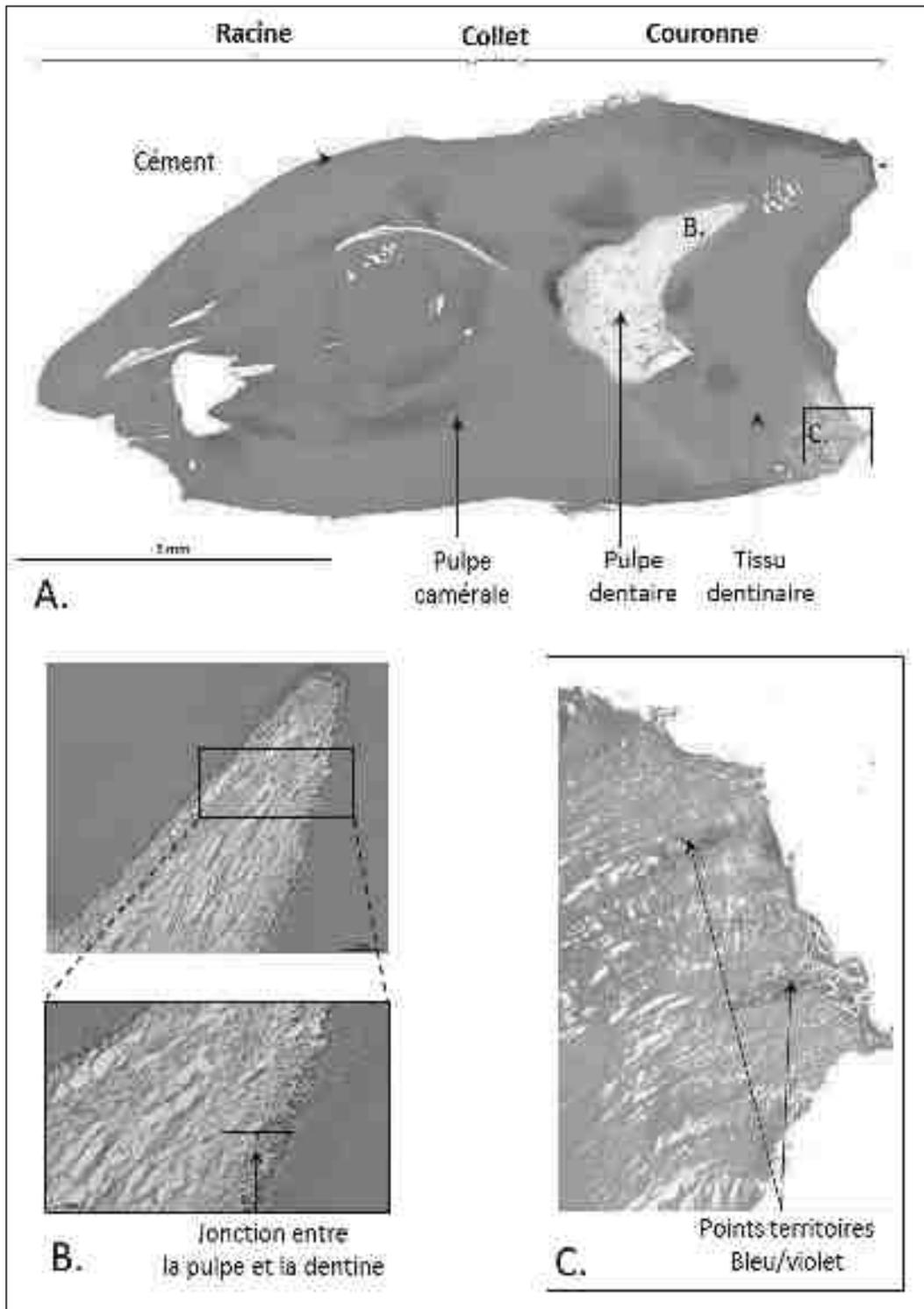
La coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H/E) permet de mettre en évidence les cytoplasmes (coloration rose) et les noyaux (coloration bleu) des cellules. Après traitement au décalcifiant acide, l'émail dentaire a été dissout et n'est plus observable. La couche améloblastique, composée des cellules responsables de la formation de l'émail et située entre l'émail et la dentine, n'est également plus visible. Toutefois, la coloration H/E a permis de mettre en évidence le tissu dentinaire, représenté par la couleur rose uniforme, à peine différenciable du ciment, coloré en rose légèrement plus soutenu. La dentine, comme on peut l'observer, représente en volume le tissu dentaire le plus important (Figure 44A). Cette coloration permet également de visualiser, au niveau d'une cuspide, un début de déminéralisation correspondant à une lésion carieuse. La pulpe camérale ainsi qu'une partie de la pulpe dentaire d'un canal se caractérisent par la présence de nombreux noyaux cellulaires. Cette observation permet de noter que la pulpe dentaire, riche en cellules nucléées, représente la principale source d'ADN nucléaire de l'organe dentaire. Cette même coupe, à plus fort grossissement, permet d'ailleurs d'observer au niveau de la jonction entre la pulpe et la dentine, les noyaux d'odontoblastes (points bleus/violet), cellules responsables de la formation de la dentine, situés à la périphérie de la pulpe, juste à la limite avec la

dentine (Figure 44B). Un grossissement sur la lésion carieuse permet de constater la déminéralisation progressive du tissu dentaire et d'observer des points territoriaux bleus/violet qui témoignent de la présence de bactéries au sein de la matrice dentinaire très dégradée (Figure 44C).

## **I.2. Analyse de la dent après coloration au rouge Sirius ou Picro-Sirius et observation à la lumière polarisée**

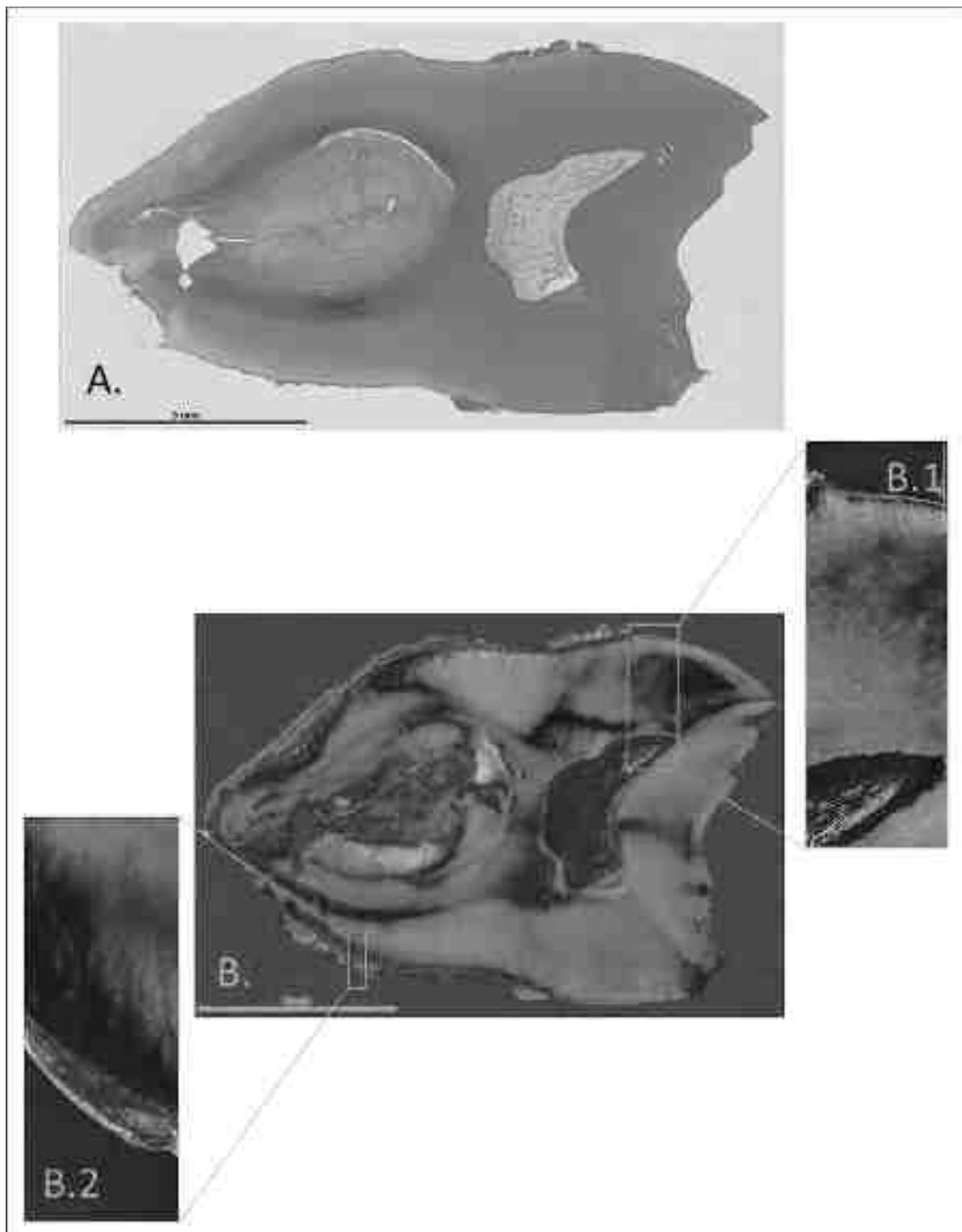
Le rouge Picro-Sirius (PS), qui se fixe le long des fibres de collagène de type I, principale protéine constitutive des tissus osseux, dentinaires et cémentaires, permet de mettre en évidence ces fibres en les colorant en rouge. Cette coloration, très faible au niveau de la pulpe camérale, est un indicateur de la faible composition en collagène de type I de cette région (Figure 45A).

Observées en lumière polarisée, les fibres de collagène les plus épaisses vont apparaître colorées en jaune/orange/rouge tandis que les fibres les plus fines seront colorées en vert. L'avantage de la lumière polarisée est qu'elle révèle l'orientation des fibres et permet de mettre en évidence différents territoires (Figure 45B). Ainsi, on observe que le tissu dentinaire se compose principalement de fibres de collagène de type I grossièrement parallèles entre elles (Figure 45B1), alors qu'au niveau de la jonction cémento-dentinaire, sur une fine épaisseur, les fibres de collagène de la dentine s'organisent dans un sens différent (Figure 45B2). Cela permet de voir que le cément est constitué de fibres de collagène de type I plus fines (coloration verte) et grossièrement orientées parallèlement à l'axe de la racine. Aucune vascularisation ni innervation n'est visible au niveau des tissus dentinaires et cémentaires. Ce que l'on peut retenir de ces observations est que le tissu dentaire, fortement minéralisé et donc riche en hydroxyapatite et phosphates de calcium (chargé positivement), est susceptible de fixer l'ADN (chargé négativement) et de le protéger de la dégradation au cours du temps.



**Figure 44 : Coupe histologique d'une dent de sagesse mandibulaire (38), sectionnée selon un plan sagittal (coloration H/E).**

Le tissu dentinaire est représenté en rose. **(A.)** Un fort grossissement de la jonction entre pulpe et dentine permet d'observer des points bleus/violet correspondant aux noyaux des odontoblastes. **(B.)** Un début de déminéralisation correspondant à une lésion carieuse est visible et la présence de points bleus/violet témoignent de la présence de bactéries **(C.)**.



**Figure 45 : Coupe histologique de la dent de sagesse mandibulaire (38), sectionnée selon un plan sagittal (coloration PS+ polarisation).**

(A.) Les fibres de collagène de type I sont teintés rouge par la coloration PS sans polarisation.

(B.) Les fibres de collagènes de type I apparaîtront en jaune/orange/rouge voire vert avec l'utilisation de la lumière polarisée mettant en évidence l'orientation des fibres. (B.1) Organisation parallèle des fibres de collagène au sein de la partie coronaire. (B.2) En vert, les fibres de collagène constituant le ciment et organisées selon un axe parallèle à la racine dentaire.

## **II. Analyse histologique de l'os pétreux**

### **II.1. Analyse de l'os pétreux après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine**

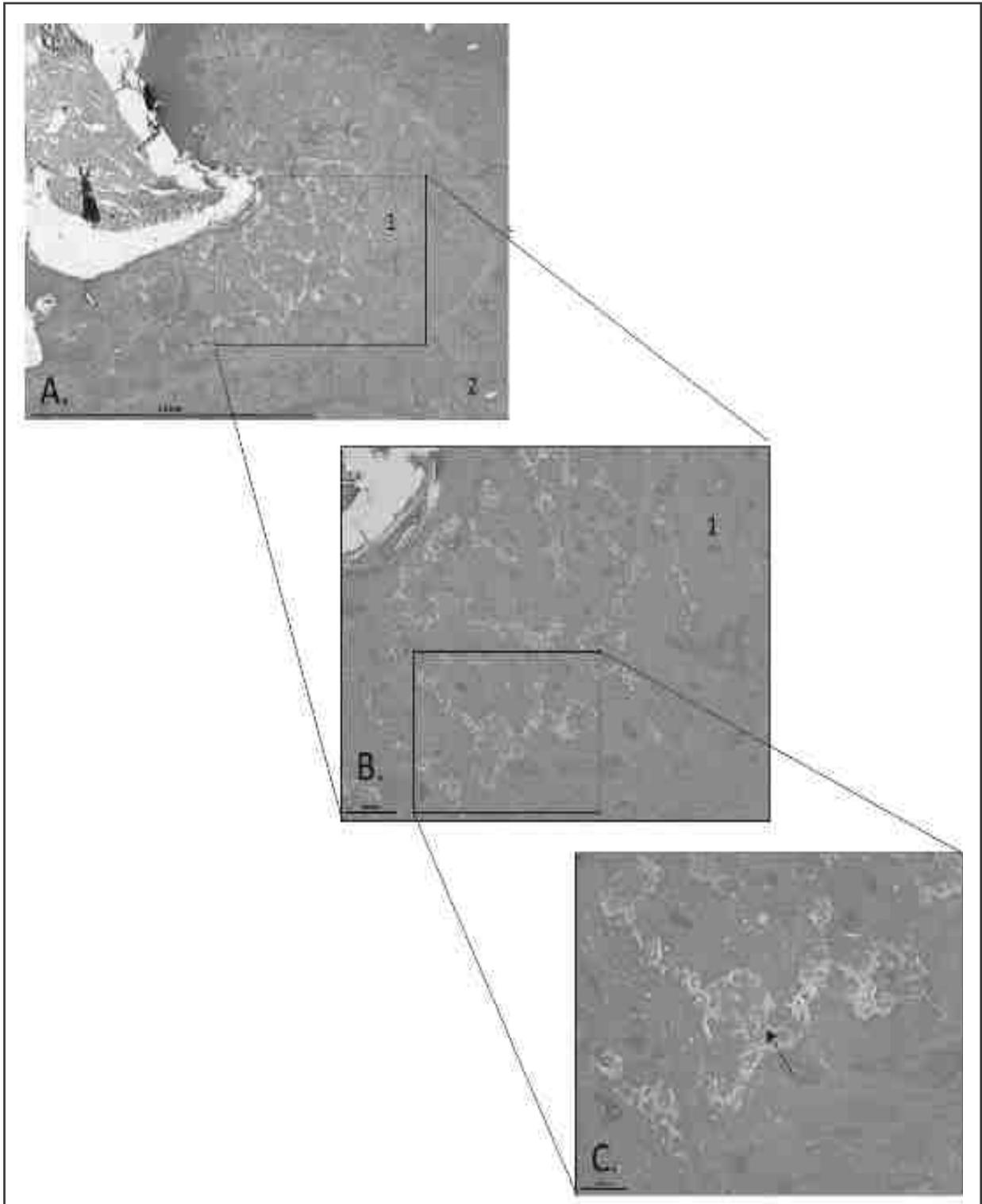
Cette coloration a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs structures histologiquement distinctes au niveau de la partie pétreuse de l'os temporal. En effet, sur une coupe réalisée au niveau d'un canal semi-circulaire (Figure 46A), nous pouvons remarquer la présence d'une structure osseuse particulière, semblable à une coque protectrice délimitant deux territoires aux structures différentes. Dans la zone délimitée par la coque protectrice, on peut remarquer la présence de zones sous-colorées par l'éosine au sein d'une matrice fortement éosinophile, c'est-à-dire colorée en rose (Figure 46B). Ces territoires sous-colorés renferment des cellules de grandes tailles souvent regroupées par deux (Figure 46C).

### **II.2. Analyse de l'os pétreux après la coloration au rouge Sirius ou Picro-Sirius, puis observation à la lumière polarisée**

Cette coloration permet également de mettre en évidence la présence d'une coque protectrice orientée en regard des cavités composant l'oreille interne (Figure 47). On peut remarquer que les territoires précédemment peu colorés par l'éosine ne sont pas colorés par le rouge Sirius ; ils ne renferment donc pas de collagène de type I. Ces zones correspondent à du collagène de type II, principale protéine constitutive de la matrice cartilagineuse, et les cellules incluses dans cette matrice correspondent probablement à des chondrocytes.

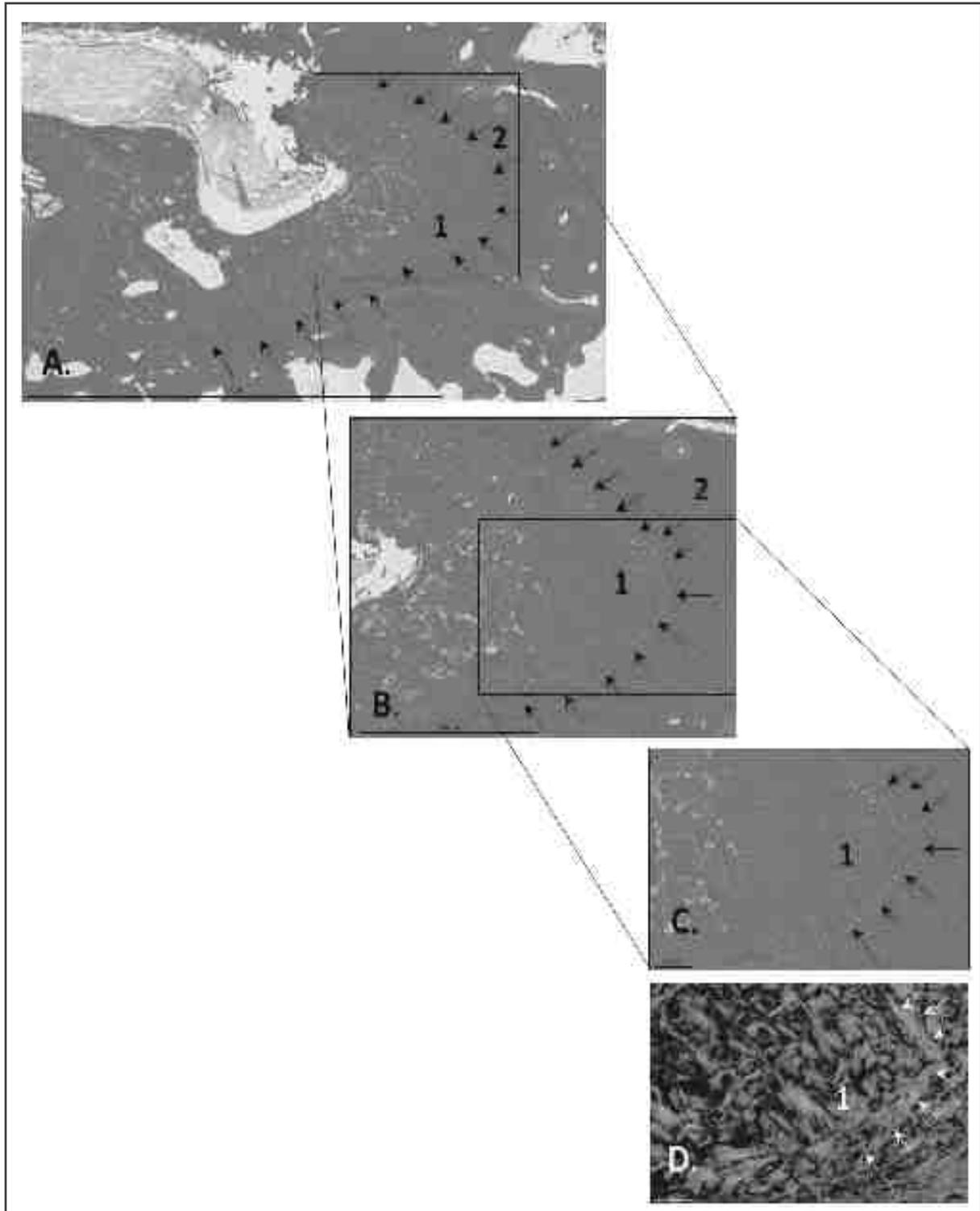
L'utilisation d'une lumière polarisée permet de mettre en évidence l'orientation des fibres de collagène. Ainsi, les fibres constituant la coque protectrice sont parallèles entre elles tandis que celles présentes à l'intérieur de cette zone délimitée s'entrecroisent sans orientation particulière. Ce territoire délimité par des fibres de collagène parallèles entre elles, est exempt d'ostéons secondaires qui ont un aspect particulier que l'on distingue aisément (Figure 48). En effet, ils correspondent à des structures centrées sur des vaisseaux sanguins associés à des fibres nerveuses et interviennent dans le développement et le remodelage du tissu osseux.

L'analyse de cette coupe histologique permet de réaliser, en regard des structures de l'oreille interne qui correspond au labyrinthe osseux, que cet os présente des structures très distinctes et atypiques pour un os du crâne. En périphérie, des fibres de collagène de type II, parallèles entre elles, forment une coque protectrice enserrant un territoire présentant des fibres de collagène de type II sans orientation particulière et incluant des restes chondraux. Ce second territoire présente une structure très particulière assimilable à un os resté à l'état immature. En effet, des territoires chondrocytaires résiduels persistent dans un os mature. Il semble donc, qu'alimenté par l'endolymphe et la périlymphe, le canal semi-circulaire du labyrinthe osseux soit un tissu osseux isolé, qui ne se remodèle pas au cours de la vie.



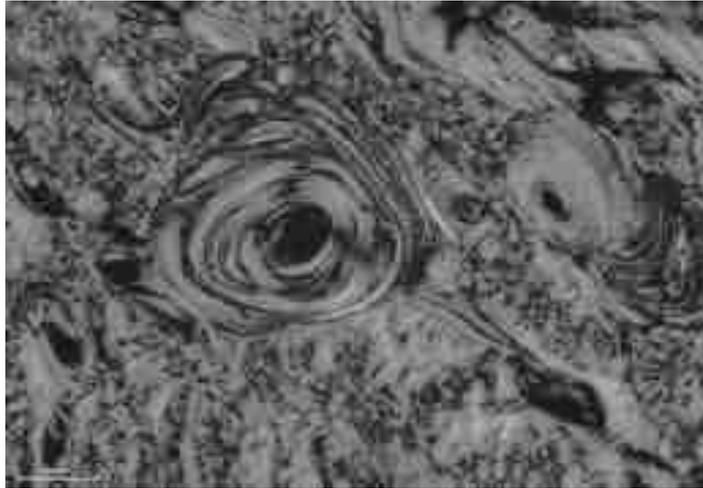
**Figure 46 : Coupe histologique de l'os pétreux au niveau d'un canal semi-circulaire, sectionné selon un plan sagittal (coloration H/E).**

- (A.) Deux structures osseuses sont visibles A.1 et A.2 délimités par les flèches en brun. Une structure osseuse particulière semble former une coque protectrice en regard du canal semi-circulaire.
- (B.) Zoom sur des lacunes sous-colorées par la coloration H/E.
- (C.) Un plus fort grossissement à partir de la figure B au niveau de cette zone peu colorée par l'éosine permet de visualiser des cellules de grande taille (indiqué par la flèche noir) souvent regroupées par deux au niveau des zones sous-colorées. Ces cellules sont évocatrices de chondrocytes.



**Figure 47 : Coupe histologique de l'os pétreux au niveau d'un canal semi-circulaire, sectionné selon un plan sagittal (coloration PS+ polarisation).**

- (A.) Deux structures osseuses sont toujours visibles A.1 et A.2 délimités par les flèches en noir. Une structure osseuse particulière semble former une coque protectrice en regard du canal semi-circulaire.
- (B.) Zoom sur la partie peu coloré par le PS.
- (C.) Un plus fort grossissement à partir de la figure B au niveau de la zone1 peu colorée par le rouge Sirius permet de visualiser des restes chondraux, constitués de collagène de type II et de chondrocytes.
- (D.) Le même grossissement à partir de la figure B au niveau de la zone1 en lumière polarisée permet de visualiser des restes chondraux, constitués de collagène de type II et de chondrocytes.



**Figure 48 : Coupe histologique d'un os cortical centrée sur un ostéon secondaire (coloration PS + polarisation).**

Les ostéons correspondent à des structures centrées sur des vaisseaux sanguins associés à des fibres nerveuses et interviennent dans le développement et le remodelage du tissu osseux.

### III. Analyse des STR autosomaux par électrophorèse capillaire

La qualité et/ou quantité d'ADN extrait à partir d'os pétreux ou de dents a été estimée par l'analyse des profils génétiques générés par le kit d'identification génétique humaine GlobalFiler® (Thermo Fisher Scientific). Ce kit permet l'amplification simultanée de 21 marqueurs STR autosomaux (STRa) compris dans des intervalles de tailles variant entre 70 et 450 paires de bases (pb) (Figure 49). L'intensité relative de la fluorescence (RFU : Relative Fluorescence Units) de chacun des allèles amplifiés nous a servi d'indicateur pour estimer lequel des deux substrats (os pétreux ou dent) livre l'ADN le mieux préservé.

#### III.1. Stratégie de l'étude à partir des marqueurs STR

En partant du principe que l'ADN endogène extrait de prélèvements squelettiques anciens correspond souvent à un ADN fortement fragmenté et présent en très faible quantité, nous avons choisi d'estimer la qualité des ADN extraits en se basant sur le résultat de l'amplification de fragments d'ADN de différentes tailles. Nous avons ainsi classé les marqueurs STR ciblés par le kit GlobalFiler® en deux groupes : les « marqueurs de petite taille » dont la taille des allèles varie de 70 à 275 paires de bases et les « marqueurs de grande taille » dont la taille maximale des allèles dépasse la valeur seuil de 275 pb (Tableau 2). Les allèles de petite taille peuvent être amplifiés même si l'ADN est dégradé tandis que ceux de grande taille ne le peuvent pas.

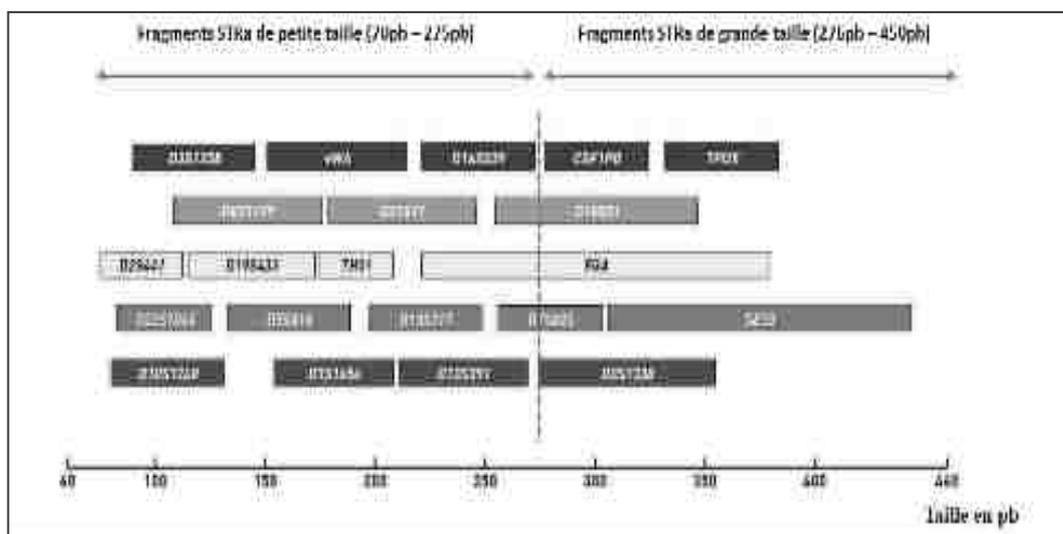


Figure 49 : Taille des allèles amplifiés par le kit GlobalFiler® pour chacun des loci STR.

Kit d'amplification PCR utilisé	Marqueurs STRa Petites tailles (70 à 275pb)		Marqueurs STRa Grandes tailles (275pb à 450pb)	
	Nbr		Nbr	
<b>GlobalFiler (Applied Biosystems)</b>	1	D2S441	1	D7S820
	2	D10S1248	2	D18S51
	3	D22S1045	3	D2S1338
	4	D3S1358	4	CSF1PO
	5	D8S1179	5	SE33
	6	D19S433	6	TPOX
	7	D5S818		
	8	vWA		
	9	D1S1656		
	10	TH01		
	11	D21S11		
	12	D13S317		
	13	D12S319		
	14	D16S539		
	15	FGA		

**Tableau 2 : Classement des marqueurs génétiques autosomaux par taille.**

### III.2. Interprétation d'un profil génétique autosomal

Un profil génétique établi sur la base de l'amplification de marqueurs STRa présente classiquement deux allèles (l'un hérité du père, l'autre de la mère) par locus amplifié (Figure 50). Si l'individu testé a hérité du même allèle de chaque parent, seul un allèle sera visible sur le profil (les deux allèles de même taille sont confondus). Dans le premier cas on parle d'individu hétérozygote pour le locus considéré, dans le second d'individu homozygote. Le nom de l'allèle correspond au nombre de répétitions contenu dans cet allèle ; ainsi, si au locus D3S1358 un individu présente les allèles 14 et 15, cela correspond à des allèles de 14 et 15 motifs répétés respectivement.

Sur un profil génétique, l'intensité des allèles amplifiés à chaque locus est indiquée en ordonnée par le nombre de RFU. Cette intensité correspond au nombre de molécules d'ADN amplifiées. La taille des fragments amplifiés est notée en abscisse. On remarque que plus la taille des allèles amplifiés augmente, moins l'intensité est élevée. Ceci est une caractéristique de l'ADN dégradé : les grands fragments, plus susceptibles d'être fragmentés, ne sont pas amplifiés.

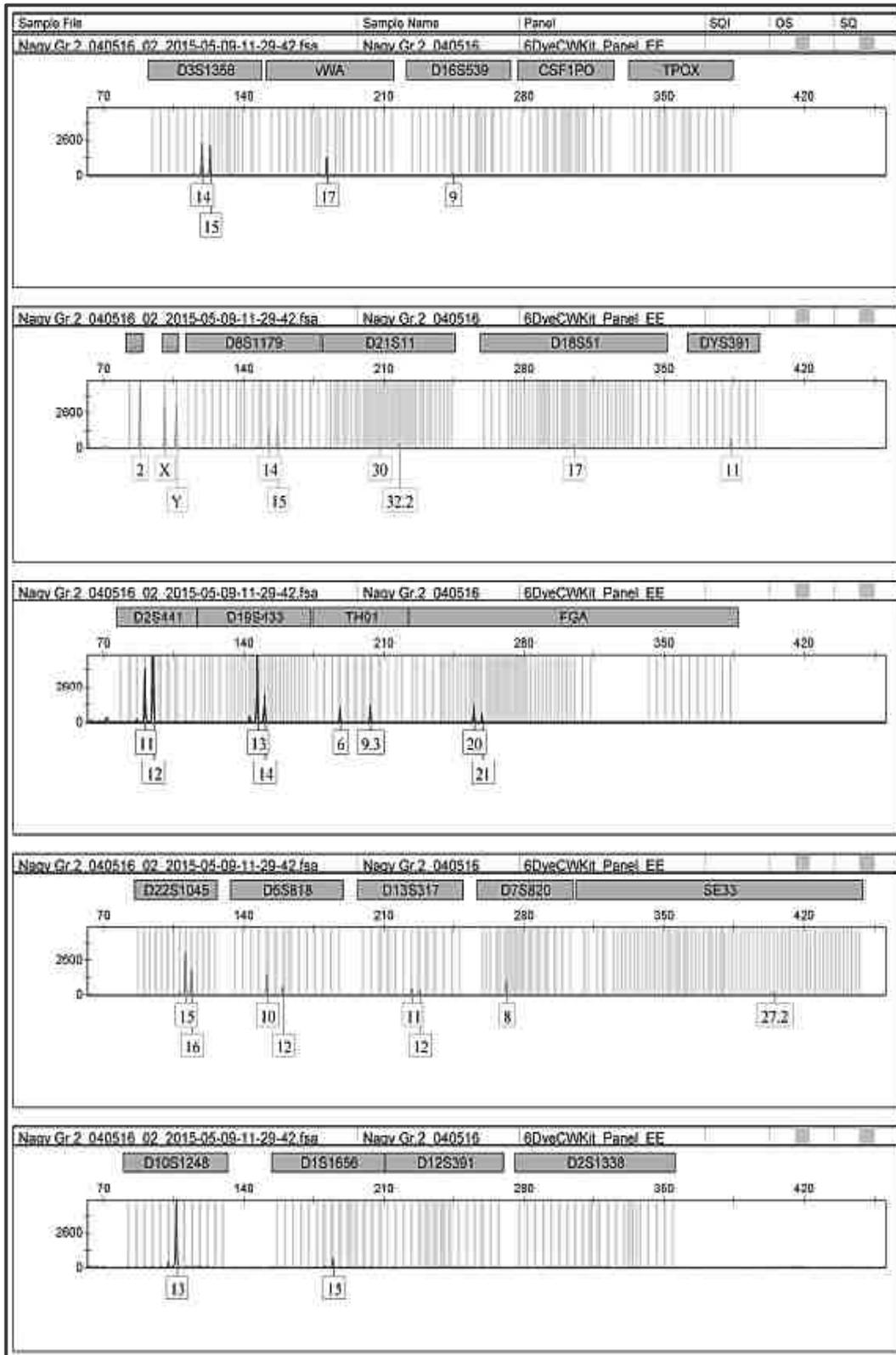
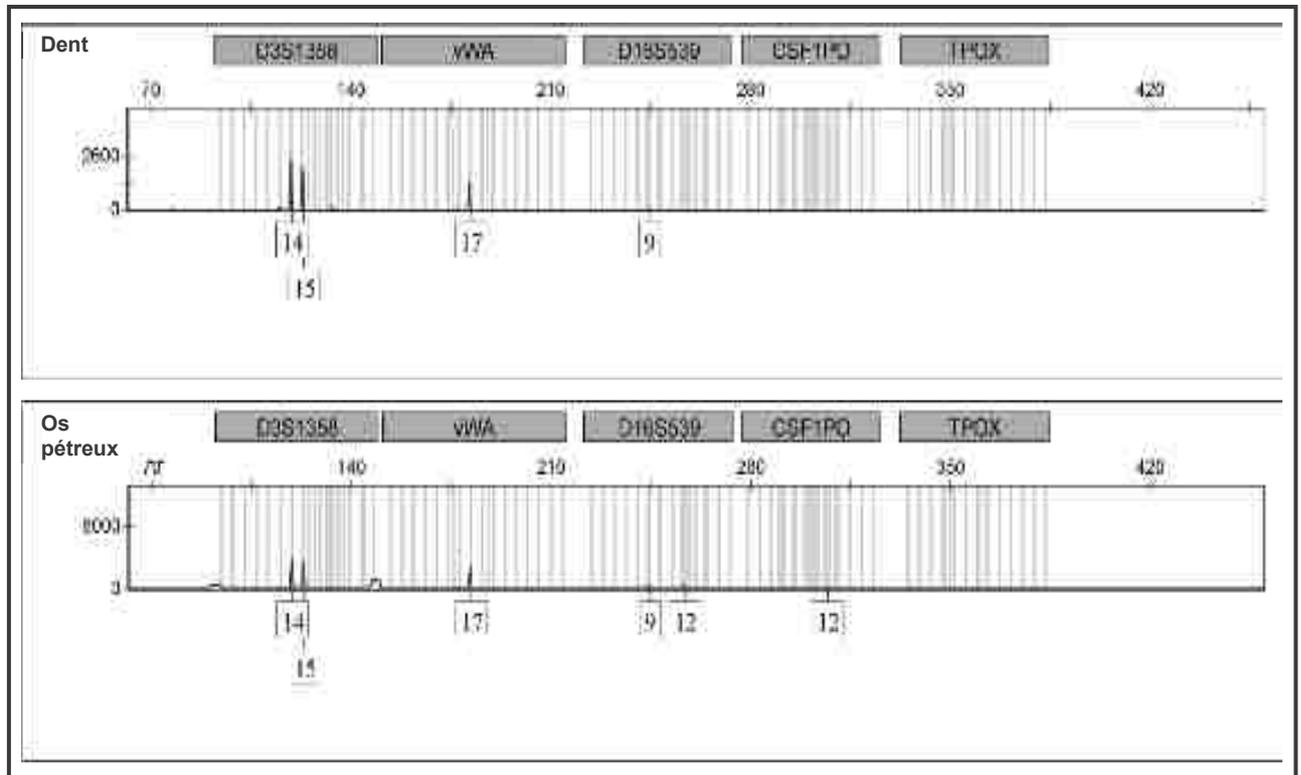


Figure 50 : Exemple d'un profil génétique obtenu après amplification des marqueurs STR ciblés par le kit GlobalFiler®.

Sur l'exemple de la Figure 51, on note que pour les loci D16S539 et CSF1PO, l'ADN extrait d'os pétreux permet l'amplification d'allèles non amplifiés à partir d'ADN extrait d'une dent issue du même individu. De plus, l'intensité des allèles amplifiés est supérieure pour le pétueux par rapport à la dent.



**Figure 51 : Comparaison des amplifications obtenues à partir d'une dent et d'un os pétueux pour un même individu.**

Sur cette figure, 5 des 24 marqueurs STRa du GlobalFiler® ont été représentés.



### III.3. Comparaison des profils STRa obtenus pour les paires os pétreux/dent issues d'un même individu

Afin de comparer la qualité de l'ADN extrait d'os pétreux et de dents, nous avons établi un profil génétique pour chacun d'eux et comparé les résultats obtenus. Pour chaque allèle amplifié, une valeur correspondant à l'intensité RFU a été obtenue. Ces valeurs ont été relevées pour chacun des deux substrats étudiés (Annexes 1 et 2). La moyenne de ces intensités RFU par substrat et par marqueur a alors été calculée. Nous avons ensuite effectué un test statistique (test de Student) sur l'ensemble des données afin de savoir si les moyennes calculées pour l'os pétreux et la dent étaient significativement différentes (Figure 52). Les valeurs obtenues pour chaque marqueur ont été considérées comme significativement différentes entre les deux substrats pour une valeur-p (ou p-value) inférieure à 0,05.

L'analyse du graphe de la Figure 52, révèle que les marqueurs de petite taille s'amplifient relativement aisément dans la majeure partie des cas aussi bien pour l'os pétreux que pour les échantillons dentaires (marqueurs D2S441 à D16S539). En revanche, on note une diminution de l'intensité de l'amplification (valeurs de RFU plus faibles) pour les marqueurs de plus grande taille. Ceci suggère une dégradation de l'ADN qui touche à la fois l'os pétreux et la dent.

Nous notons que pour 14 des 21 marqueurs STR autosomaux amplifiés, l'intensité RFU obtenue est significativement plus importante lorsque l'os pétreux est le substrat employé. Si l'on s'intéresse aux 14 « marqueurs de petite taille », 12 d'entre eux présentent une intensité significativement plus importante dans l'os pétreux. Alors que pour les 7 « marqueurs de grande taille » cette intensité n'est significativement plus importante que pour deux d'entre eux.

Au regard de ces résultats, l'ADN extrait de l'os pétreux ne semble pas être préservé de la dégradation puisque les fragments de grande taille ne sont pas amplifiés ou bien avec des intensités très faibles, non significativement différentes de celles obtenues à partir de la dent. En revanche, au vu des intensités RFU relevées pour les allèles de petite taille, il semble que cette dégradation affecte moins l'os pétreux que la dent.

## Discussion et conclusion

Plusieurs auteurs ont récemment démontré que la partie la plus dense de l'os pétreux, correspondant au labyrinthe osseux ou capsule otique, était susceptible de fournir de l'ADN de bien meilleure qualité que tous les autres substrats biologiques, facilitant les études de paléogénétique et -génomique (23) (22). Cette découverte est d'une importance considérable pour le domaine de l'ADN ancien mais également pour celui de la médecine légale (identification d'individus à partir de restes squelettisés).

Le présent travail de thèse avait un objectif double : (I) comprendre pourquoi l'os pétreux est décrit depuis peu comme le substrat biologique de choix pour les analyses d'ADN ancien ; (II) réaliser une analyse comparative visant à établir si l'os pétreux livre systématiquement un ADN bien préservé et donc des profils génétiques de meilleure qualité que ceux pouvant être obtenus à partir de dents, décrites jusqu'alors comme une source optimale d'ADN.

Pour répondre à ces questions, nous avons souhaité explorer la structure de l'os pétreux et la comparer à celle de dents au travers d'investigations histologiques mises en œuvre grâce à des collaborations développées avec des histologistes. Parallèlement, nous avons souhaité réaliser des analyses de biologie moléculaire visant à comparer, pour un même individu, la qualité de l'ADN extrait d'un os pétreux par rapport à celle d'une dent.

L'un des résultats les plus intéressants des analyses histologiques qui ont été menées a été la mise en évidence de deux structures complètement différentes entre l'os pétreux et la dent. La coupe de l'os pétreux a en effet révélé la présence d'une coque protectrice de fibres de collagène, ceinturant un territoire particulier et incluant des restes chondraux en contact avec les espaces périlymphatiques situés entre les labyrinthes osseux et membraneux. La persistance de territoires chondrocytaires résiduels atteste de la présence d'un os partiellement immature qui ne subit aucune résorption au cours de la vie d'un individu. L'absence d'ostéons secondaires dans ce territoire confirme l'absence de remodelage osseux ainsi qu'un apport sanguin très réduit. Ce résultat confirme les observations de Pinhasi *et al.* (2015) (23) selon lesquelles l'oreille interne présenterait une absence de résorption osseuse en regard de l'espace péri-lymphatique. Il va également dans le sens des travaux de Margaryan

*et al.* (2018) (28) selon lesquels la diversité microbienne est supérieure dans les dents par rapport à l'os pétreux. En effet, sans apport extérieur de sang, la capsule otique est préservée de l'entrée de certains microbes contrairement à la dent qui présente une riche vascularisation de la pulpe dentaire.

Le labyrinthe osseux bénéficie donc d'une relative protection des contaminations exogènes de par sa localisation anatomique mais également de par sa structure histologique particulière. Celle-ci, bien plus complexe que la structure dentaire, comprend des éléments conservés à l'état immature et à l'abri de tout remodelage osseux, comme en atteste l'absence de cicatrisation osseuse en cas de fracture (38).

Les analyses de biologie moléculaire réalisées au moyen du kit GlobalFiler® sur un ensemble de 33 échantillons comprenant un os pétreux et une dent pour 27 d'entre eux ont confirmé la nature dégradée de l'ADN datant de plusieurs centaines à plusieurs milliers d'années. En effet, l'analyse des profils génétiques obtenus montre clairement que les allèles amplifiés sont des fragments de petite taille (le plus souvent inférieure à 200 pb). Afin d'établir si l'os pétreux est un meilleur substrat que la dent, nous avons comparé l'intensité des allèles amplifiés « os pétreux-dent », celle-ci reflétant la qualité et, dans une moindre mesure, la quantité de l'ADN extrait. Ce que nous avons observé est que bien que cette différence d'intensité soit très marquée lorsque l'on considère les marqueurs génétiques de petite taille (l'os pétreux donnant systématiquement des valeurs plus élevées pour des allèles de taille inférieure à 250 pb), il y a peu de différences entre les deux substrats étudiés lorsque l'on s'intéresse aux marqueurs de grande taille. Ainsi, l'ADN contenu dans l'os pétreux, tout comme celui contenu dans la dent, subit des dégradations au cours du temps, un résultat déjà observé par Hansen *et al.* (2017) (47). Néanmoins cette dégradation pourrait être de moindre intensité puisque les fragments de petite taille restent plus nombreux dans l'os pétreux par rapport à la dent. Ce résultat explique pourquoi les études récentes de paléogénomique, qui utilisent des techniques de séquençage haut débit (ou NGS pour Nouvelles Génération de Séquençage) permettant l'analyse de petits fragments d'ADN (contrairement aux techniques classiquement utilisées) trouvent dans l'os pétreux un substrat de choix. Ce dernier étant protégé des invasions microbiennes, en plus d'être moins affecté par la dégradation, présente une quantité d'ADN endogène significativement plus importante que toute autre pièce osseuse.

En conclusion, ce travail de thèse d'exercice a permis d'apporter de nouveaux éléments quant à l'intérêt de choisir l'os pétreux plutôt que la dent comme source d'ADN pour des restes anciens et/ou dégradés. Par nos observations histologiques, nous avons pu confirmer que la structure atypique du labyrinthe osseux est plus favorable à la préservation de l'ADN que la structure dentaire, cette dernière étant plus exposée aux contaminations par de l'ADN exogène. Par nos analyses d'amplification de marqueurs STRa de différentes tailles, nous avons pu montrer que l'os pétreux, tout comme la dent, est soumis à des processus de fragmentation de l'ADN, mais de manière certainement plus modérée.

Au vu de ces résultats, il apparaît que le choix de l'os pétreux comme source d'ADN ne doit pas être systématique, surtout en absence de recours aux techniques NGS. En effet, il ne faut pas négliger le fait que même si des méthodes peu invasives de prélèvement de l'os pétreux ont été décrites (25), cela reste une méthode pouvant endommager irréversiblement des pièces osseuses de grande valeur archéologique. Chaque individu n'étant pourvu que de deux capsules otiques, l'impact du prélèvement sur l'intégrité d'une pièce est plus important qu'un prélèvement dentaire. Néanmoins dans certains cas, et notamment dans celui des individus immatures et dépourvus de dents, cette alternative pourrait se révéler de grande valeur.

Ce travail mérite d'être poursuivi selon plusieurs axes. Dans cette étude, l'organe dentaire a été prélevé dans sa totalité, sans distinction entre les différents tissus. Or la pulpe et le ciment semblent être les sources d'ADN les plus intéressantes d'une dent (46). La pulpe se dégradant avec le temps, certaines études ont sélectivement prélevé le tissu cimentaire pour leurs travaux (47). Nous pourrions donc envisager une analyse ciblant cette partie en particulier, même s'il s'agit d'un travail techniquement difficile et délicat. Il nous faudrait également augmenter le nombre d'échantillons testés afin d'obtenir des résultats statistiques plus significatifs. Il nous faudrait surtout coupler nos analyses de biologie moléculaire, basées sur des amplifications par PCR classiques à des analyses NGS. Enfin, il nous faudrait mettre au point une technique permettant d'estimer plus précisément la quantité d'ADN endogène disponible dans chacun des substrats.

## SIGNATURE DES CONCLUSIONS

Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire

Nom - prénom de l'impétrant : KRUMENACKER Laura

Titre de la thèse : Les pignons, une alternative à l'organe dentaire en pathogénétique ?

Directeurs de thèse : Professeur Christine KRYSHR  
Docteur Olivier L'HENNE

VU  
Strasbourg, le 13.11.18  
Le Président du Jury,

Professeur F. CLAUSS

**Dr François CLAUSS**  
MAGISTRAT DENTISTE STRASBOURG  
D'Honn.  
Hôpital des Hôpitaux de Strasbourg  
CHU de Strasbourg

Faculté de Chirurgie Dentaire de l'Université de Strasbourg - 11, rue de l'Industrie  
F-67000 Strasbourg - FRANCE - Tél : 03.88.53.2188

VU  
Strasbourg, le 13 NOV. 2018  
Le Doyen de la Faculté  
de Chirurgie Dentaire de Strasbourg,

Professeur C. TAUBENGRÖSS





## Références bibliographiques

1. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 25 avr 1953;171(4356):737-8.
2. Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S. Ancient DNA. *Nat Rev Genet*. mai 2001;2(5):353-9.
3. Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Pääbo S. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res*. 1 avr 1996;24(7):1304-7.
4. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. avr 1993;362(6422):709-15.
5. Willerslev E, Cooper A. Ancient DNA. *Proc R Soc B Biol Sci*. 7 janv 2005;272(1558):3-16.
6. Jobling MA, Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet*. oct 2004;5(10):739-51.
7. Gilbert MTP, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, et al. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PloS One*. 20 juin 2007;2(6):e537.
8. Willerslev E, Gilbert MTP, Binladen J, Ho SYW, Campos PF, Ratan A, et al. Analysis of complete mitochondrial genomes from extinct and extant rhinoceroses reveals lack of phylogenetic resolution. *BMC Evol Biol*. 11 mai 2009;9:95.
9. Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*. 15 nov 1984;312(5991):282-4.
10. Pääbo S. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *nature*. 1985;314(6012):644-645.

11. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
12. Woodward, Weyand N, Bunnell M. DNA sequence from Cretaceous period bone fragments. *Science.* 18 nov 1994;266(5188):1229-32.
13. Nicholls H. Ancient DNA Comes of Age. *PLOS Biol.* 15 févr 2005;3(2):e56.
14. Hofreiter M, Paijmans JLA, Goodchild H, Speller CF, Barlow A, Fortes GG, et al. The future of ancient DNA: Technical advances and conceptual shifts. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* mars 2015;37(3):284-93.
15. Crubézy E, Keyser C, Ludes B. Les surprises de l'ADN ancien. *La Recherche.* 2002;(353):44-7.
16. Sosa C, Vispe E, Núñez C, Baeta M, Casalod Y, Bolea M, et al. Association between ancient bone preservation and dna yield: a multidisciplinary approach. *Am J Phys Anthropol.* mai 2013;151(1):102-9.
17. Grunenwald A, Keyser C, Sautereau A-M, Crubézy E, Ludes B, Drouet C. Novel contribution on the diagenetic physicochemical features of bone and teeth minerals, as substrates for ancient DNA typing. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(n°19):4691-704.
18. Brundin M, Figdor D, Sundqvist G, Sjögren U. DNA binding to hydroxyapatite: a potential mechanism for preservation of microbial DNA. *J Endod.* févr 2013;39(2):211-6.
19. Bertran O, del Valle LJ, Revilla-López G, Chaves G, Cardús L, Casas MT, et al. Mineralization of DNA into nanoparticles of hydroxyapatite. *Dalton Trans Camb Engl* 2003. 7 janv 2014;43(1):317-27.
20. Campos PF, Craig OE, Turner-Walker G, Peacock E, Willerslev E, Gilbert MTP. DNA in ancient bone - where is it located and how should we extract it? *Ann Anat Anat Anz Off Organ Anat Ges.* 20 janv 2012;194(1):7-16.
21. Grimoud A BMM, Lodter J. Critères de sélection d'échantillons dentaires pour l'étude de l'AND ancien. *Antropo.* 2004;(6):43-51.

22. Gamba C, Jones ER, Teasdale MD, McLaughlin RL, Gonzalez-Fortes G, Mattiangeli V, et al. Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nat Commun.* 21 oct 2014;5:5257.
23. Pinhasi R, Fernandes D, Sirak K, Novak M, Connell S, Alpaslan-Roodenberg S, et al. Optimal Ancient DNA Yields from the Inner Ear Part of the Human Petrous Bone. *PLOS ONE.* 18 juin 2015;10(6):e0129102.
24. Zupanič Pajnič I, Petaros A, Balažic J, Geršak K. Searching for the mother missed since the Second World War. *J Forensic Leg Med.* nov 2016;44:138-42.
25. Sirak K, Novak M, Cheronet O. A minimally-invasive method for sampling human petrous bones from the cranial base for ancient DNA analysis. *BioTechniques.* 2017;62(6):283–289.
26. Haber M, Doumet-Serhal C, Scheib C, Xue Y, Danecek P, Mezzavilla M, et al. Continuity and admixture in the last five millennia of Levantine history from ancient Canaanite and present-day Lebanese genome sequences. *bioRxiv.* 2017;142448.
27. Pilli E, Vai S, Caruso MG, D'Errico G, Berti A, Caramelli D. Neither femur nor tooth: Petrous bone for identifying archaeological bone samples via forensic approach. *Forensic Sci Int.* févr 2018;283:144-9.
28. Margaryan A, Hansen HB, Rasmussen S, Sikora M, Moiseyev V, Khoklov A, et al. Ancient pathogen DNA in human teeth and petrous bones. *Ecol Evol.* 26 févr 2018;8(6):3534-42.
29. Legent F, Perlemuter L, Vandenbrouck CL. *Cahier d'anatomie O.R.L.* 2ème édition. Masson et Compagnie; 1975. 135 p.
30. Morneau B. LA GASTRULATION structure multi couches [Internet]. Docplayer. 2016 [cité 11 nov 2018]. Disponible sur: <https://docplayer.fr/12035637-La-gastrulation-structure-multi-couches.html>
31. Collège hospitalo-universitaire français de chirurgie maxillo-faciale et stomatologie. Item 35: Anomalies maxillo-faciales et développement

- buccodentaire [Internet]. Université Médicale Virtuelle Francophone. 2011 [cité 11 nov 2018]. Disponible sur: <http://campus.cerimes.fr/chirurgie-maxillo-faciale-et-stomatologie/enseignement/stomatologie3/site/html/1.html>
32. Pansky Ben. Review of Medical Embryology. Macmillan USA; 1982.
  33. Veillon F. Imagerie de l'oreille. Flammarion Médecine-Sciences; 1991. 483 p.
  34. Veillon F. Imagerie de l'oreille et de l'os temporal - Volume 5 : Pédiatrie. Lavoisier; 2013. 303 p.
  35. Franck H. Netter. Atlas d'anatomie humaine. 5ème édition. Elsevier-Masson; 2011. 616 p.
  36. Sick H, Veillon F. Atlas de coupes sériées de l'os temporal et de sa région : anatomie et tomodensitométrie. J. F. Bergmann Verlag München. 1988. 161 p.
  37. Forshaw R. Unlocking the past: The role of dental analysis in archaeology. Dent Hist Lindsay Club Newsl. 2015;60(2):51–62.
  38. Doden E, Halves R. On the functional morphology of the human petrous bone. Am J Anat. 1984;169(4):451-62.
  39. Kristensen HK. An improved method of decalcification. Stain Technol. juill 1948;23(3):151-4.
  40. Puchtler H, Waldrop FS, Valentine LS. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. Beitr Pathol. nov 1973;150(2):174-87.
  41. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochem J. juill 1979;11(4):447-55.
  42. Dzedzic-Goclawska A, Rozycka M, Czyba JC, Moutier R, Lenczowski S, Ostrowski K. Polarizing microscopy of Picrosirius stained bone sections as a method for analysis of spatial distribution of collagen fibers by optical diffractometry. Basic Appl Histochem. 1982;26(4):227-39.

43. Neparáczki E, Juhász Z, Pamjav H, Fehér T, Csányi B, Zink A, et al. Genetic structure of the early Hungarian conquerors inferred from mtDNA haplotypes and Y-chromosome haplogroups in a small cemetery. *Mol Genet Genomics*. 2017;292(1):201–214.
44. Neparáczki E, Kocsy K, Tóth GE, Maróti Z, Kalmár T, Bihari P, et al. Revising mtDNA haplotypes of the ancient Hungarian conquerors with next generation sequencing. *PloS One*. 2017;12(4):e0174886.
45. Higgins D, Kaidonis J, Townsend G, Hughes T, Austin JJ. Targeted sampling of cementum for recovery of nuclear DNA from human teeth and the impact of common decontamination measures. *Investig Genet*. 2013;4(1):18.
46. Higgins D, Austin JJ. Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review. *Sci Justice*. 2013;53(4):433–441.
47. 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*. 27 janv 2017;12(1):e0170940.