

La paléopathologie humaine à la découverte de l'ADN ancien (1980-2000) : **Fragments d'histoire immédiate***

*Human paleopathology discovering ancient DNA.
Some recent history*

par Pierre L. THILLAUD**

En conjuguant les méthodes de la pathologie à celles de l'histoire et les techniques de l'anthropologie physique à celles de l'archéologie, la paléopathologie se donne pour objectif d'identifier les traces des maladies sur les restes humains et animaux anciens. Cette discipline médico-historique permet au médecin de mieux connaître les maladies en étudiant leur histoire naturelle et à l'historien de retrouver à travers les maux dont elles souffraient, les conditions sanitaires et les modes de vie des populations du passé.

Deux branches forment la paléopathologie humaine : la paléopathologie organique et l'ostéo-archéologie. La première applique les méthodes et les techniques diagnostiques médicales les plus actuelles à l'étude des tissus mous anciens conservés naturellement ou artificiellement. La seconde dont le champ de recherche est limité aux seuls ossements, dispose de moyens

* Séance de janvier 2019.

** 69, boulevard Henri Sellier, 92150 Suresnes. pierre.thillaud@wanadoo.fr

d'investigation bien plus modestes se limitant à l'observation macroscopique des lésions osseuses, à leur imagerie médicale et à l'exploitation du dossier archéologique. C'est à elle cependant, qui peut s'appliquer à des grandes séries, que nous devons l'essentiel d'une connaissance toute relative des maladies d'avant l'histoire (1). En dépit de ces moyens d'investigation dérisoires ne nous autorisant qu'une perception très indirecte des maladies depuis les temps préhistoriques, la paléopathologie dégage trois certitudes fondamentales qui semblent devoir s'imposer à toute l'histoire de la médecine : la pérennité du génie morbide de la pathologie humaine ; la constance du réflexe de soins caractérisant les sociétés humaines ; la permanence de l'association du rationnel et de l'irrationnel dans la thérapeutique (2).

Au cours des années 1980, à la faveur des progrès réalisés dans le domaine de la génétique médicale, une troisième branche s'impose en Paléopathologie : la paléogénétique. Dans une démarche résolument transversale s'affranchissant de la nature tissulaire : osseuse, dentaire ou molle du spécimen analysé, la paléogénétique s'attache à la mise en évidence et à l'identification de l'ADN ancien. Au terme de délicates manipulations de clonage ou d'amplification enzymatique, des fragments d'ADN ancien spécifiques sont extraits de momies ou de squelettes, puis identifiés par analyse comparative de leurs profils de restriction, ou de séquençage au regard de séquences actuelles (3).

C'est à la naissance, aux progrès fulgurants et aux évolutions futures de cette discipline prometteuse mais exigeante appliquée aux restes humains anciens que nous consacrerons ces lignes. Cette « histoire immédiate » peut paraître prématurée. Nous ne le pensons pas. À trop attendre, la déconvenue qui marque le cours de la paléogénétique au terme de la période retenue, avait toutes les chances d'être définitivement masquée. L'examen d'un temps historique plus conforme n'aurait rapporté que la

dynamique générale de cette discipline sans être assuré de ne point omettre de souligner l'existence et les conséquences de ses inévitables inflexions.

Les premiers pas

Depuis la fin des années 1950, la paléontologie et la biologie moléculaire tentaient d'établir quelque passerelle à propos des relations phylogénétiques entre espèces actuelles, en comparant les séquences de protéines dites homologues qui, chez différentes espèces, assurent la même fonction (4). Vite après, deux chercheurs proposèrent d'évaluer à partir du taux de différences observé entre les séquences d'une protéine donnée chez deux espèces apparentées, la date de leur divergence (5). Cette phylogénie moléculaire se heurtait toutefois au mur de la préhistoire qui l'empêchait d'accéder à l'observation des séquences d'acides aminés anciennes, et plus précisément des nucléotides du passé. Vingt ans de recherches supplémentaires seront nécessaires pour que l'évolution des concepts et des outils assurent à l'archéologie moléculaire une destinée.

Comme il est trop souvent d'usage dans notre monde occidental - peut-être à titre incantatoire sinon conjuratoire - quelques observateurs attribuent la première extraction d'ADN ancien à une équipe de recherche chinoise. Elle aurait été réalisée en 1980, à partir d'une côte de la très fameuse « vieille dame de Shangsha » (tombe n°1 de Mawangtui) dont le corps incroyablement bien conservé, vieux d'environ 2000 ans (Dynastie Han), avait été exhumé des terres de la province de Hunan à la fin des années 1970. Plus assurément, la première relation d'une extraction d'ADN ancien provenant de tissus animaux fut publiée en 1984 par Higuchi *et al.* En l'espèce, il s'agissait d'un quagga naturalisé depuis près de 150 ans (6). Ancêtre de la famille des équidés, ce spécimen se révélait à cette occasion plus proche du zèbre que du cheval. Au mois de juin de la même année, Svante

Pääbo, jeune chercheur de l'université suédoise d'Uppsala, présentait au Deuxième colloque « Science in Egyptology » (Manchester, Angleterre, 26-30 juin 1984), une communication intitulée : « Is DNA preserved in ancient Egyptian mummies » (7).

Bien que très brève, la communication de Pääbo relate l'essentiel. Dans un premier mouvement, il démontre que des protéines extraites d'une tête de momie égyptienne antique peuvent être mises en évidence par électrophorèse mais aussi que leur état est très dégradé. Dans le mouvement suivant, il confirme qu'avec une coloration par l'acridine orange, spécifique pour l'ADN, appliquée sur quelques noyaux cellulaires issus de la préparation histologique d'un fragment de cartilage de l'oreille externe de cette même momie, il est possible de visualiser sous lumière ultraviolette, la présence de matériel génétique. Dans son ultime mouvement, l'auteur indique avoir réussi une extraction indirecte, par clonage bactérien, d'ADN très fragmenté de ce même spécimen mais que son état de dégradation physico-chimique était tel qu'il n'en permit pas l'identification génique.

L'année suivante, la publication dans la revue *Nature* des travaux de ce même auteur dans un article intitulé : « Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA » (8), marquait l'avènement de la paléogénétique humaine dans le petit monde de la paléopathologie. Pour la première fois, quelques fragments d'acides nucléiques, une séquence répétée de 3,4 kb, étaient extraits d'un corps humain, plus précisément d'une momie égyptienne d'enfant vieille de 2400 ans. Hélas, cet exploit obtenu à la faveur d'une technique peu fiable (Southern-blot) était dévastateur. La quantité d'ADN requise était telle qu'elle revenait à une destruction inacceptable du spécimen sélectionné. Devant ce constat, bien peu dans la communauté des paléopathologistes s'engagèrent à poursuivre l'aventure. C'était sans

compter sur l'extraordinaire dynamisme de la médecine du vivant qui, dans le même temps, consacrait à la génétique humaine des budgets colossaux et de nombreuses équipes de recherche. Le prix Nobel de médecine attribué en 1965, à François Jacob (1920-2013), André Lwoff (1902-1994) et Jacques Monod (1910-1976) pour la somme de leurs travaux sur l'ADN, n'était certainement pas étranger à la force de cet engagement scientifique sans précédent. Cette intense activité de recherche sauva l'acte fondateur de Pääbo. L'invention en 1987 de la PCR (Polymerase Chain Reaction) par Mullis et Faloona, fournissait un avenir à la recherche et l'identification de l'ADN ancien qui dès lors se suffisaient, grâce à l'amplification génique, de quelques traces d'acide nucléique (9).

La PCR permet d'obtenir l'amplification exponentielle d'une séquence d'ADN précise. Cette manipulation exige le repérage des deux régions, généralement composées d'une vingtaine de paires de base (pb), qui bordent la séquence à reproduire et sur lesquelles deux amorces synthétiques viendront s'hybrider. La PCR se fonde sur la propriété d'une enzyme, l'ADN polymérase, de synthétiser en présence de nucléotides libres, le brin complémentaire d'un simple brin d'ADN à partir d'une amorce. Les copies ainsi obtenues servent à leur tour de matrice pour une duplication exponentielle. Très vite, les améliorations apportées à cette manipulation firent de la PCR une technique simple, rapide mais extrêmement sensible, donc largement exposée au risque de la contamination. Le produit résultant de la PCR est ensuite soumis à électrophorèse. Cet amplicon (ou amplifiat) est alors séquencé par un automate. La séquence obtenue est alors identifiée au terme d'une analyse numérisée qui la compare à toutes les séquences référencées dans une banque de données internationale.

De nombreux obstacles restaient cependant à surmonter. Le plus redoutable d'entre eux était la contamination ; ce d'autant que l'ADN ancien demeurait un matériel dégradé par le temps comme par l'environnement et de ce fait toujours fragmentaire. Un ADN dégradé, transformé, fragmenté, victime des réactions d'hydrolyse et d'oxydation qui cassent ses brins et modifient ses bases. Ces dégradations sont initiées dans le milieu extérieur par une exposition à l'air libre, la présence d'eau, la nature de son pH, l'action des microorganismes ; et dans le milieu de conservation, par les manipulations intempestives et l'exposition aux rayons X. Ainsi fallut-il admettre qu'au-delà de 100 000 ans, l'ADN n'était plus exploitable et qu'en matière d'ADN ancien on ne pouvait espérer observer que quelques centaines de paires de bases. En conséquence, l'observation princeps de S. Pääbo sur un fragment de 3,4 kb n'aurait été que celle d'une contamination. Méprise, finalement, doublement bienvenue puisque annonciatrice d'une discipline médico-historique prometteuse mais également de ses strictes exigences.

Cette menace permanente de la contamination imposa la recherche du matériel d'étude le mieux adapté. Comme c'est à partir d'une momie égyptienne que fut obtenue la première extraction d'ADN humain ancien, la paléogénétique admit à ses débuts qu'elle tenait là le meilleur des matériels d'étude. Très vite elle se ravisa, prenant conscience que ses chances d'éviter la contamination relevait tout autant de la rigueur de ses procédures que des conditions de conservation et de confinement les plus susceptibles d'assurer la sauvegarde de l'acide nucléique ancien. Dans ces conditions, il est vite apparu que l'os et les dents présentaient de bien meilleures garanties. L'abondance de ce matériel d'étude dans le temps comme dans l'espace offrait en outre l'avantage d'accéder à de grandes séries autorisant des études génétiques de collectivités humaines. Celles-ci firent l'objet de

publications dès la fin des années 1980. Les coupes histologiques de pièces anatomopathologiques montées sur lame furent également considérées comme autant de sources potentielles d'ADN. Certaines nous viennent de la fin du XIX^{ème} siècle. Ces préparations demeurent cependant définitivement marquées des effets de leur fixation et parfois de leur décalcification. L'ADN extrait de ces spécimens ne le sera qu'à la faveur d'une amplification par PCR. Il se présentera toujours comme très dégradé et de faible poids moléculaire. Dans ces conditions, il faut bien convenir que ces études se placent plus au service de l'histoire des maladies qu'à celui de la paléopathologie. Pour autant, leurs résultats sont parfois très instructifs, à l'image des travaux de Corbitt et de Garry qui, dès 1990, retrouve ainsi la trace génomique du VIH ; le premier, chez un marin anglais mort à l'âge de 25 ans d'une pneumonie en 1959 (10), le second, chez un adolescent américain mort en 1968 (11). On peut aisément concevoir l'impact que ces découvertes propres à préciser l'histoire naturelle du Sida, purent avoir au cœur d'une pandémie qui mobilisait alors les énergies sanitaires du monde entier.

L'accès désormais facilité à l'observation de l'ADN ancien ouvrait un champ d'investigation extraordinaire. L'étude du matériel génétique d'organismes vivants issus du passé permettait une approche individuelle et collective bien plus précise de nos lointains ancêtres, de leur environnement sanitaire et des agents pathogènes qui les tourmentaient.

Très vite, trois orientations de recherche se distinguent. La première, d'ordre médico-historique, s'attache à la pathographie (12), à l'histoire naturelle des maladies et à celle des agents pathogènes. La deuxième, vise à établir les liens interpersonnels existant en termes de distance biologique, entre deux ou plusieurs individus exhumés d'une sépulture ou d'une nécropole. La troisième, tend à objectiver les relations interhumaines à l'échelle

des populations en termes d'échanges, d'interpénétrations ou de migrations.

L'exploration des hommes

La détermination du sexe impose à la paléogénétique d'extraire et d'amplifier de l'ADN nucléaire issu du seul chromosome Y, comme la courte région DYZI. Seule cette identification formelle affirmera le sexe masculin. Mais cet exercice est difficile, bien plus difficile que sur de l'ADN mitochondrial (13). Dès le début des années 1990, les liens de parenté ou d'appartenance à un même groupe, susceptibles d'allier un individu à un ou plusieurs autres ont pu être objectivés par la paléogénétique grâce à l'examen comparatif des polymorphismes de répétition des microsattellites et, plus généralement, des nombreuses séquences hypervariables (gènes DQ_{∞} , du système HLA et boucle D) réparties dans tout le génome nucléaire (14,15,16). Leur identification permet d'obtenir une empreinte génétique caractérisant le profil génétique d'un individu. Celle-ci est suffisamment spécifique pour autoriser une recherche de ses filiations et appartenances familiales. Ici encore, cette recherche sur l'ADN ancien passe par l'amplification PCR et le séquençage de ces zones polymorphiques très instructives.

La paléogénétique des populations a trois exigences : le nombre, la qualité de conservation des spécimens moléculaires et la capacité de financer les protocoles d'analyse requis. Les nécropoles ostéoarchéologiques et les grandes accumulations de momies satisfont à la première exigence. La seconde bénéficie des progrès constants de l'archéologie moléculaire. Seule, la troisième se heurte à des difficultés récurrentes. Ceci étant, cette archéologie moléculaire demeure soumise à un devoir de cohérence avec les observations de l'archéologie traditionnelle : anthropologique, linguistique et culturelle.

L'histoire de la formation et de l'évolution des espèces relève des études phylogéniques. Cet exercice se voit offrir par la paléogénétique des outils nouveaux. Longtemps contenues dans la seule comparaison non assurée des données morphologiques de la paléontologie pour une même espèce ou des espèces éloignées, la phylogénie bénéficie largement de l'accès à une approche moléculaire.

En 1963, Pauling et Zuckerkandl proposent le concept d'horloge moléculaire : les divergences génétiques entre deux organismes issus d'une même branche sont proportionnelles à leur éloignement dans le temps de leur évolution et permet d'établir leur date de séparation, formalisée par une distance génétique (17). À partir d'ADN mitochondrial, l'application de ces principes va permettre de suivre l'évolution des changements d'une espèce. Cet ADN mitochondrial présente en effet l'avantage, au regard de l'ADN nucléaire, d'être de petite taille (16500 paires de nucléotides chez l'Homme) et bien plus accessible puisque bien plus présent dans le cytoplasme des cellules. Il présente en outre la particularité d'offrir à l'observation quelques segments spécifiques, hypervariables, propres à chaque espèce comme à chaque population, et sujets à de très fréquentes mutations. A ce titre, l'ADN mitochondrial se prête tout particulièrement à l'étude des migrations des populations.

En 1992, Ross entreprend d'isoler de l'ADN à partir d'ossements d'un homme de Néandertal (18). En 1997, une comparaison de l'ADN mitochondrial de l'homme de Néandertal avec celui de l'homme moderne affirma que leur séparation phylogénétique datait d'environ 300 000 ans (19). Ainsi, l'homme de Néandertal n'aurait-il aucun lien avec l'homme moderne. Ce constat fut assez vite remis en cause après qu'on se fût aperçu que les dégradations de l'ADN mitochondrial pouvaient être les seules responsables de cette distance génétique

problématique. Plus tard, celle-ci fut confirmée (20). Pour autant, un éventuel brassage des gènes nucléaires restait à établir (21).

Offertes en théorie à une approche moléculaire, les études des migrations des populations humaines se heurtent toutefois au manque de grandes séries homogènes de séquences d'ADN ancien. Elles ne se fondent encore trop souvent que sur une comparaison avec des séries de séquences homologues d'ADN modernes qui elles-mêmes se révèlent trop éparses et fragmentaires. Le principe de ces recherches repose sur l'observation de la répartition des séquences polymorphes spécifiques d'une population qui pourrait être partagée avec d'autres populations dans des proportions variables, l'analyse de cette proportion permettant d'établir les liens qui les unissent. A cet égard, les études conduites sur l'ADN mitochondrial et les gènes impliqués dans le système HLA, sont les plus instructives. Elles ont permis de caractériser génétiquement les Africains, les Asiatiques, les Européens et les Amérindiens, restituant de la sorte la légitimité perdue pour un tout autre motif, de la notion de « race » chère aux anthropologistes depuis la fin du XIX^{ème} siècle jusqu'à l'entre-deux guerres de la première moitié du XX^{ème} siècle. C'est encore sur la base des résultats de cette paléogénétique indirecte que s'impose aujourd'hui le schéma migratoire de l'humanité qui depuis la Préhistoire porte l'homme de l'Afrique en Asie, puis en Europe et finalement vers les Amériques. Dans ce cadre, Rogan et Salvo et quelques autres ont pu attester de manière convaincante de la relation des Amérindiens avec les populations du Nord-Est asiatique (22).

Ceci étant, la limite fondamentale de la paléogénétique des populations est de tout autre nature. En effet, la multiplication des phénomènes migratoires sillonnant l'ensemble de notre planète depuis le XVIII^{ème} siècle nous dissimule irrémédia-

blement la réalité des mouvements et des interpénétrations antérieures des populations antiques et préhistoriques.

L'exploration des maladies

En matière de diagnostic rétrospectif, la paléopathologie fut longtemps cantonnée dans l'interprétation des lésions anatomopathologiques et leur association à des syndromes ostéo-archéologiques (23). La paléopathologie organique était plus chanceuse. Ses observations histologiques de tissus momifiés lui donnaient à observer quelques germes pathologiques. Dès 1913, Marc Armand Ruffer diagnostiqua de cette manière une bilharziose dans une momie égyptienne. Plus tard, certaines parasitoses furent identifiées à la faveur de l'observation de leurs différentes formes évolutives : œufs, kystes ou larves, assurant ainsi leur diagnostic spécifique. Avec l'amplification par PCR d'une fraction de leur génome, l'identification d'un nombre considérable d'agents pathogènes devenant possible, la paléopathologie accédait à une diagnose spécifique des maladies infectieuses dans le passé. Dans le même temps, elle apportait à leur histoire naturelle une contribution majeure (1).

Notre connaissance de l'histoire naturelle de la tuberculose, de la lèpre, de la peste et de la syphilis comme celle du paludisme et des trypanosomoses bénéficia grandement de la paléogénétique. Encore que, pour ces parasitoses, les progrès de l'immunologie sur les spécimens anciens la révélèrent plus performante. Au-delà de leur diagnose spécifique, ces études paléogénétiques permettent de mieux comprendre les modes de progression et de transmission de ces agents pathogènes.

Plus rare car bien plus fragile que l'ADN mitochondrial, l'extraction de l'ADN nucléaire ancien et la mise en évidence d'une mutation spécifique relèvent encore de la chance. C'est elle, à coup sûr, qui permit en 1995 un diagnostic de β -thalassémie sur la dépouille d'un enfant d'Israël, datée des XVIème-XVIIème

siècles, avec l'objectivation de la mutation spécifique de la β -globine (24).

Le premier ADN microbien ancien découvert fut celui du bacille de Koch. En 1993, il fut possible d'observer à partir d'un os médiéval une séquence d'insertion de 123 pb, nommée IS6110, spécifique du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, sans pour autant être en mesure d'en distinguer le sous-groupe (25). L'année suivante, la preuve de l'antériorité de la présence de la tuberculose en Amérique du sud avant l'arrivée des Européens, fut apportée avec l'identification de cette même séquence IS6110 dans un fragment de tissu pulmonaire prélevé sur une momie péruvienne datant d'environ 1000 ans (26). En 1997, Zink *et al.*, apportaient sur la base d'un prélèvement pratiqué sur une momie très incomplète d'un homme adulte mature datant du Nouvel Empire (Thèbes, 1550 – 1080 av. J.-C.), la plus ancienne preuve de tuberculose humaine confirmée par la paléobiologie moléculaire (27). Dès 2001, Zink *et al.*, repartaient à sa recherche sur 41 squelettes égyptiens anciens datés de 3000 à 500 ans av. J.-C., présentant ou non des lésions osseuses évocatrices de la tuberculose. A partir de 30 d'entre eux qui permirent une observation moléculaire, 9 se révélèrent porteurs du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Sur les 16 squelettes présentant les stigmates évidents ou évocateurs de cette maladie, 7 se sont révélés positifs. Plus important encore, sur les 14 autres individus dépourvus de toute lésion évocatrice de cette maladie, 2 se sont également révélés positifs (28).

Il apparut ainsi très vite aux paléopathologistes que si la paléogénétique est vraiment en capacité d'assurer un diagnostic de certitude même sur un spécimen ancien dépourvu de toute lésion anatomique apparente, ses résultats demeurent étroitement soumis à la conservation de leur ADN. Il fut également vite admis qu'un résultat négatif n'était pas exclusif du diagnostic

recherché et que, dans ces circonstances, les résultats issus de la paléogénétique ne sauraient être que complémentaires aux observations macroscopiques, microscopiques et radiologiques de la paléopathologie. Ceci étant, la mise en évidence de 30 p. cent de tuberculeux sur un aussi petit échantillon d'égyptiens antiques révèle au-delà des biais statistiques aisément opposables, une réalité de la tuberculose qui ne peut que servir notre connaissance des états sanitaires de l'Égypte ancienne.

En 1997, une méthode de génotypage plus rapide du *Mycobacterium tuberculosis* : le spoligotypage, permet de distinguer *M. bovis* et *M. africanum* du complexe (29). Dès 2003, Zinc *et al.*, se remirent à l'ouvrage à partir de l'examen moléculaire de 85 spécimens exhumés de la même nécropole de Thèbes (30). Cette fois encore, 30 p. cent d'entre eux se sont montrés positifs pour *M. tuberculosis*. Mais, contrairement aux certitudes d'alors faisant de *M. bovis* une souche antérieure à *M. tuberculosis*, il ne fut observé parmi les spécimens les plus anciens, que du *M. africanum* et sur les plus récents, que du *M. tuberculosis* mais aucun *M. bovis*. Ce résultat contraint les chercheurs à bouleverser encore une fois leur arbre phylogénique des *Mycobacteria* sans que pour autant celui-ci soit assuré.

En 1999, le colloque de Bradford, sur le présent et le passé de la lèpre fut l'occasion d'un premier bilan de la recherche paléogénétique sur le bacille de Hansen. Cette réunion scientifique venait conclure une trilogie consacrée aux grandes maladies infectieuses dites spécifiques causées respectivement par le tréponème (Toulon, 1993) et le bacille de Koch (Szeged et Budapest, 1997). Cette exploration du génome ancien de *Mycobacterium leprae* est concomitante à celle de *Mycobacterium tuberculosis*. En 1994, Rafi *et al.*, à partir d'un métatarse exhumé à Jérusalem, daté du XIV^e siècle, procèdent à une PCR visant à identifier le gène 65kDA, commun à toutes les *Mycobactéries* et le gène 3kDA,

spécifique de *Mycobacterium leprae*, mais ne parviennent pas à identifier formellement la lèpre (31). La détection spécifique de cette maladie se fonde et repose depuis sur l'amplification des séquences RLEP 1, RLEP 3 et 18kD qui se révèlent tout à la fois plus spécifiques et très sensibles. Cette recherche serait selon quelques auteurs, largement facilitée par la grande résistance que la paroi cellulaire des mycobactéries opposerait aux dégradations les plus habituelles. Cette proposition reste de nos jours largement sujette à débat. Très vite après, il a été possible de distinguer nettement la présence conjointe des deux mycobactéries responsables de la lèpre et de la tuberculose. Cette capacité d'analyse discriminante se révèle bien utile aux paléopathologistes qui souvent sont conduits à examiner des spécimens ostéoarchéologiques présentant un ensemble lésionnel associant les stigmates de ces deux maladies.

En 1998, Drancourt *et al.* détectent les premiers l'agent de la peste, *Yersinia pestis*, sur des squelettes exhumés de charniers à Lambesc (Provence) et Marseille, aménagés respectivement au cours des épidémies de 1590 et 1722 (32). Pour la première fois, les auteurs proposent de retenir les dents comme le meilleur sanctuaire d'ADN ancien. à partir de la pulpe dentaire recueillie sur des dents encore incluses préalablement coupées longitudinalement en deux, ils ont pu extraire de l'ADN par PCR et identifier certaines séquences des gènes *pla* et *rpoB*, spécifiques de *Yersinia pestis*.

À l'approche de l'an 2000, la syphilis reste encore rétive à toute exploration satisfaisante de son ADN ancien. Le colloque de Toulon, organisé en novembre 1993, autour de l'origine de la syphilis en Europe, ne rapporte que bien peu d'initiatives paléogénétiques. En 1990, Noordhoek *et al.*, ne peuvent en extraire que quelques rares loci spécifiques permettant toutefois d'objectiver à l'échelle moléculaire une possible distinction entre la syphilis

et le pian (33). Au vu de ces premiers résultats, il semblait alors acquis que la variabilité génétique de *Treponema pallidum* était très basse (34). La communication de Blondiaux *et al.*, relative à l'exploration très complète de deux dystrophies fémoro-tibiales exhumées de la crypte de l'abbatiale Saint-Géry de Cambrai, datées comme antérieures à 1453 et attribuées aux effets morbides de la syphilis, enregistre un échec dans son ultime recherche paléogénétique. La tentative d'amplification du gène *Tpp15* qui code une protéine membranaire spécifique de *Treponema pallidum*, n'aboutit à rien (35). En 1999, Kolman *et al.*, parviennent à ne retrouver qu'un court fragment non-spécifique du génome *T. pallidum*, à partir d'un prélèvement effectué sur le squelette d'un individu mort sur l'île de Pâques depuis moins de deux cents ans (36). Il faudra patienter jusqu'en juin 2018, pour accéder au séquençage complet de ce germe à partir de spécimens morts entre les XVII^{ème} et XIX^{ème} siècles, exhumés du couvent Sainte-Isabelle de la ville de Mexico (37).

Des lendemains difficiles ...

Ces vingt premières années d'exercice de l'archéologie moléculaire furent excitantes. Avec ses résultats sensationnels, la paléopathologie croyait bien disposer de sa martingale lui permettant d'accéder régulièrement à un diagnostic rétrospectif de certitude qui lui faisait depuis si longtemps défaut. Au moins pour la pathologie infectieuse, elle pourrait à l'avenir entreprendre une écriture plus assurée de l'histoire naturelle des agents infectieux et de la manière dont les hommes du passé ont réagi à leurs agressions morbides. Malheureusement, les premières années du XXI^{ème} siècle s'attachèrent à une évaluation sans concession de ces résultats spectaculaires. Très vite, il fallut admettre que la plupart des premières recherches en paléogénétique n'avaient pas vraiment pris la juste mesure du risque de

contamination et des exigences des techniques de laboratoire. Il fallut convenir que presque toutes manquaient de rigueur (38).

Les recherches d'ADN ancien de la lèpre réalisées par Drancourt se révélèrent contestables au motif du respect insuffisant des règles de sécurité dans l'exécution des protocoles d'extraction qui imposent : un laboratoire spécialement dédié à l'ADN ancien ; la reproduction des résultats dans d'autres laboratoires spécialisés ; et la mise en évidence concomitante de séquences d'ADN autres que celles de l'agent infectieux recherché (39). La même déconvenue vint fragiliser les travaux de Kolman sur la syphilis après que Bouwman et Brown, en 2005, suggérèrent après vérification qu'aucun ADN ancien de *T. pallidum* ne pouvait être extrait d'individus porteurs de lésions osseuses de syphilis tertiaire (40). Celles-là même qui invitaient les paléopathologistes à entreprendre une analyse paléogénétique spécifique. La détection de l'ADN ancien de la tuberculose n'échappa point à cette revue critique intransigeante. La séquence IS6110, séquence culte dans l'histoire de l'ADN ancien, se révéla n'attester que de *M. tuberculosis complex* (MTBC) mais incapable d'identifier la sous-espèce présente dans le spécimen. Les exercices phylogéniques sur le bacille de Koch entrepris au vu de ces résultats incomplets, furent dès lors mis en doute. Dans ce domaine, le spoligotypage initialement reconnu comme avantageux fut vite disqualifié pour être particulièrement mal adapté à la documentation de l'arbre phylogénique de l'agent de la tuberculose. Enfin, il est apparu que l'absence de clonage, procédure préalable désormais toujours nécessaire, lors des premières découvertes d'ADN ancien du bacille de Hansen, ne permettait plus de considérer les résultats annoncés comme formellement établis.

Au terme de ce véritable jeu de massacre, il convenait de réagir. Mais comment ? à vrai dire, cette analyse critique impitoyable

ne résultait que de l'évolution de la politique éditoriale des revues scientifiques. Le renforcement des compétences des comités de lecture des revues spécialisées en paléopathologie, en pathologie infectieuse et en génétique, semble bien à l'origine de cette remise en question systématique des premiers résultats de la paléogénétique. Il devait en outre permettre de rétablir la rigueur conforme aux exigences de son développement. Ceci étant, la paléogénétique conservait devant elle une belle marge de progression. Celle-ci vint à n'en pas douter des progrès continus dans les méthodes et les techniques d'extraction, d'amplification et d'identification qui désormais permettent en temps réel de maîtriser quantitativement et qualitativement la recherche de l'ADN ancien (41). Les techniques de séquençage multiple conduisent désormais l'amplification conjointe de tous les fragments utiles d'ADN contenus dans un échantillon. La mise en œuvre de ces techniques toujours plus performantes permet ainsi de décrypter, dès 2006, le génome mitochondrial d'un spécimen néandertalien, vieux de 38 000 ans (42).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) THILLAUD P.L. - *Paléopathologie humaine*, Kronos B. Y., Sceaux, 1996.
- (2) THILLAUD P.L. - « Les temps préhistoriques ». In : SICARD D., VIGARELLO G. ed. *Aux origines de la médecine*, Fayard, Paris, 2011.
- (3) HÄNNI C. - Recherche d'ADN dans les os anciens. Mém. DEA Anthropol., Montpellier III, 1991. DE LOS SANTOS I. - Méthodes d'extraction et d'amplification de l'ADN ancien. Mém. DEA Anthropol., Bordeaux I, 1993.
- (4) ANFINSEN C.B. - *The molecular basis of Evolution*, John Wiley and sons, 1959, Monograph, 128.
- (5) ZUCKERKANDL E., PAULING L.B. - " Molecule disease, evolution, and genetic heterogeneity". In : KASHA M., PULLMAN B. ed. *Horizons in Biochemistry*, Acad. Press, New York, 1962.
- (6) HIGUCHI R. *et al.* - " DNA sequences of the quagga, an extinct member of the horse family", *Nature*, 1984, 312, 282-284.

- (7) PÄÄBO S. - "DNA is preserved in ancient Egyptian mummies". In : DAVID A.R. ed. *Proceedings of the Science in Egyptology symposia*, Manchester Univ. Press, 1987.
- (8) PÄÄBO S. - "Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA", *Nature*, 1985, 314, 644-645.
- (9) MULLIS K.B, FALOONA F.A. - "Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase- catalysed chain reaction", *Meth. Enzymol.*, 1987, 155, 335-350.
- (10) CORBITT G., BAILEY A.S., WILLIAMS G. - "HIV infections in Manchester", 1959, *The Lancet*, 1990, 336, 51.
- (11) GARRY R.F. - "Early case of AIDS in the USA", *Nature*, 1990, 347, 509.
- (12) Pathographie : Biographie morbide des personnalités de l'Histoire. Voir : *Actes du 1er colloque international de pathographie (Loches, 2005)*, de Bocard, Paris, 2006.
- (13) HUMMEL S., HERRMANN B., - "Y-chromosomal DNA from ancient bones". In : HERRMANN B., HUMMEL S. ed. *Ancient DNA*, Springer-Verlag, 1994.
- (14) JEFFREYS A.J. - "Highly variable minisatellites and DNA fingerprints", *Biochemistry Soc. Transactions*, 1987, 15, 309-317.
- (15) HAGELBERG E., GRAY C.G., JEFFREYS A.J. - "Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis", *Nature*, 1991, 352, 427-429.
- (16) BROWN T.A., BROWN K.A. - "Ancient DNA and the archaeologist", *Antiquity*, 1992, 66, 10-23.
- (17) PAULING L., ZUCKERKAND E. - "Molecules as documents of evolutionary history", *J. Theoretical Biol.*, 1965, 8, 357-366.
- (18) ROSS P. - « Des fossiles éloquents », *Pour la Science*, 1992, 177, 52-60.
- (19) FRINGS M. *et al.* - "Neandertal DNA sequences and the origin of modern human", *Cell*, 1997, 90, 19-30.
- (20) BARRIEL V. - « La paléogénétique. » In : DUTOUR O., HUBLIN J.-J., VANDERMEERSCH B. ed. *Objets et méthodes en paléanthropologie*, CTHS, Paris, 2005, (Orientations et méthodes, 7).
- (21) ORLANDO L., HANI C. - « Du nouveau pour l'ADN ancien », *Soc. Fr. Génétique*, 2000, 16, I-XVI.
- (22) RAGAN P., SALVO J.-J. - " Study of nucleic acids isolated from ancient remains", *Yearbook of Phys. Anthropol.*, 1990, 33, 195-214.

- (23) THILLAUD P.L., CHARRON P. - *Lésions ostéo-archéologiques, recueil et identification*, Kronos B. Y., Sceaux, 1994.
- (24) FILON D. *et al.* - "Sequence analysis reveals a β -thalassemia mutation in the DNA of skeletal remains from the archeological site of Akhziv, Israel", *Nature genetics*, 1995, 9, 365-368.
- (25) SPIGELMAN M., LEMMA E. - "The use of PCR to detect Mycobacterium tuberculosis in ancient skeletons", *IJOA*, 1993, 3, 137-143.
- (26) SALO W.L. *et al.* - "Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA in a pre-columbian Peruvian mummy", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 1091-1094.
- (27) ZINK A. *et al.* - "Morphological and molecular evidence for pulmonary and osseous tuberculosis in a male Egyptian mummy", In : PALFI G., DUTOUR O., *Tuberculosis, past and present*, GB/TF, Budapest, 1999.
- (28) ZINK A. *et al.* - "Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population", *J. Med. Microbiol.*, 2001, 50, 355-366.
- (29) SOLA C. *et al.* - « Développements récents du spoligotypage appliqués à l'étude de l'épidémiologie, de la biodiversité, et de la phylogénie moléculaire du complexe Mycobacterium tuberculosis », *Pathol. Biol.*, 2000, 48, 921-932.
- (30) ZINK A. *et al.* - "Characterisation of Mycobacterium tuberculosis complex from Egyptian mummy by spoligotyping", *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41, 359-367.
- (31) RAFI A. *et al.* - "Mycobacterium leprae DNA from ancient bone detected by PCR", *The Lancet*, 1994, 343, 1360-1361.
- (32) DRANCOURT M. *et al.* - "Detection of 400-year-old Yersinia pestis DNA in human dental pulp : an approach to the diagnosis of ancient septicemia", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 12637-12640.
- (33) NOORDHOEK G.T. *et al.* - "PCR and synthetic DNA probes : a means of distinguishing the causative agents of syphilis and yaws ?", *Infection and Immunity*, 1990, 58, 2011-2013.
- (34) SAINT-GIRONS I. *et al.* - "Genome structure of spirochetes", *Research in Microbiol.*, 1992, 143, 615-621.
- (35) BLONDIAUX J. *et al.* - « Deux tréponématoses osseuses antérieures à 1543 ». In : DUTOUR O., PALFI G., *L'origine de la syphilis en Europe, avant ou après 1493 ?*, Edit. Errance, Paris, 1994.

- (36) KOLMAN C.J. *et al.* - "Identification of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* in a 200-year-old skeletal specimen", *J. Infect. Diseases*, 1999, 180, 2060-2063.
- (37) SCHUENEMANN V.F. *et al.* - Historic *Treponema pallidum* genomes from colonial Mexico retrieved from archaeological remains, *PLOS*, June 21, 2018, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006447>.
- (38) BARNES I., THOMAS M.G. - "Evaluating bacterial pathogen DNA preservation in museum osteological collections", *Proc. Royal Soc.*, 2006, B 273, 645-653.
- (39) GILBERT M.T. *et al.* - "Absence of *Yersinia pestis*-specific DNA in human teeth from five European excavations of putative plague victims", *Microbiology*, 2004, 150, 264-265. Response to Drancourt and Raoult, *Microbiology*, 2004, 150, 264-265.
- (40) BOUWMAN A.S., BROWN T.A. - "The limits of biomolecular palaeopathology : ancient DNA cannot be used to study venereal syphilis", *J. Archaeol. Sci.*, 2005, 32, 703-713.
- (41) WILBUR R.E., STONE A.C. - "Using ancient DNA techniques to study human disease". In : BUIKSTRA J., ROBERTS C., *The global history of paleopathology : pionners and prospects*, Oxford Univ. Press, Oxford, 2012.
- (42) GREEN R.E. *et al.* - "Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA", *Nature*, 2006, 444, 330-336.

RÉSUMÉ

Dans un exercice d'histoire immédiate propre à conserver le souvenir des errances premières de toute discipline scientifique émergente, l'auteur rapporte les premiers pas, les progrès fulgurants, les déconvenues et les évolutions futures de la paléogénétique des restes humains anciens.

SUMMARY

In a piece of immediate history intended to save the memory of the inevitable errors in any emerging scientific field, the author relates the first steps, the flashing advances, the disappointments and the developments to come in the field of palaeogenetics of ancient human remains