

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PALÉOMICROBIOLOGIE:
UTILISATION DE L'ADN FOSSILE DES SITES ARCHÉOLOGIQUES DU MUSÉE DE
POINTE-À-CALLIÈRE COMME MARQUEUR D'ÉVÉNEMENTS HISTORIQUES.

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN BIOLOGIE

PAR
MARJORIE COLLETTE

JUIN 2025

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, Cassandra Lazar, ainsi que tous les membres de mon laboratoire pour leur soutien et l'aide qu'ils m'ont apporté durant toute la durée de ce projet. Je tiens également à remercier les archéologues et les historiens du musée de Pointe-à-Callière, Hendrik Van Gijsegem, Louise Pothier et François Gignac pour nous avoir permis de réaliser ce projet avec eux. Enfin, je veux remercier ma famille et mon conjoint pour leur présence et leur soutien dans les moments difficiles.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	x
RÉSUMÉ	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCTION	1
1.1 Les microorganismes des sols et des glaciers	1
1.2 Les microorganismes fossiles dans les sites archéologiques	2
1.3 Histoire de la fondation de Montréal.....	3
1.4 La paléomicrobiologie	3
1.5 Fossilisation des microorganismes.....	4
1.6 Méthode d'extraction, de séquençage et d'analyses des microorganismes	5
1.7 Une nouvelle technique archéologique via les microorganismes.....	7
1.8 Objectifs et hypothèses.....	8
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES	11
2.1 Site d'études et échantillonnage.....	11
2.2 Marquage des temps géologiques et découpe des carottes.	12
2.3 Extraction d'ADN & d'ARN, (RT-)PCR et séquençage	14
2.4 Séquençage et analyses bio-informatiques	16
2.5 Analyses statistiques	16
III. RÉSULTATS.....	18
3.1 Délimitation des époques temporelles pour chaque carotte récoltée.....	18
3.2. Identification taxonomique des communautés microbiennes basées sur l'analyse des gènes ARNr 16S et 18S.....	20
3.2.1. Communautés des Bactéries.....	20
3.2.2. Communautés des Eucaryotes.....	21
3.2.3. Communautés des Archées.....	23
3.3. Analyses basées sur la diversité alpha	24
3.3.1. Communautés de Bactéries	24
3.3.2. Communautés des Eucaryotes.....	29
3.3.3. Communautés des Archées.....	33

3.4 Diversité beta et corrélation avec les variables environnementales	39
3.4.1. Communautés des Bactéries	39
3.4.2. Communautés des Eucaryotes	41
3.4.3. Communautés des Archées.....	43
3.5 Taxons discriminants qui expliquent les différences entre groupes d'échantillons	45
IV. DISCUSSION.....	48
4.1 La diversité alpha est plus importante dans les couches supérieures que dans les couches profondes	48
4.2 La composition des communautés microbiennes varie en fonction des époques et des lieux..	49
4.3 Les microorganismes correspondent aux faits historiques du lieu.....	52
4.3.1 Corrélation entre les taxons microbiens fossiles retrouvé et les activités humaines du site F2	52
4.3.2 Corrélation entre les taxons microbiens fossiles retrouvé et les activités humaines du site F3	53
4.3.3 Corrélation entre les taxons microbiens fossiles retrouvé et les activités humaines du site F4	54
V. CONCLUSION.....	56
ANNEXE A : Kit d'extraction	57
ANNEXE B : Protocole de rétrotranscription	58
ANNEXE C : Amorces PCR	63
ANNEXE D : Conditions des PCR	64
ANNEXES E : PCOA des communautés microbiennes complètes	65
ANNEXE F : PCOA des communautés microbiennes complètes avec les noms des échantillons.	68
ANNEXE G : Taxonomie ADN & ARN	71
ANNEXE H : Taxonomie ARN uniquement	74
ANNEXE I : LefSe des communautés complètes.....	77
BIBLIOGRAPHIE.....	79

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Site d'échantillonnage du Musée Pointe-à-Callière. Les trois sites échantillonnés, F2, F3 et F4, sont séparés de plusieurs mètres et ont été choisis en fonction des différentes activités anthropiques qui s'y sont déroulées (F1 a été abandonné et une seule carotte a été conservée pour le site F3). 12*
- Figure 2: Profil temporel estimé des carottes échantillonnées sur les trois sites, établi par les archéologues du musée de Pointe-à-Callière lors de l'examen visuelle des strates apparentes pendant l'échantillonnage (époque « a » en jaune, époque « b » en noir et époque « c » en gris). 19*
- Figure 3: Identification taxonomique des communautés bactériennes fossiles. Abondance relative en fonction des cm (indiquée en début du nom des échantillons) de profondeur pour chaque carotte des sites F2, F3 et F4. 21*
- Figure 4: : Identification taxonomique des communautés eucaryotes fossiles. Abondance relative en fonction des cm (indiquée en début du nom des échantillons) de profondeur pour chaque carotte des sites F2, F3 et F4. 22*
- Figure 5: Identification taxonomique des communautés archées fossiles. Abondance relative en fonction des cm (indiquée en début du nom des échantillons) de profondeur pour chaque carotte des sites F2, F3 et F4. 23*
- Figure 6: Droites de régression linéaire de l'indice de diversité de Shannon (H') bactérienne fossile en fonction de la profondeur des carottes (cm) pour chaque site (F2, F3 et F4). 25*
- Figure 7: Boxplot de la diversité alpha des bactéries fossiles en fonction des différentes époques (a, b et c) pour chaque site. 28*
- Figure 8 : Droites de régression linéaire de l'indice de diversité de Shannon (H') des eucaryotes fossiles en fonction de la profondeur des carottes (cm) pour chaque site (F 2, F3 et F4). 30*
- Figure 9: Boxplot de la diversité alpha des eucaryotes fossiles en fonction des différentes époques (a, b et c) pour chaque site. 32*
- Figure 10 : Droites de régression linéaire de l'indice de diversité de Shannon (H') des archées fossiles en fonction de la profondeur des carottes (cm) pour chaque site (F 2, F3 et F4). 35*
- Figure 11 : Boxplot de la diversité alpha des archées fossiles en fonction des différentes époques (a, b et c) pour chaque site. 38*

Figure 12: Analyse par PCoA (Principal Coordinates Analysis) de la diversité des ASVs (Amplicon Sequence Variants) bactériens fossiles dans les différents sites en fonction de la profondeur et du pH des sols. 40

Figure 13 : Analyse par PCoA (Principal Coordinates Analysis) de la diversité des ASVs (Amplicon Sequence Variants) eucaryotes fossiles dans les différents sites en fonction de la profondeur et du pH des sols. 42

Figure 14 : Analyse par PCoA (Principal Coordinates Analysis) de la diversité des ASVs (Amplicon Sequence Variants) archées fossiles dans les différents sites en fonction de la profondeur et du pH des sols. 44

Figure 15 : Résultats de l'analyses par LefSe (Linear discriminant analysis Effect Size) des genres bactériens fossiles entre les différents sites, avec un score de LDA supérieur à 4. La distance utilisée est « Bray-Curtis ». 46

Figure 16: Résultats de l'analyses par LefSe (Linear discriminant analysis Effect Size) des genres eucaryotes fossiles entre les différents sites, avec un score de LDA supérieur à 4. La distance utilisée est « Bray-Curtis ». 47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des échantillons obtenus pour chaque carotte, avec les numéros des cm de profondeur (du moins profond au plus profond). Pour chacun de ces échantillons, l'ADN et l'ARN ont été extraits. 15

Tableau 2 : Résumé du modèle utilisé pour les droites de régression linéaire de la diversité alpha bactérienne, avec un R² ajusté de 0.5327, une statistique-F de 14.68 et une p-value de 3.903e-09. 26

Tableau 3: Résultats de l'analyse de variance (Anova, Type II) de l'indice diversité de shannon bactérien en fonction des différents facteurs et de leur interaction. 27

Tableau 4: Résumé du modèle utilisé pour les boxplot des de la diversité alpha bactérienne, avec un R carré ajusté de 0.6355, une F-value de 18.44 et une p-value de 1.614e-11. 28

Tableau 5: Résumé du modèle utilisé pour les droites de régression linéaire de la diversité alpha eucaryote, avec un R² ajusté de 0.5976, une statistique-F de 11.39 et une p-value de 3.195e-06. 31

Tableau 6: Résultats de l'analyse de variance (Anova, Type II) de l'indice diversité de shannon eucaryote en fonction des différents facteurs et de leurs interactions. 32

Tableau 7: Résumé du modèle utilisé pour les boxplot des de la diversité alpha eucaryote, avec un R² ajusté de 0.7334, une statistique-F de 19.71 et une p-value de 1.546e-08. 33

Tableau 8 : Résumé du modèle utilisé pour les droites de régression linéaire de la diversité alpha des archées, avec un R² ajusté de 0.2273, une statistique-F de 2.765 et une p-value de 0.04026. 36

Tableau 9 : Résultats de l'analyse de variance (Anova, Type II) de l'indice diversité de shannon des archées en fonction des différents facteurs et de leur interaction. 37

Tableau 10: Résumé du modèle utilisé pour les boxplot des de la diversité alpha des archées fossiles, avec un R² ajusté de 0.4215, une statistique-F de 5.372 et une p-value de 0.00173. 38

Tableau 11: Tableau de résultat de la Permanova (Permutational Analysis Of Variance) de notre modèle multivarié, expliquant l'importance des différentes variables sur la diversité bactérienne fossile. Le R² ajusté du modèle est de 0.5063129. 40

Tableau 12: Tableau de résultat de la Permanova (Permutational Analysis Of Variance) de notre modèle multivarié, expliquant l'importance des différentes variables sur la diversité eucaryote fossile. R² ajusté du modèle = 0.5875692. 42

Tableau 13: Tableau de résultat de la Permanova (Permutational Analysis Of Variance) de notre modèle multivarié, expliquant l'importance des différentes variables sur la diversité archées fossile. R2 ajusté du modèle = 0.6718634 44

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
PCR	Polymerase Chain Reaction
ASV	Amplicon Sequence Variant
ANOVA	Analysis of Variance
PERMANOVA	Permutational Analysis of Variance
unc.	Unclassified
PCoA	Principal Coordinates Analysis
LefSe	Linear discriminant analysis Effect Size

RÉSUMÉ

Les microorganismes des trois domaines du vivant, Eucaryotes, Bactéries et Archées, sont composés d'ADN, qui porte l'information génétique, et d'ARN (messagers, ribosomiques, etc...). L'ADN étant plus stable que l'ARN, lorsqu'un microorganisme meurt, l'ARN se lyse alors plus rapidement que l'ADN qui peut quant à lui persister dans l'environnement et, sous certaines conditions, se fossiliser. Nous savons que les microorganismes évoluent et se développent en fonction du milieu dans lequel ils se trouvent, ils peuvent donc nous permettre de retracer l'histoire d'un site archéologique comme celui qui date de la fondation de la ville de Montréal ainsi que les évènements qui l'ont précédé (occupations des peuples autochtones, changements environnementaux, etc...).

En récoltant des carottes de sol sur trois sites historiques du musée de Pointe-à-Callière, nous aurons les périodes les plus récentes en surface, tandis que les périodes datant de plusieurs milliers d'années seront retrouvées au plus profond. En étudiant les microorganismes de chaque strate, nous pourrions associer certains taxons aux différentes époques, et donc à différents évènements. Cela nous permettra ensuite de comparer nos résultats avec ceux des historiens quant aux activités associées aux lieux et de voir s'il est possible d'utiliser la paléomicrobiologie comme méthode pour compléter les études archéologiques.

Mots clés : écologie microbienne, séquençage MiSeq-Illumina, bio-informatique, communautés microbiennes, rétrotranscription

ABSTRACT

Microorganisms in the three domains of life - Eukaryotes, Bacteria and Archaea - are composed of DNA, which carries genetic information, and RNA (messenger, ribosomal, etc...). Since DNA is more stable than RNA, when a microorganism dies, the RNA lyses more rapidly than the DNA, which can persist in the environment and, under certain conditions, fossilize. We know that microorganisms evolve and develop according to the environment in which they are found, so they can enable us to trace the history of an archaeological site such as the one that dates to the founding of the city of Montreal, as well as the events that preceded it (occupations of aboriginal peoples, environmental changes, etc.).

By collecting soil cores from three historic sites at Pointe-à-Callière's museum, we'll be able to find the most recent periods on the surface, while periods dating back thousands of years will be found at greater depths. By studying the microorganisms in each stratum, we'll be able to associate certain taxa with different periods, and therefore different events. This will then enable us to compare our results with those of historians as to the activities associated with the sites, and to see whether paleomicrobiology can be used as a method to complement archaeological studies.

Keywords: microbial ecology, MiSeq-Illumina sequencing, bioinformatics, microbial communities, reverse transcription

I. INTRODUCTION

1.1 Les microorganismes des sols et des glaciers

La dernière glaciation qui a eu lieu au Canada, connue sous le nom de glaciation du Wisconsin, a commencé il y a environ 100 000 ans et a pris fin il y a environ 10 000 ans (Ice Age geology, 2017). Le glacier qui s'est répandu, l'Inlandsis Laurentidien, a modifié la composition en plantes, minéraux et microorganismes des couches terrestres. À la suite de cette dernière période glaciaire, le continent a été marqué par de nombreuses oscillations climatiques, qui ont continué d'influencer la dynamique des sols et les communautés de microorganismes qui colonisent les sols, en surface et en profondeur (Jean-Claude Duplessy et al, 1998). Le sol est un mélange de matière organique et minérale complexe qui ne se comporte pas comme un substrat inerte. Au contraire, comme l'ont expliqué P. Roger et J.L. Garcia (2001), les produits microbiens ou constituants cellulaires, comme l'ADN ou les protéines, peuvent être soustraits aux processus de dégradation par adsorption sur les colloïdes minéraux ou organiques, ce qui les stabilisera et permettra leur fossilisation. La fossilisation des organismes vivants (animaux, plantes & microorganismes) dépend en partie du type de sol dans lequel il se trouve : la plupart des fossiles se trouvent dans des roches sédimentaires (P. Roger et J.L. Garcia, 2001 ; Eric Capo et al. 2022). Il existe de nombreux types de sédiments différents, marqué par des communautés microbiennes distinctes : en effet, celles-ci sont étroitement liées à leur milieu puisqu'elles vont interagir avec les composés organiques du sol et influencer certaines de ces propriétés physico-chimiques (structure, pH, etc...). On retrouve toute sorte de microorganismes dans le sol appartenant aux 3 domaines du vivant: ce sont soit des Eucaryotes (champignons, algues et protozoaires), soit des Procaryotes (Bactéries et Archées). Ils représentent une biomasse considérable et ont des rôles très importants et variés. Dans beaucoup de sols, les Eucaryotes les plus présents sont les champignons. Cependant, dans les sols hydromorphes (qui sont des sols à haute saturation en eau stagnante ou de l'alternance d'humidité et de sécheresse), souvent argileux, on retrouve des proliférations d'algues. Les Eucaryotes, souvent aérobies ou anaérobies facultatifs, seront retrouvés en surface alors que les Bactéries, autant aérobies qu'anaérobies, coloniseront toutes les profondeurs. On retrouve notamment les bactéries nitrifiantes et ammonifiantes, qui

respectivement, oxydent l'ammoniac et décomposent les substances organiques azotées ainsi que des bactéries hétérotrophes qui vont jouer un rôle important dans le recyclage du carbone, notamment en décomposant la matière organique (lignine, cellulose, etc....) ou inorganique. Les Archées représentent également une partie substantielle de la biomasse microbienne. Les recherches menées sur elles dans les milieux dits extrêmes ont montré qu'elles sont omniprésentes et abondantes dans tous les environnements terrestres et marins, à différentes profondeurs.

1.2 Les microorganismes fossiles dans les sites archéologiques

L'archéologie est la science qui étudie le passé humain, elle permet de reconstituer l'histoire de l'humanité, de la préhistoire à nos jours. Elle se base sur l'observation de vestiges matériels d'une activité exercée par l'être humain. Cependant, lors de ces études, les chercheurs utilisent les artefacts retrouvés sur les sites de fouilles et les sources littéraires liées aux activités humaines passées, pour retracer l'histoire liée à des vestiges. Mais lorsqu'ils manquent de données, certains moments de l'histoire restent incertains et laissent place à des hypothèses. En écologie, des études ont déjà démontré l'importance de l'ADN environnemental dans la recherche, notamment dans le domaine de la conservation et l'étude de la biodiversité (Barnes & Cameron R. Turner, 2015 ; Mikkel Winther Pedersen et al. 2015).

Dans notre étude, nous nous intéressons à l'histoire de la fondation de Montréal, qui remonte au 17^e siècle : les vestiges associés au fort de Ville-Marie, ainsi que du Château de Callière, datent des premiers établissements français de 1642 (A. Lefrancois-Leduc & M. Johnson-Gervais, 2013). Les résultats de certaines études ont montré que les activités humaines antérieures ont des impacts sur les communautés microbiennes (J. Michael Köhler et al. 2023). Ces communautés de microorganismes varient en fonction des conditions environnementales (aérobie, anaérobie, concentration en matière organique et inorganique, etc...) (J. Michael Köhler et al. 2023) et depuis presque 4 siècles, les sols ont été modifiés par l'être humain, induisant ainsi des changements aux niveaux des communautés microbiennes qui les composent. En associant ces différentes communautés à des activités humaines passées ou à l'environnement les ayant entourés, nous

avons essayé de retracer des fragments de l'histoire de Montréal avant le début de l'occupation par les premiers colons, lors de l'occupation autochtone et avant eux, de remonter au temps de la dernière ère glaciaire à travers le paysage microbien. Cette étude nous a donc permis de faire un voyage à travers le temps en répertoriant par strates, les communautés microbiennes fossilisées du site du fort de Ville-Marie.

1.3 Histoire de la fondation de Montréal

Les sites archéologiques que nous allons étudier sont liés aux vestiges du fort de Ville -Marie, ainsi que ceux du Château de Callière, qui datent des premiers établissements Français de 1642 (A. Lefrancois-Leduc & M. Johnson-Gervais, 2013). Les historiens séparent en sept périodes leur découverte (A. Lefrancois-Leduc & M. Johnson-Gervais, 2013), allant de la fin de la dernière ère glaciaire à nos jours : (1) les glaces se retirent du Québec il y a environ 10,000 ans, et Montréal est recouvert pas les eaux qui resteront jusqu'à il y a environ 5,000 ans. Lorsqu'elles se retirent, les Premières Nations autochtones s'installent dans la région et commencent à modifier leur environnement. À partir du Xe siècle, ils pratiquent notamment la culture sur brûlis, et ce, jusqu'à (2) l'arrivée des premiers colons français en 1642 et la construction du Fort de Ville -Marie. Cette période 3 prend fin en 1688 avec (3) la construction du château de Callière vers 1690. Une nouvelle période (4) s'inscrit en 1765 après la destruction du château de Callière par un incendie. Des infrastructures sont reconstruites sur le domaine de Callière et sa parcellisation est terminée entre 1787 et 1801. Le domaine disparaîtra définitivement en 1805 et laissera place aux bâtiments commerciaux. Ces ensembles sont séparés en trois phases : (5) la phase Dunlop a lieu jusqu'à 1842, suivie de (6) la phase Gillespie jusqu'en 1879 et enfin, (7) la phase Smith jusqu'à aujourd'hui (Francine Lelièvre, 2017). Notre échantillonnage nous permettra de récupérer des strates terrestres allant de la période (1) à (3).

1.4 La paléomicrobiologie

La paléomicrobiologie permet l'étude de microorganismes anciens (souvent pathogènes dû aux études souvent axées sur l'homme), il s'agit d'une discipline combinant la microbiologie et la paléontologie étudiant les microfossiles de microbes afin d'ajouter des données

complémentaires sur l'étude des activités anthropiques passées. Des études ont été déjà faites sur l'ADN environnemental, aussi appelé ADNe, qui correspond au matériel génétique retrouvé dans les matériaux biologiques rejetés (M.A. Barnes et C.R. Turner, 2015) ainsi que sur l'ADN ancien, aussi appelé ADN_a (qui correspond à l'ADN fossile), retrouvé dans les fossiles d'êtres humains. Ainsi, des génomes de trois momies ont pu être étudiés pour éclaircir l'histoire de la population égyptienne en utilisant leur ADN mitochondrial et le séquençage à haut débit (Verena J. Schuenemann et al, 2017). Il a été prouvé par ces recherches en génétiques et métagénomiques que l'ADN pouvait servir à compléter et même à corriger des études archéologiques. Il existe d'autres méthodes que le séquençage pour identifier les microorganismes actifs, comme l'hybridation in situ en fluorescence (ou FISH), mais elle ne permet pas de différencier les communautés microbiennes fossiles des communautés microbiennes actives (Erwan G. Roussel et al. 2009). L'utilisation de séquençage basé sur le gène ARNr 16S et 18S est donc indispensable dans notre étude.

Si on applique l'écologie microbienne (qui consiste à étudier les interactions des microorganismes entre eux et avec leur environnement) à la paléomicrobiologie, cela nous permet de savoir quelles communautés microbiennes ont existé il y a plusieurs centaines, voire milliers d'années (Eric Capo et al. 2022) et quels sont les processus environnementaux qui les ont affectées. La biodiversité microbienne est étroitement liée à son environnement et à un rôle très important au sein des écosystèmes (R. Giguère-Tremblay, 2020; Li. J et al, 2019; Fierer.N, 2006), il est donc important de pouvoir la mesurer.

1.5 Fossilisation des microorganismes

La microbiologie consiste notamment à étudier les organismes microscopiques des trois grands domaines du vivant : Bactéries, Archées et Eucaryotes. Tous sont composés d'ADN et d'ARN, qui portent l'information génétique et sont spécifiques à chaque espèce composant chaque communauté. Une séquence d'ADN est toujours constituée de quatre nucléotides : A, G, C et T ; tandis que la séquence d'ARN, sera toujours composée des nucléotides : A, C, G, et U (le U remplaçant le T). Le séquençage permet d'identifier les microorganismes retrouvés dans nos

échantillons en déterminant la succession des bases A,T,C et G de l'ADN et nous permet d'associer ces séquences d'ADN à celles présentes dans les bases de données pour identifier les différents microorganismes présents. Nous avons donc besoin de connaître quelles étaient les gènes actifs ou fossiles dans nos sols, et pour cela, il est nécessaire de faire une rétrotranscription de l'ARN en ADN complémentaire avant de pouvoir séquencer les gènes activement transcrits. Cela dit, il existe plusieurs différences entre ces deux polymères, notamment au niveau de leur structure et de leur durée de vie. Alors que l'ADN est formé de deux brins complémentaires et antiparallèles formant une double hélice, l'ARN est formé d'un seul brin. De ce fait, lorsqu'un organisme meurt, son ADN peut subsister dans l'environnement pendant plusieurs années voire des centaines d'années, et certaines parties de la molécule d'ADN peuvent être ainsi fossilisées. En revanche, l'ARN se dégrade beaucoup plus rapidement et donc les organismes identifiés dans un environnement grâce à l'ARN sont généralement considérés métaboliquement actifs au moment de l'échantillonnage (Eric Caporaso, 2022).

En étudiant ces deux polymères, il est possible de distinguer les microorganismes dont l'ADN est fossilisé de celui des microorganismes encore vivants. L'importance de la fossilisation est connue pour la sauvegarde des biomolécules (Colin Smith et al. 2003), et des études montrent l'utilisation de l'ADN ancien (ADNa) comme marqueur de temps et d'évènements à travers les siècles, notamment dans les sédiments lacustres (Laura Parducci et al. 2017). De plus, les résultats de certaines études ont montré que les activités humaines antérieures ont des impacts sur les communautés microbiennes (J. Michael Köhler et al. 2023). Cependant, aucune étude ne suggère de se focaliser sur l'ADN microbien fossilisé dans le cadre d'études archéologiques comme nous l'avons fait ici.

1.6 Méthode d'extraction, de séquençage et d'analyses des microorganismes

Même si l'intérêt pour le monde microscopique existe depuis l'antiquité, c'est en améliorant le microscope et en mettant en évidence dès le XVIIe siècle l'existence des bactéries qu'Antonie Van Leeuwenhoek apparaît comme le précurseur de l'étude des microorganismes. Au cours du temps, de nouvelles techniques d'étude de ces microorganismes ont été mises en place, dont de

nombreuses techniques de séquençage, notamment le séquençage par la méthode de Sanger (Sanger et al, 1977) et, aujourd'hui, par la méthode à haut débit. Les scientifiques ont cherché à étudier la diversité microbienne et à en faire une classification en utilisant d'autres critères que les seuls traits morphologiques et physiologiques des microorganismes : par l'analyse du gène ribosomique ARNr 16S chez les Procaryotes (C.R. Woese et al, 1977; Pace et al, 1986), et 18S chez les Eucaryotes. Ces gènes sont universels chez tous les microorganismes et sont très étudiés, ce qui facilite l'identification et la comparaison des séquences. L'utilisation de gènes hautement conservés, comme les gènes 16S et 18S, est très importante car ce sont ceux qui sont les plus présents dans l'environnement (Eric Capo et al. 2022). Les progrès en biologie moléculaire ont permis d'approfondir les connaissances en écologie microbienne en rendant possible l'étude de communautés complexes (identification taxonomique et composition des communautés) en peu de temps. Il existe deux approches pour l'étude de la diversité : la métagénomique Shotgun ou le séquençage amplicons (A. Escobar-Zepeda et al. 2015). L'analyse de séquence amplicon est définie comme le métaprofilage : c'est une analyse basée sur un seul gène. Au lieu d'utiliser l'ensemble du génome de tous les microorganismes d'un échantillon, on cible un gène (ici le gène ARNr 16S/18S) qui permettra l'étude taxonomique ou phylogénétique de tous les membres d'une communauté microbienne complexe et volumineuse (A. Escobar-Zepeda et al. 2015). La préparation et le séquençage de bibliothèques amplicons par des plateformes telles qu'illumina MiSeq ou Ion Torrent PGM permettent d'effectuer ces études en laboratoire à des coûts raisonnables. Étant utilisés comme marqueur phylogénétique depuis plus de quarante ans, les gènes ribosomiques sont largement présents dans les banques de données, et permettent donc l'identification de presque tous les microorganismes retrouvés dans un échantillon.

Les communautés microbiennes peuvent être représentées par deux indices de diversités : la diversité Alpha et la diversité Beta. La diversité Alpha, qui est à la fois la richesse spécifique et l'abondance relative de chaque espèce, est souvent utilisée comme indicateur de biodiversité. Afin d'estimer la diversité spécifique d'un échantillon, l'indice de Shannon, noté (H'), est fréquemment employé. La diversité Beta représente quant à elle le degré de similarité entre deux communautés microbiennes ou plus. Il définit la spécificité d'une communauté au sein d'une

région. Ces variations de communautés peuvent être liées à l'ajustement des espèces lors de l'histoire évolutive de leurs environnements (changements climatiques, activités humaines, etc...). Pour mesurer cette différence, on utilise un indice de similarité ou dissimilarité. Tout comme la diversité Alpha, il sera calculé avec le nombre d'espèces présentes et l'abondance relative de ces dernières (R. giguèretremblay, 2020).

1.7 Une nouvelle technique archéologique via les microorganismes

Aujourd'hui, aucune étude ne semble utiliser l'ADN microbien fossile comme marqueur archéologique. En effet, l'écologie microbienne permet de définir la place des microorganismes au sein du réseau trophique et leur rôle dans leur habitat, auquel ils sont étroitement liés. De ce fait, ils sont également liés à toutes les activités humaines qui ont eu lieu sur un site archéologique, ainsi qu'aux conditions environnementales. Cette étude, qui lie l'archéologie à la paléomicrobiologie, et qui s'élargit aux communautés des trois domaines du vivant, nous a permis de suivre les variations de l'environnement et des activités humaines qui se sont déroulées sur le lieu de la fondation de Montréal, le Fort Ville-Marie (Francine Lelièvre, 2017), la première construction européenne de l'île juste après l'occupation autochtone. Par exemple, nous pouvons nous attendre à retrouver des *Dadabacteria* dans des milieux marins, terrestres, et hydrothermaux, où cette bactérie peut dégrader les peptidoglycanes (J. Michael Köhler et al. 2023), ou *Zixibacteria* dans des milieux riches en sulfure d'hydrogène provenant de processus de tannerie, tels que la fourrure, la corne et les cheveux (J. Michael Köhler et al. 2023). Des abondances élevées de certaines communautés microbiennes, ou la présence de microorganismes que l'on trouve rarement dans ces environnements sont souvent corrélées à l'impact humain. Chez les Bactéries, de façon générale, on retrouve fréquemment les classes et phylums des Alphaproteobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Firmicutes, Gammaproteobacteria, Acidobacteria, Betaproteobacteria et Deltaproteobacteria dans l'étude des sols. La proportion des Archées (1% - 40%) et des Eucaryotes est très variable, elle dépend du type de sol étudié et des activités humaines ayant eu lieu (Sébastien Terrat et al. 2018 ; Eric Capo et al. 2022 ; J. Michael Köhler et al. 2023).

Les méthodes archéologiques actuelles ne conduisent pas toujours à des réponses exactes, souvent dues au manque d'artéfacts retrouvés, et laissent place à des hypothèses. La méthode mise en place dans ce projet a pour but de compléter ces recherches, en se basant sur la diversité microbienne : elle permettra de vérifier ces hypothèses et, en cas de désaccord entre archéologues, d'apporter des précisions sur les études réalisées pour mettre en lumière des données connues mais possiblement mal comprises. Cette étude est non seulement importante d'un point de vue scientifique, mais également historique. La diversité microbienne spécifique à chaque site et à chaque période historique a été corrélée à des activités humaines passées ou à des changements d'environnement. Les résultats obtenus au musée de Pointe-à-Callière nous ont permis d'éclaircir le passé des habitants de Montréal. Enfin, cette nouvelle technique a permis un accroissement des connaissances du Canada sur ses sols, et, à plus long terme et à plus grande échelle, le but est de créer une nouvelle norme pour faire avancer l'archéologie moderne et faciliter le travail des archéologues.

1.8 Objectifs et hypothèses

Les avancées scientifiques et les connaissances de l'histoire jouent des rôles importants dans l'évolution des civilisations humaines. Les objectifs de cette étude étaient de mettre en place une base de données de la diversité des communautés microbiennes fossiles afin de corréliser ces microorganismes à des activités humaines ou à des changements environnementaux passés, et de pouvoir éclaircir le passé des habitants de Montréal. Puis dans un second temps, de créer une nouvelle norme pour faire avancer l'archéologie moderne.

Les microorganismes sont présents dans tous les environnements, dans tous les sols et milieux marins depuis des millions d'années. Contrairement au phénomène de dormance où les microorganismes restent intacts, lorsqu'ils meurent, ils laissent dans leur environnement leurs acides nucléiques qui selon les types de roches et sols pourront fossiliser plus ou moins facilement. Considérant que l'ADN environnemental peut être préservé pendant des milliers d'années, on s'attend à en retrouver dans nos échantillons. En absence de perturbation (remaniement des sols), la déposition des sédiments avec le temps dans les sols signifie que les

couches plus profondes sont plus anciennes, alors que celles près de la surface sont les plus récentes. Notre première hypothèse stipulait donc que **la diversité alpha est plus importante dans les couches supérieures que dans les couches profondes (H1)**. Nous pensions que la diversité aller évoluer dans ce sens dû à la succession des évènements historiques. L'environnement ayant changé de façon successive ces dernières centaines d'années, notamment avec l'arrivée des activités humaines, nous pensons que les communautés microbiennes se sont diversifiées pour s'adapter à ces nouveaux environnements, et ont augmenté au cours du temps.

Étant donné que nos trois sites étudiés sont le siège de différentes activités humaines et que les microorganismes ont tous des fonctions et des méthodes d'adaptations différentes, notre seconde hypothèse spécifie que **la composition des communautés microbiennes varie en fonction des époques et des lieux (H2)**. Nous nous attendions à retrouver des microorganismes des trois domaines sur chaque site. Pour les époques les plus lointaines, nous pensions que la structure des communautés microbiennes allait être similaire entre les lieux, dues à l'exposition à un environnement comparable, tandis que pour les époques les plus récentes, nous pensions que la structure des communautés allait être plus variée entre les lieux dus aux activités humaines très diversifiées dans l'enceinte du Fort de Ville-Marie.

L'étude des communautés microbienne de chaque site nous a permis d'identifier les évènements qui s'y sont déroulés au cours du dernier millénaire. Par exemple, nous savons que certaines bactéries sont dites symbiotiques, c'est le cas des bactéries fixatrices d'azote que l'on retrouve dans la rhizosphère, qui peuvent témoigner que des plantes cultivées par l'homme étaient présentes sur le site. Des études réalisées aux endroits les plus hostiles de la planète ont montré qu'aucun environnement n'était stérile, on retrouvera donc des microorganismes quelques soit l'environnement ayant existé. La présence constante de microorganismes dans les sols nous permet de supposer que l'ADN fossile peut être utilisé dans les études archéologiques et d'émettre la troisième hypothèse qui stipule que **l'identités des taxons significatifs détectés dans les différentes couches historiques correspondent et peuvent être un témoin des faits historiques du lieu (H3)**, et cela grâce aux corrélations pouvant être faite avec les données

archéologiques et historiques du site. Nous pensions être en mesure de générer une base de données répertoriant les différents taxons de microorganismes, en fonction des différentes époques.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Site d'études et échantillonnage.

L'échantillonnage a été réalisé le 28 novembre 2022 au Musée Pointe-à-Callière, sur le site de fondation du fort Ville-Marie, construit à l'arrivée des premiers colons en 1642. Les carottes de sol ont été prélevées à l'aide d'un carottier manuel (Eijkelkamp soil & water) de 40 cm de profondeur et de 53 mm de diamètre. Grâce aux recherches des archéologues et historiens réalisés sur ces sites, nous savons que cette profondeur est suffisante pour atteindre nos objectifs (première civilisation, mer de Champlin et dernière air glacière). Selon les sites, nous avons forés à différentes profondeurs pour préserver au mieux ces sites historiques. Nous avons prélevé trois carottes sur trois sites distincts : F2 (environ 25 cm), F3 (environ 12 cm) et F4 (environ 30 cm) (le site F1 a été abandonné), séparés de plusieurs mètres, qui, selon les archéologues, ont été le lieu de diverses activités humaines au Fort de Ville-Marie. Le sol archéologique échantillonné, situé à l'intérieur du musée de Pointe-à-Callière, est exposé au public, qui peut marcher au-dessus du sol historique sur un plancher de verre transparent (figure 1). Ce plancher est évidemment très difficile à soulever et nous avons dû faire appel à une entreprise spécialisée pour accéder aux sols archéologiques.



Figure 1 : Site d'échantillonnage du Musée Pointe-à-Callière. Les trois sites échantillonnés, F2, F3 et F4, sont séparés de plusieurs mètres et ont été choisis en fonction des différentes activités anthropiques qui s'y sont déroulées (F1 a été abandonné et une seule carotte a été conservée pour le site F3).

Il va également de soi que les endroits où nous avons prélevé des échantillons ont dû être choisis de manière à ne pas être visibles (trou dans le sol) une fois le public revenu. Pour ces raisons, et parce que nous avons dû travailler un jour où le musée était fermé, nous avons été limités dans la quantité de terre récoltée et dans le nombre de carottes prélevées. Après l'extraction, les carottes ont été soigneusement transférées dans des tubes en plastique stériles. Tout le matériel a été désinfecté entre les échantillons afin d'éviter toute contamination croisée.

2.2 Marquage des temps géologiques et découpe des carottes.

Lorsque des carottes sont extraites du sol, la période géologique la plus récente se trouve à la surface, car les sédiments s'accumulent et s'enfouissent au fil du temps. Plus le sol est profond, plus on remonte dans le temps. Les carottes ont été délimitées par les archéologues présents au moment du prélèvement selon les strates visibles par différentes colorations et textures. Les

premières observations ont été faites grâce à un premier rapport (Cassandra Lazar et Valérie Bertrand; 2019) d'analyse microbienne réalisé sur ces sites en 2019:

La carotte extraite du site F2 provient d'une zone qui a pu être utilisée pour la culture de diverses plantes ainsi que pour l'utilisation d'un système d'égouts (à différentes périodes historiques). Cette carotte a été prélevée au fond d'une fosse probablement creusée après 1646. Elle présente deux textures distinctes à l'œil nu : une partie supérieure, de nature organique et limoneuse, et une partie inférieure, de nature argileuse. Ces deux parties sont séparées par une fine strate de terre organique, attestant du rôle de la fosse comme lieu de stockage de nourriture pour la population. La première partie serait liée à un remblai construit vers 1688 à la suite d'une fosse utilisée entre 1646 et 1685, quelques années après la fondation de Montréal. La partie inférieure de la carotte contient des dépôts liés à la dernière glaciation, il y a environ 10 000 ans, et à la mer de Champlain, qui s'est élevée à 90 m au-dessus du niveau actuel de la mer entre 10 000 et 5 000 ans.

La carotte prélevée sur le site F3 a été forée dans une zone où les sols pourraient correspondre à un ancien système d'égouts ou à un site d'activités de peinture. Les carottes ont été prélevées à quelques mètres d'intervalle et sont principalement composées de remblais de 1688. Nous n'avons pas prélevé le sol d'occupation du fort, car les vibrations générées par le carottage risquaient de faire s'effondrer les parois du puits situé à proximité.

Enfin, la carotte extraite du site F4 provient d'une zone qui pourrait avoir été utilisée comme lieu de dépeçage des animaux et de stockage des déchets. Elle a été récupérée dans un remblai de 1688 : le changement progressif de sol montre une couche organique et limoneuse en surface. Elle date de l'occupation du fort de Ville-Marie, entre 1642 et 1685, et se mélange à l'argile des couches inférieures. Ces couches témoignent de l'occupation des autochtones qui ont fréquenté la région et se sont installés à proximité du site après la décrue. Comme la carotte F2, les strates les plus profondes sont liées aux dépôts de la mer Champlain et au retrait des glaces. Puis, chaque carotte a été coupée en laboratoire tous les 1 cm pour séparer les différentes époques, et chaque centimètre de sol a été congelé à l'azote liquide et conservé à -80°C.

2.3 Extraction d'ADN & d'ARN, (RT-)PCR et séquençage

L'ADN et l'ARN microbiens échantillonnés ont été extraits à l'aide des kits DNeasy® PowerSoil® Kit et RNeasy® PowerSoil® Total RNA kit, de QIAGEN (voir annexe A). Ces kits sont conçus pour extraire l'ADN et l'ARN de différents types de sols, y compris les sédiments et les sols à forte teneur en matière organique. Ils permettent de récupérer les acides nucléiques en vue d'une analyse ultérieure par (RT-) PCR. Pour chaque échantillon (cm de sol), 2 à 3 grammes de sol ont été pesés dans un environnement stérile et utilisés pour l'extraction. L'homogénéisation se fait dans un tube de 15 ml contenant des billes de carbure de silice. Pour assurer la lyse complète de tous les micro-organismes et la neutralisation des RNases/DNases, on utilise les solutions PowerBead, SR1 et IRS qui, respectivement, dispersent les cellules et les particules de sol, lysent les cellules (SDS = détergent anionique qui décompose les acides gras et les lipides associés à la membrane cellulaire) et précipitent les matières organiques et inorganiques autres que les acides nucléiques, telles que les débris cellulaires et les protéines. La solution phénol/chloroforme/alcool isoamylique augmente l'efficacité et le rendement de la lyse : elle piège les composants cellulaires lysés et dénature les protéines, ce qui permet aux acides nucléiques de rester en solution. Après centrifugation, ils se retrouvent dans la phase aqueuse supérieure, la phase inférieure contient des protéines et des débris cellulaires, et la phase intermédiaire, des matières humiques, organiques et inorganiques. Dans les sols à forte teneur en matière organique, on peut s'attendre à des phases intermédiaires plus épaisses. Plusieurs étapes de précipitations successives sont utilisées pour récupérer uniquement les acides nucléiques : la solution SR3, protéines et débris cellulaires non éliminés, puis la solution SR4, isopropanol, précipiteront les acides nucléiques totaux. Le culot est remis en suspension avec SR5, une solution saline brevetée optimisée pour se lier aux colonnes gravitaires échangeuses d'anions. Cette solution est également utilisée pour préparer la colonne Jet-star. Une fois que l'échantillon a traversé la colonne, il est à nouveau lavé avec SR5 pour éliminer les contaminants non liés, avant que l'ARN et l'ADN ne soient élués successivement à l'aide de tampons alternatifs à haute teneur en sel (SR6 et SR8). L'ajout de SR4 permet aux acides nucléiques de précipiter à nouveau, avant d'être centrifugés, séchés et remis en suspension dans une suspension plus

concentrée, exempte de RNase/DNase (SR7). On obtient ainsi un total de 68 échantillons d'ADN et 68 échantillons d'ARN pour l'ensemble des carottes.

Tableau 1 : Liste des échantillons obtenus pour chaque carotte, avec les numéros des cm de profondeur (du moins profond au plus profond). Pour chacun de ces échantillons, l'ADN et l'ARN ont été extraits.

Site F2 :	01_F2 C1	02_F2 C2	03_F2 C3	04_F2 C4	05_F2 C5	06_F2 C6	07_F2 C7	08_F2 C8	09_F2 C9
	10_F2 C10	11_F2 C11	12_F2 C12	13_F2 C13	14_F2 C14	15_F2 CM	16_F2 M1	17_F2 M2	18_F2 M3
	19_F2 M4	20_F2 M5	21_F2 M6	22_F2 M7	23_F2 Fond2	24_F2 Fond1	01_F2 O1	02_F2 O2	02_F2 O3
	04_F2 O4	05_F2 O5							
Site F3 :	01_F3 A1	02_F3 A2	03_F3 A3	04_F3 A4	05_F3 A5	06_F3 A6	07_F3 A7	08_F3 A8	00_F3 A9
	10_F3 A10	11_F3A Fond2	12_F3A Fond1						
Site F4 :	01_F4 1	02_F4 2	03_F4 3	04_F4 4	05_F4 5	06_F4 6	07_F4 7	08_F4 8	09_F4 9
	10_F4 10	11_F4 11	12_F4 12	13_F4 13	14_F4 14	15_F4 15	16_F4 16	17_F4 17	18_F4 Fond4
	19_F4 Fond3	20_F4 Fond2	21_F4 Fond1	22_F4 6-P2	23_F4 5-P2	24_F4 4-P2	25_F4 3-P2	26_F4 2-P2	27_F4 1-P2

Une fois récupéré, l'ARN a été rétrotranscrit (Annexe B) en ADN, puis les gènes de l'ARNr 16S (pour les procaryotes) et de l'ARNr 18S (pour les eucaryotes) ont été amplifiés par PCR (voir annexe C et D) avant d'être séquencés. En raison de leur structure très conservée dans le monde vivant, des amorces universelles ont été utilisées pour séquencer ces gènes, mais elles sont également suivies de séquences spécifiques à chaque taxon.

2.4 Séquençage et analyses bio-informatiques

Les gènes 18S eucaryotes ont été séquencés à l'aide des amorces E960F & NSR1438R (Groult. B et al, 2022; Lhoste. E et al, 2023), tandis que les gènes 16S rRNA procaryotes ont été séquencés à l'aide des amorces B341 & B785 (Groult. B et al, 2022; Lhoste. E et al, 2023) pour les bactéries et A340F & A915R pour les archées (Groult. B et al, 2022; Lhoste. E et al, 2023). Ils ont été séquencés sur la plateforme Illumina Miseq au Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines -Fondation Courtois (CERMO-FC) avec le kit Miseq Reagent v3 600 cycles (Illumina, USA) et une lecture paired-end de 300bp. Un blanc d'extraction, obtenu en utilisant uniquement les composants du kit d'extraction, et de PCR a également été séquencé avec les échantillons. Les séquences obtenues ont été filtrées et analysées avec le pipeline DADA2 (Benjamin J.Callahan, 2015) dans le logiciel R 4.4.0 (RStudio Team, 2020), ce qui nous a permis d'obtenir une matrice d'ASVs (amplicon sequence variants), puis alignées et comparées avec les séquences présentes dans les bases de données (SILVA v138.1 et PR2 v5.0.0) afin d'obtenir une classification taxonomique des ASV. La fonction *isContaminant* du package Decomtam a été utilisée pour supprimer les séquences contaminantes présentes dans les blancs du kit et des témoins négatifs des PCRs qui ont aussi été séquencés. Enfin, puisque notre étude porte sur l'ADN fossile, nous avons, pour chaque échantillon, retirer les entrées uniques (donc les échantillons qui n'ont pas de complément ADN ou ARN), créer deux tables d'ASVs pour soustraire les séquences d'ARN à leur complément d'ADN, et récupérer les séquences d'ADN uniques pour ne garder que les gènes inactifs au moment de l'échantillonnage.

2.5 Analyses statistiques

La gestion et le traitement des données ont été réalisés à l'aide du logiciel R 4.4.0 : les tests statistiques présentés ont été réalisés séparément pour chacun des trois domaines du vivant (Archaea, Bactérie, et Eucaryote). Pour normaliser les données d'ASVs de chaque domaine, les trois tableaux de communautés ont été raréfiés au plus petit nombre d'ASV par échantillon (supérieur ou égal à 1000). Pour répondre à notre première hypothèse H1, nous avons calculé l'indice de diversité alpha en utilisant l'indice de Shannon, en utilisant la fonction *Diversity index Shannon* du package Vegan. Plus l'indice est élevé, plus la diversité est importante. Nous avons effectué un

test de régression linéaire de l'indice de diversité de shannon en fonction de la profondeur en cm et une analyse de variance (avec la fonction *Anova, type II* du package Stats) qui tient compte des différentes variables (site et profondeur) ainsi que de leur interaction. Puisque les données suivent une loi normale (test de Shapiro-Wilk), nous avons donc utilisé un test paramétrique T. Un second test a été effectué pour la diversité alpha avec une analyse par boxplot (via la fonction *geom_boxplot* du package ggplot2) de l'indice de diversité de shannon en fonction des trois époques (a, b et c) délimitées par les archéologues.

Pour répondre à notre deuxième hypothèse H2, nous avons effectué une étude de la diversité taxonomique des échantillons en étudiant l'abondance relative des 5 taxons les plus abondants (donc les plus représentatifs et les plus impactants dans notre étude) dans chaque échantillon avec la fonction *phyloseq* du package Phyloseq. Puis, nous avons fait une PCoA pour analyser la répartition de nos communautés (diversité beta). La table d'ASVs a été transformée avec la méthode Hellinger avant l'analyse en utilisant la fonction *decostand* du package Vegan. Cette analyse a été suivie d'une analyse de variance multivariée permutative (PERMANOVA) qui nous a permis d'identifier l'impact des variables environnementales (site, profondeur, et pH) et un test de dispersion multivariée basé sur les distances (*BetaDISPER* du package Vegan) utilisées pour vérifier les dispersions égales entre les groupes. Enfin, nous avons répondu à notre troisième hypothèse H3 avec une analyse discriminante linéaire basée sur la taille ("Linear discriminant analysis Effect Size" ou LefSe), grâce à la fonction *run_lefse* du package microbiomeMarker, pour estimer quels différents taxons microbiens discriminants basé sur le niveau du genre, sont significativement différents entre chaque groupe d'échantillons, ici les périodes historiques. Ces analyses nous ont permis d'effectuer des recherches sur ces différents taxons pour vérifier leurs conditions de vie et les événements historiques auxquels ils pourraient être liés.

III. RÉSULTATS

Bien que les données récoltées dans le cadre de ce projet permettent d'analyser les communautés totales (basées sur l'ADN) et actives (basées sur l'ARN), les résultats présentés ici porteront uniquement sur les données basées sur l'ADN fossile, puisque ce sont ces données qui permettent de répondre à l'objectif principal de ce mémoire. Ici, l'ARN sera utilisé comme un contrôle pour enlever la fraction active.

3.1 Délimitation des époques temporelles pour chaque carotte récoltée

Lors de l'échantillonnage, les strates apparentes sur les carottes ont permis aux archéologues et aux historiens du musée de Pointe-à-Callière d'estimer les différentes époques présentes dans ces sols (Figure 2). En effet, lors de leur extraction, nous avons pu constater des variations de couleurs et de textures le long des carottes F2 et F4. Ces variations ont donc été séparées en trois époques distinctes : en jaune, des sols de remblai, en gris des sols argileux, plus anciens, et en noir une période de transitions, avec des sols organiques.

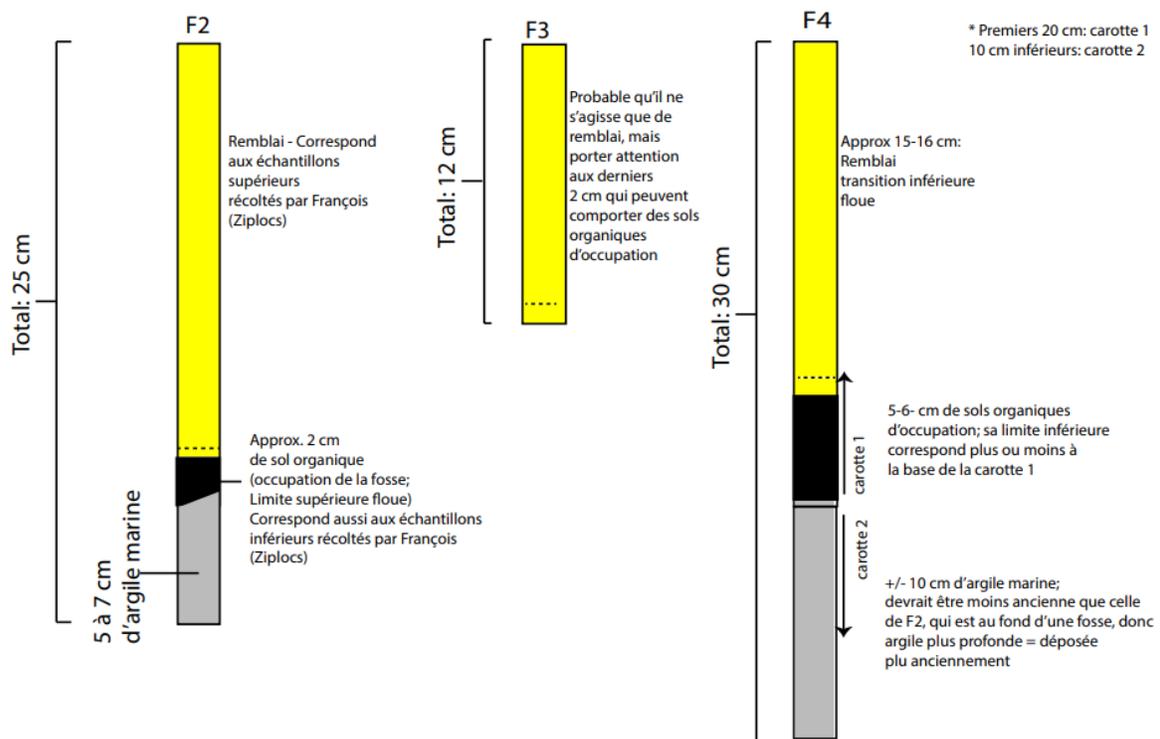


Figure 2: Profil temporel estimé des carottes échantillonnées sur les trois sites, établi par les archéologues du musée de Pointe-à-Callière lors de l'examen visuelle des strates apparentes pendant l'échantillonnage (époque « a » en jaune, époque « b » en noir et époque « c » en gris).

3.2. Identification taxonomique des communautés microbiennes basées sur l'analyse des gènes ARNr 16S et 18S

3.2.1. Communautés des Bactéries

Pour chaque site, les échantillons sont présentés par ordre chronologique, soit de la surface (en haut) vers les plus profonds (en bas) (Figure 3). Pour chaque échantillon, on peut constater que l'abondance relative des taxons dominants diffère, mais que certains taxons sont présents sur nos trois sites, comme *Gemmatimonadaceae*, présent en grande quantité dans les sols, ou unc. *IMCC26256*. On peut également noter que certains taxons sont exclusifs à certains sites. Par exemple, on retrouve sur le site F2 les genres *Woesia*, *Chryseolinea*, unc. *Alphaproteobacteria*, *Pseudarthrobacter*, unc. *Zixibacteria*, *Nitrospira* et *Bacillus*. Dans le site F3, on peut observer la présence des genres unc. *AKAU4049*, unc. *67-14*, *MM2*, et unc. *MB-A2-108*. Enfin, dans le site F4, on peut souligner la présence des genres unc. *Acidobacteriales*, unc. *bacteriap25*, unc. *Defluviicoccales*, *Pseudolabrys*, unc. *Acidiimicrobiia*, *Lamia* et unc. *Xanthobacteraceae*. L'étude des différents taxons nous permet également de noter la présence de certaines bactéries dans les sites F2 et F4 (mais pas dans le site F3 pour qui la carotte est plus courte et uniquement dans la période historique jaune), comme unc. *Rhizobiales*, unc. *TRA3-20* et *Bauldia*.

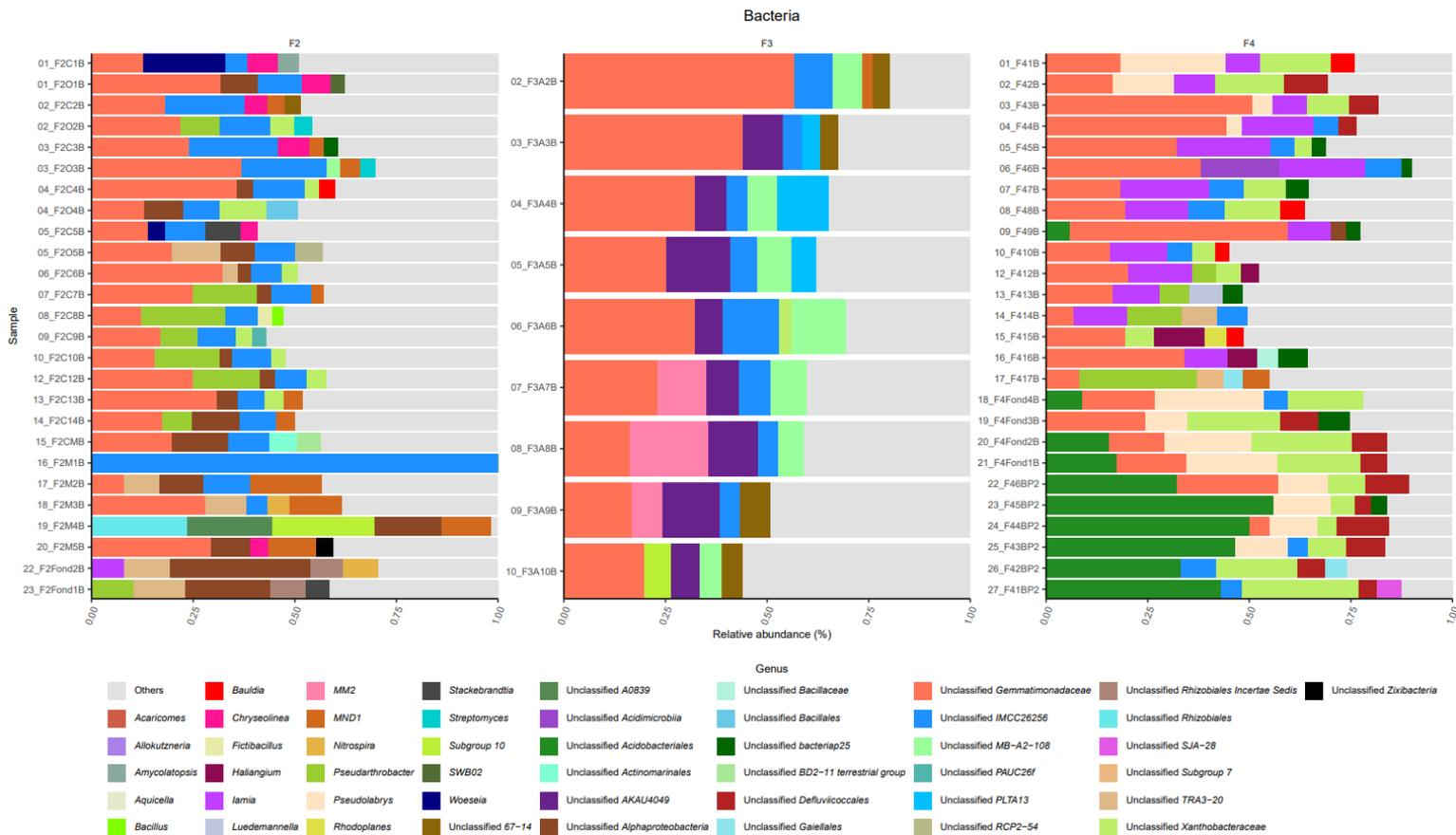


Figure 3: Identification taxonomique des communautés bactériennes fossiles. Abondance relative en fonction des cm (indiquée en début du nom des échantillons) de profondeur pour chaque carotte des sites F2, F3 et F4.

3.2.2. Communautés des Eucaryotes

Dans un premier temps, on peut noter que le nombre de taxons fossiles obtenus est bien moins important que chez les bactéries (avec 48 taxons chez les bactéries contre 27 chez les eucaryotes)(Figure 3). De même que pour les Bactéries, pour chaque site, les échantillons sont présentés par ordre croissant, soit de la surface (en haut) vers les plus profonds (en bas). Pour chaque échantillon, on peut constater que l'abondance relative diffère, mais que certains taxons sont présents sur nos trois sites, comme *Agaricomycotina*. Ici aussi, on peut noter que certains taxons sont exclusifs à un site. Par exemple, sur le site F2, on note la présence de *Prasiolales*, unc. *Opisthokonta*, *Hypotrichia* et *Glissomonadida*, pour le site F3 le seul taxon unique est *Vannellida*, et enfin, pour le site F4, on note la présence des taxons unc. *Amoebozoa*, unc. *Litostomatea*, *Microsporida*, *Flamellidae* et unc. *Eukaryota*. Cette analyse nous permet d'avoir une approche

globale sur les différents taxons eucaryotes. Cependant, on peut noter que la population eucaryote est majoritairement fongique, donc un signal ITS pourrait être utilisés pour une meilleure différenciation des genres, par la suite (C.L.Schoch et al, 2012; White. T.J. et al, 1989).

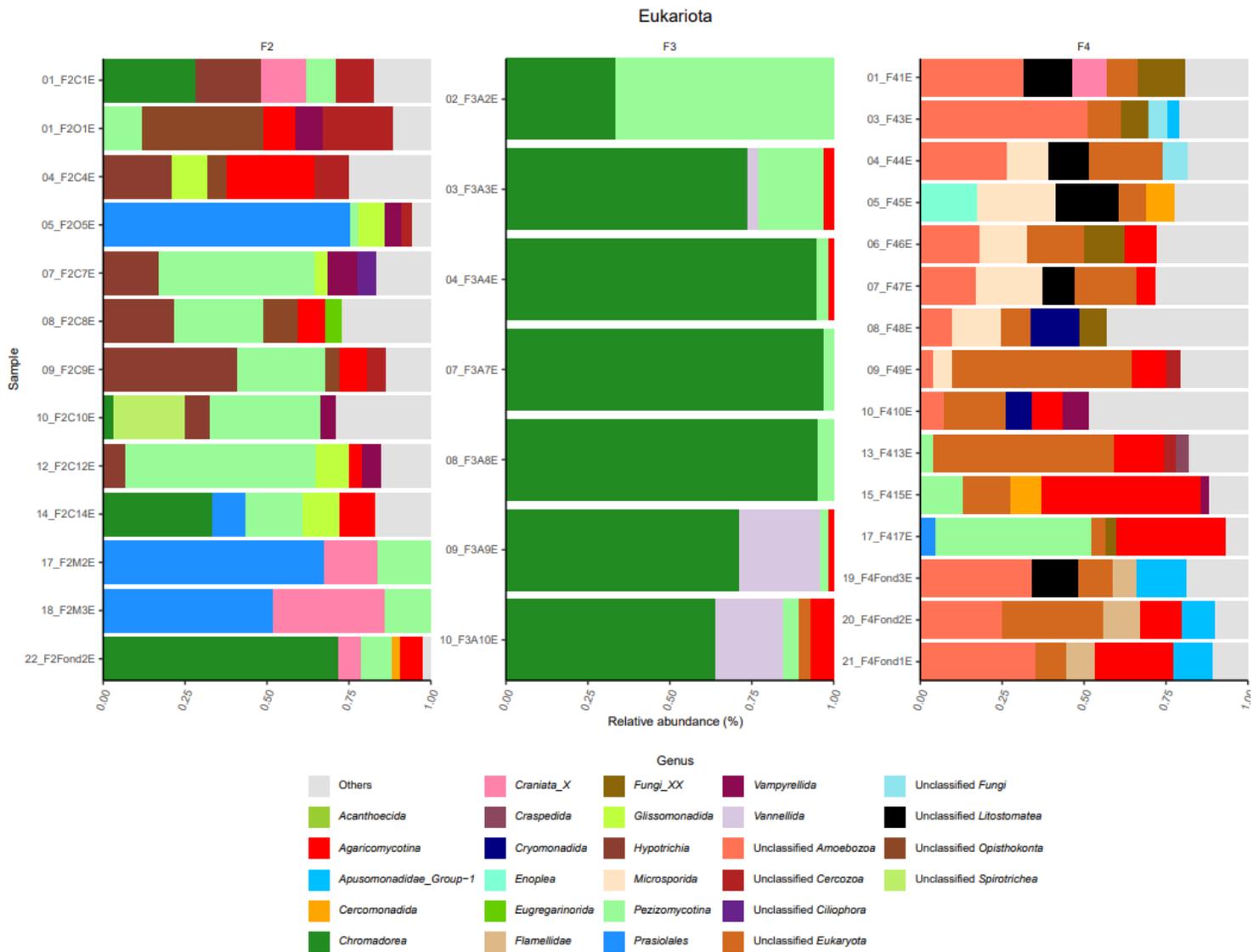


Figure 4 : Identification taxonomique des communautés eucaryotes fossiles. Abondance relative en fonction des cm (indiquée en début du nom des échantillons) de profondeur pour chaque carotte des sites F2, F3 et F4.

3.2.3. Communautés des Archées

Ici également, pour chaque site, les échantillons sont présentés par ordre croissant, soit de la surface (en haut) vers les plus profonds (en bas). Pour chaque échantillon, on peut constater que l'abondance relative diffère, mais que certains taxons sont présents sur nos trois sites, comme unc. *Woesearchaeales*. On peut également noter que certains taxons sont exclusifs à certains sites. Par exemple, on retrouve sur le site F2 les genres unc. *Marine Group II* et *Methanomassiliicoccus*. Sur notre site F3, on peut observer la présence des genres unc. *Termoplasmata* et unc. *Nitrosphaeraceae*. Enfin, sur notre site F4, on peut souligner la présence des genres *Candidatus Methanoperedens* et unc. *Nitrosotaleaceae*. L'étude des différents taxons nous permet également de noter la présence de certaines archées communes sur nos sites F2 et F4 (mais pas sur F3), comme unc. *SCGC AAA011-D5*, unc. *Bathyarchaeia* et unc. *Nitrosopumilaceae* ; ainsi qu'une archée commune entre nos sites F2 et F3 (mais absente de F4), *Nitrosarchaeum*.

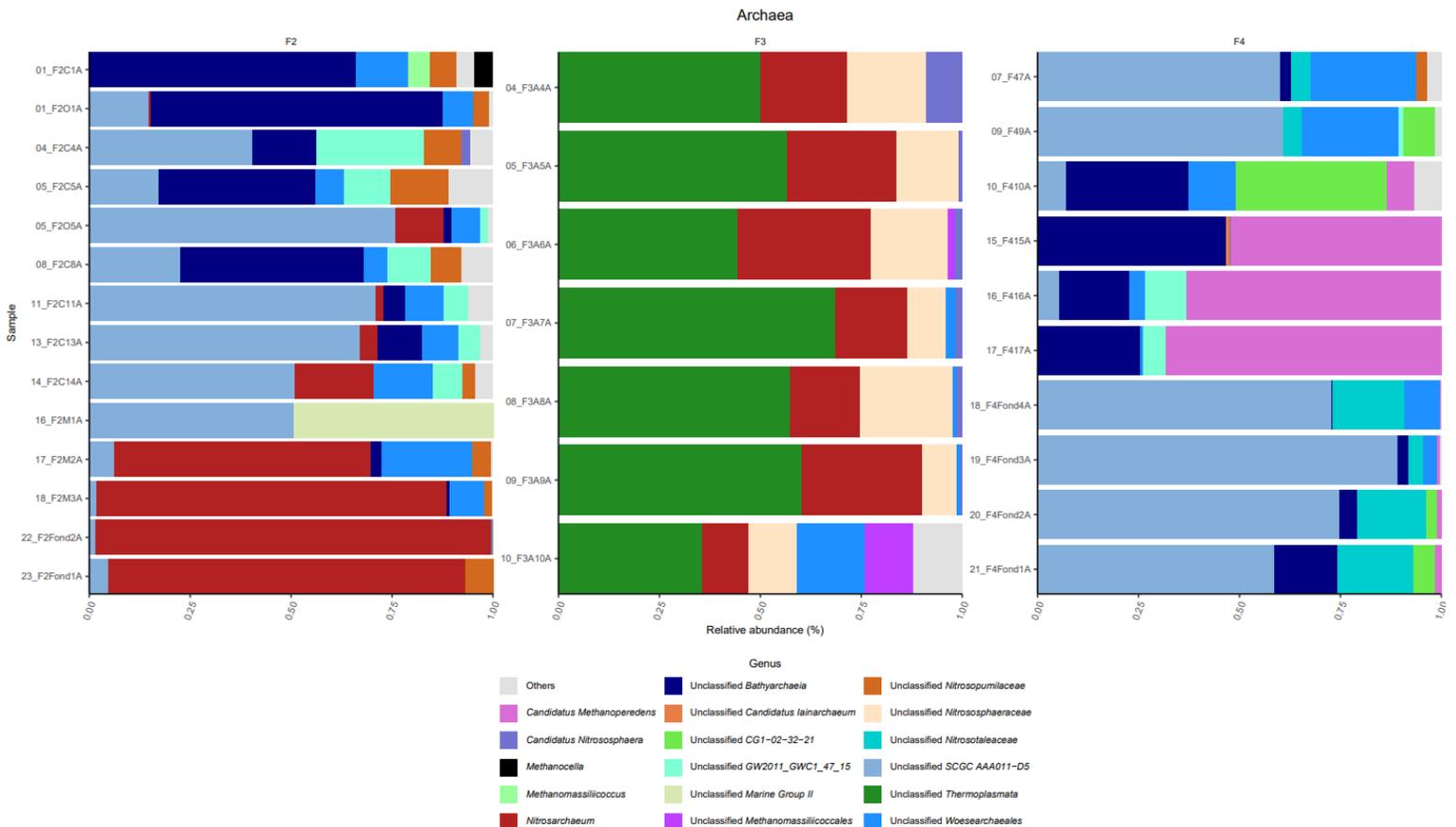


Figure 5: Identification taxonomique des communautés archées fossiles. Abondance relative en fonction des cm (indiquée en début du nom des échantillons) de profondeur pour chaque carotte des sites F2, F3 et F4.

3.3. Analyses basées sur la diversité alpha

3.3.1. Communautés de Bactéries

Nos analyses de la diversité alpha se feront sous deux formes : une première qui tiendra compte de la profondeur, soit tous les cm, et une seconde approche qui nous permettra de faire une analyse selon les époques délimitées dans la Figure 2. L'intercept dans nos analyses statistiques représente la valeur de la variable dépendante lorsque toutes les variables explicatives ou prédicteurs sont égales à zéro. C'est donc notre point de référence ou de base à partir duquel les autres effets (les coefficients des variables explicatives) seront mesurés.

Les analyses de régression linéaire entre l'indice de diversité de Shannon et la profondeur des carottes (en cm), ainsi que le résumé du modèle et l'analyse de variance (Figure 6, Tableau 2 et 3) nous permettent de constater que la diversité alpha des bactéries fossiles (Indice de Shannon) diminue significativement avec la profondeur de nos carottes pour les sites F2 et F4 et qu'elle est significativement différentes entre nos sites. Pour les sites F2 et F4, nous observons une diminution de la diversité avec la profondeur, avec une diminution plus importante pour le site F2. Pour le site F3, on remarque que la pente est positive, ce qui signifie une augmentation de la diversité alpha. Cependant, si on regarde la distribution des points sur les sites F2 et F4, on peut constater que la diversité est plus importante à 10 cm de profondeur avant de redescendre. Comme notre carotte F3 s'arrête à ce niveau des 10 cm, on peut supposer qu'elle aurait suivi un tracé similaire avec une profondeur plus importante. Cette augmentation pourrait être en liens avec un évènement historique particulier ayant eu lieu à cette période et d'autres analyses non-linéaires pourraient, par la suite, permettre d'approfondir l'étude à cette époque.

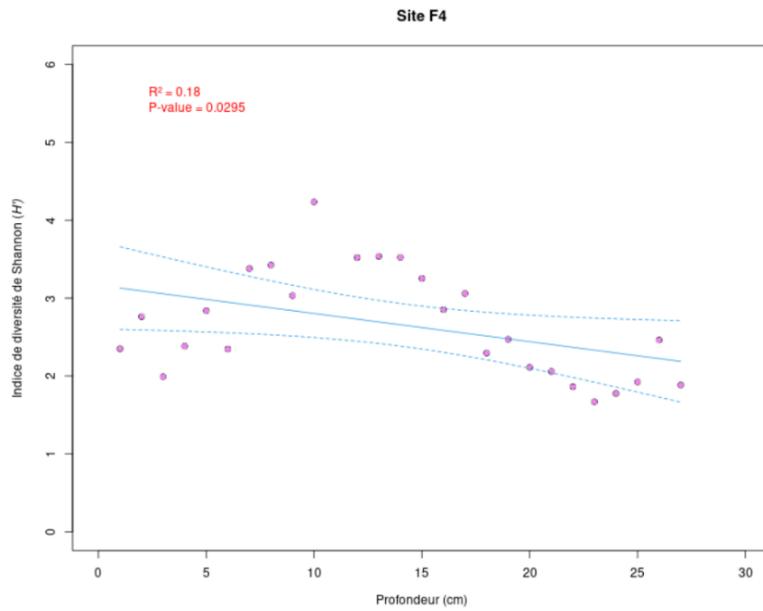
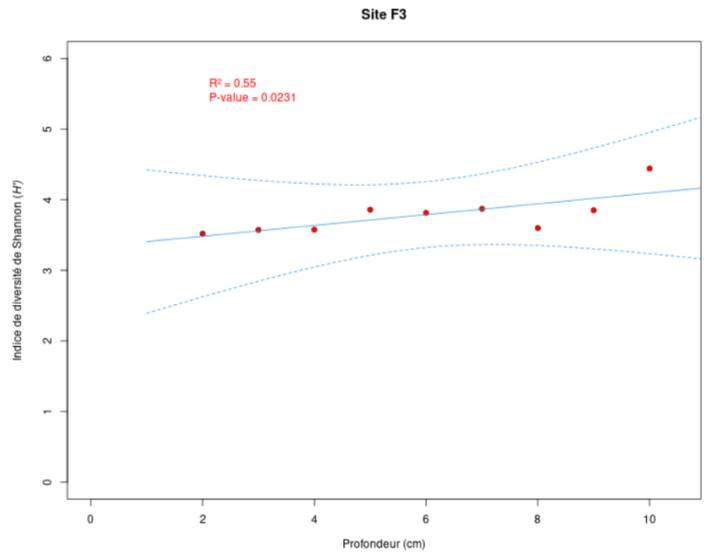
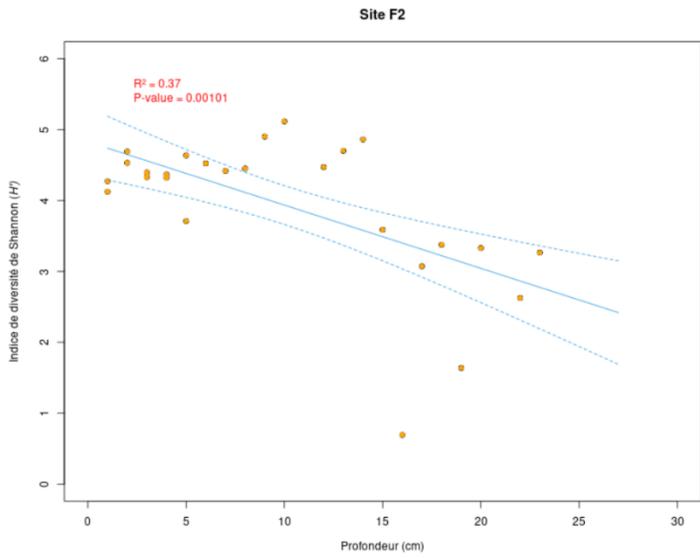


Figure 6: Droites de régression linéaire de l'indice de diversité de Shannon (H') bactérienne fossile en fonction de la profondeur des carottes (cm) pour chaque site (F2, F3 et F4).

Tableau 2 : Résumé du modèle utilisé pour les droites de régression linéaire de la diversité alpha bactérienne, avec un R² ajusté de 0.5327, une statistique-F de 14.68 et une p-value de 3.903e-09.

	Estimate	Std. Error	T-value	P-value
(Intercept)	4.82805	0.24013	20.106	<2 ^{e-16}
SiteF3	-1.49801	0.63495	-2.359	0.0219
SiteF4	-1.66305	0.36850	-4.513	3.41 ^{e-05}
Profondeur_cm	-0.08923	0.01982	-4.502	3.54 ^{e-05}
SiteF3 :Profondeur_cm	0.16566	0.09214	1.798	0.0777
SiteF4 :Profondeur_cm	0.05303	0.02629	2.017	0.0486

Le résumé du modèle utilisé pour les droites de régression linéaire (Tableau 2) montre que l'indice de diversité de Shannon est significativement plus bas dans les sites F3 et F4 par rapport au site F2 (Intercept). De plus, on peut voir qu'une augmentation de la profondeur est associée à une diminution significative de l'indice de diversité de Shannon. Les interactions entre le site et la profondeur montrent que l'effet de la profondeur est significativement différent au site F4 par rapport au site de référence F2, mais pas pour le site F3 : l'indice de diversité de Shannon pour le site F3 est en moyenne 1.498 unités plus basses que celui du site de référence F2 avec un p-value de 0.0219, cette différence est également significative pour le site F4 qui est 1.663 unités plus basses que celui du site de référence avec une p-value de 3.41^{e-05}. On peut aussi voir que pour chaque cm de profondeur, l'indice de diversité de Shannon diminue significativement de 0.089 unité, avec une p-value de 3.54^{e-05}. Enfin, lorsqu'on regarde les interactions, on voit que l'effet de la profondeur sur le site F4 est significatif (p = 0.0486), et qu'il ne l'est pas pour le site F3 (p = 0.0777). Dans ce modèle, le R² ajusté montre que 53.27% de la variance de l'indice de Shannon est expliquée par ce modèle. Avec une statistique F de 14.68 et une p-value de 3.903^{e-09}, notre modèle est statistiquement significatif.

Tableau 3: Résultats de l'analyse de variance (Anova, Type II) de l'indice diversité de shannon bactérien en fonction des différents facteurs et de leur interaction.

	SumSq	Df	F-value	P-value
Site	13.3577	2	13.7464	1.441 ^{e-05}
Profondeur_cm	9.2763	1	19.0926	5.567 ^{e-05}
Site :Profondeur_cm	3.0562	2	3.1451	0.0509
Residuals	26.7223	55		

L'analyse de variance (ANOVA) confirme que les facteurs Site ($p = 1.441e-05$) et Profondeur ($p = 5.567e-05$) ont tous deux des effets significatifs sur l'indice de diversité de Shannon, avec un effet plus important de la profondeur ($F = 19.0926$) (Tableau 3). L'interaction entre le site et la profondeur n'est pas significatif, cependant avec une p-value de 0.0509, cela montre bien que l'effet est plus ou moins significatif en fonction du site (notamment dû à la taille de la carotte F3), comme le montre le Tableau 2.

L'analyse du boxplot ainsi que le résumé du modèle nous permettent d'observer une diminution de la diversité alpha en fonction des différentes époques délimitées par les archéologues dans la Figure 2. On peut voir que l'indice de diversité de Shannon moyen est effectivement significativement différent entre les époques pour les carottes F2 et F4, mais également entre les sites pour les époques a, b et c.

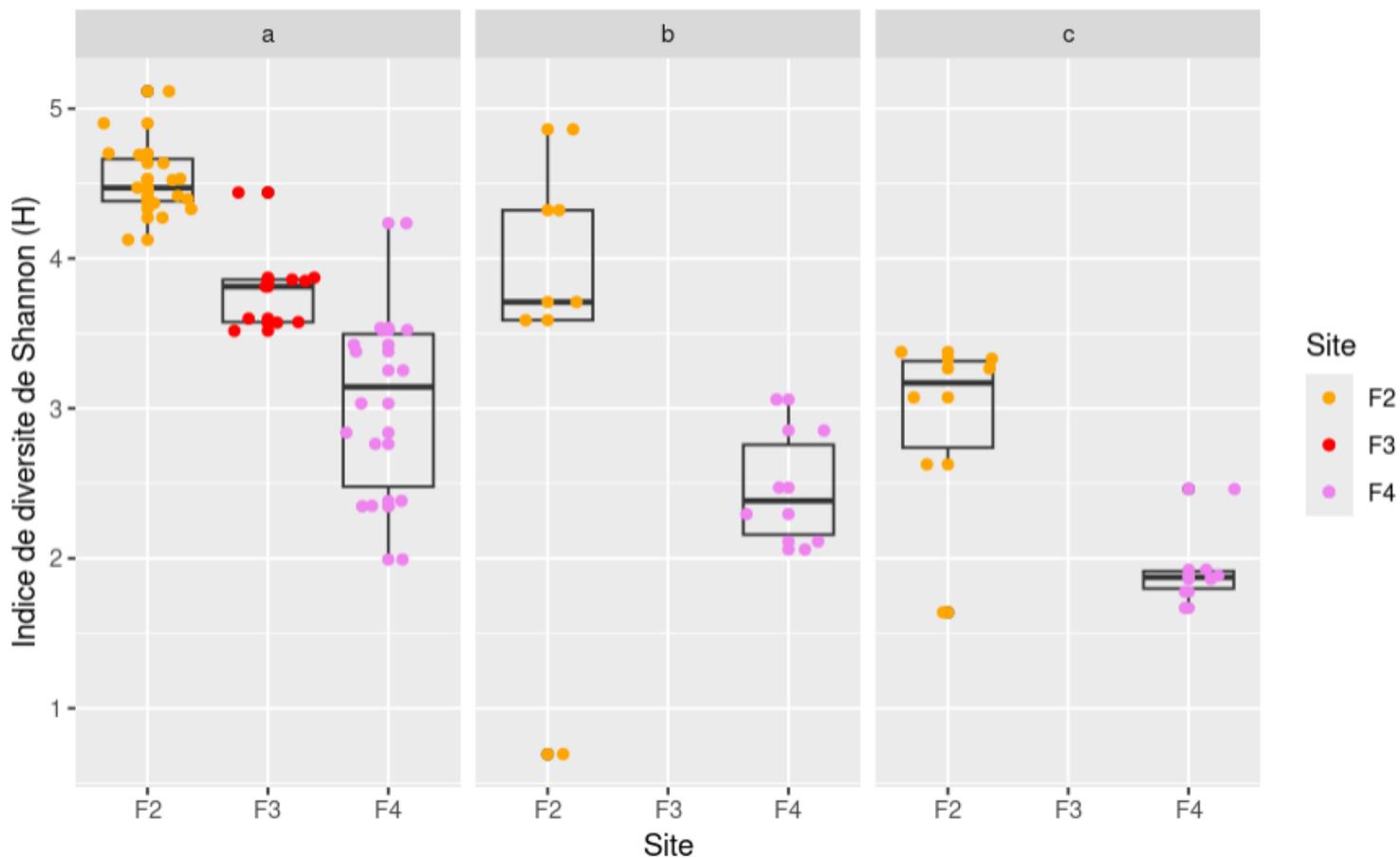


Figure 7: Boxplot de la diversité alpha des bactéries fossiles en fonction des différentes époques (a, b et c) pour chaque site.

Tableau 4: Résumé du modèle utilisé pour les boxplot des de la diversité alpha bactérienne, avec un R carré ajusté de 0.6355, une F-value de 18.44 et une p-value de 1.614e-11.

	Estimate	Std. error	t-value	p-value
(Intercept)	4.5289	0.1589	28.493	$<2^{e-16}$
SiteF3	-0.7402	0.2596	-2.852	0.00614
SiteF4	-1.4876	0.2288	-6.503	2.16^{e-08}
Epoque b	-1.0941	0.3179	-3.442	0.00112
Epoque c	-1.6435	0.2974	-5.527	9.66^{e-07}
SiteF3:Epoque b	NA	NA	NA	NA
SiteF4:Epoque b	0.05276	0.4374	1.206	0.23296
SiteF3:Epoque c	NA	NA	NA	NA
SiteF4: Epoque c	0.5320	0.4227	1.259	0.21354

On peut voir que les effets des sites F3 et F4 sur l'indice de diversité sont tout deux significatifs ($p = 0.00614$ et $p = 2.16 \times 10^{-8}$) de même qu'avec le modèle précédent (Tableau 2). Pour les époques, on peut voir que l'époque b a un indice de diversité moyen inférieur à 1.0941 et que l'époque c a une diversité inférieure à 1.6435, par rapport à l'époque de référence, a. Ces différences sont toutes deux significatives avec des p-value de 0.00112 et 9.66×10^{-7} . Donc pour un même site, la différence entre les époques impact significativement la diversité alpha fossile. Enfin, pour les interactions entre les sites et les époques, on note que ces interactions ne jouent pas un rôle significatif sur la variation de la diversité alpha. Dans ce modèle, le R^2 ajusté montre que 63,55% de la variance de l'indice de Shannon est expliquée par ce modèle. Avec une statistique F de 18.44 et une p-value de 1.614×10^{-11} , le modèle est statistiquement significatif.

3.3.2. Communautés des Eucaryotes

Les analyses de régression linéaire entre l'indice de diversité de Shannon et la profondeur des carottes (en cm), ainsi que le résumé du modèle et l'analyse de variance (Figure 8, Tableaux 5 et 6), nous permettent de constater que la diversité alpha eucaryotes fossiles (Indice de Shannon) a significativement diminué avec la profondeur de nos carottes pour les sites F2 et F4 mais quelle n'est significativement différentes pour tous nos sites : pour les sites F2 et F4, nous avons une diminution de la diversité avec la profondeur, (même si celle-ci est minime pour le site F4) toujours avec une diminution plus importante pour le site F2. Pour le site F3, on remarque que nous avons toujours (comme pour les bactéries fossiles, Figure3) une pente positive, ce qui signifie une augmentation de la diversité alpha. De plus, l'indice de diversité pour le site F3 est bien plus bas que pour les deux autres sites. Cependant, si on regarde la distribution des points sur les sites F2 et F4, on peut constater que la diversité est également plus importante à 10 cm de profondeur, avant de redescendre. Comme notre carotte F3 s'arrête à ce niveau des 10 cm, on peut supposer qu'elle aurait suivi un tracé similaire avec une profondeur plus importante.

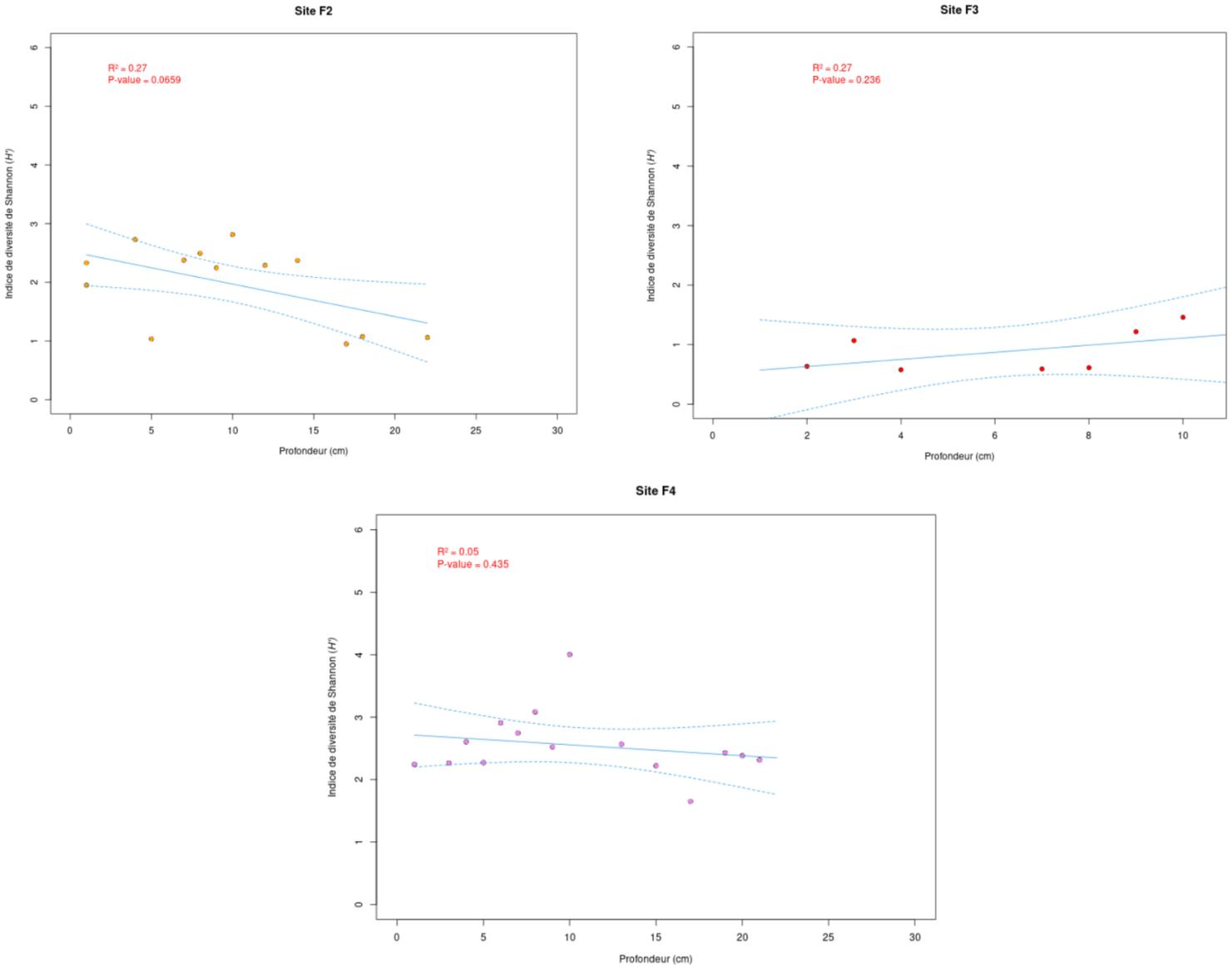


Figure 8 : Droites de régression linéaire de l'indice de diversité de Shannon (H') des eucaryotes fossiles en fonction de la profondeur des carottes (cm) pour chaque site (F 2, F3 et F4).

Le résumé du modèle utilisé pour les droites de régression linéaire (Tableau 4) montre que l'indice de diversité de Shannon est significativement différent pour notre site F3 par rapport à notre site F2 (Intercept). Cependant, le site F4 n'a presque aucune différence de diversité alpha par rapport à notre site F2. On peut également constater qu'une augmentation de la profondeur est associée à une diminution significative de l'indice de diversité de Shannon : pour chaque cm de profondeur, l'indice de diversité de Shannon diminue significativement de 0.07805 unité, avec

une p-value de 0.001122. Les interactions entre le site et la profondeur montrent que l'effet de la profondeur n'est pas significativement différent au site F3 et F4 par rapport au site de référence : l'indice de diversité de Shannon pour le site F3 est en moyenne 0.13785 unité plus haute que celui du site de référence F2 avec un p-value de 0.081475, quant au site F4, il est 0.06065 unité plus haute que celui du site de référence avec une p-value de 0.064093. Dans ce modèle, le R² ajusté montre que 59.76% de la variance de l'indice de Shannon est expliquée par ce modèle. Avec une statistique F de 11.39 et une p-value de 3.195e-06, notre modèle est statistiquement significatif.

Tableau 5: Résumé du modèle utilisé pour les droites de régression linéaire de la diversité alpha eucaryote, avec un R2 ajuste de 0.5976, une statistique-F de 11.39 et une p-value de 3.195e-06.

	Estimate	Std. Error	T-value	P-value
(Intercept)	2.67923	0.27786	9.642	1.06 ^{e-10}
SiteF3	-2.16631	0.57038	-3.798	0.000663
SiteF4	0.05083	0.39581	0.128	0.898681
Profondeur_cm	-0.07805	0.02166	-3.603	0.001122
SiteF3 :Profondeur_cm	0.13785	0.07646	1.803	0.081475
SiteF4 :Profondeur_cm	0.06065	0.03155	1.922	0.064093

L'analyse de variance (ANOVA) pour évaluer l'effet des facteurs sur l'indice de diversité de Shannon. Ce tableau confirme que les facteurs Site ($p = 4.447 \times 10^{-7}$) et Profondeur ($p = 0.006936$) ont tous deux des effets significatifs sur l'indice de diversité de Shannon, mais ici, avec un effet plus important du Site ($F = 24.7700$) (Tableau 6). L'interaction entre le site et la profondeur n'est pas significatif, avec une p-value de 0.070049, ce qui confirme bien que l'effet n'est pas significatif, comme le montre le Tableau 5.

Tableau 6: Résultats de l'analyse de variance (Anova, Type II) de l'indice diversité de shannon eucaryote en fonction des différents facteurs et de leurs interactions.

	SumSq	Df	F-value	P-value
Site	15.6793	2	24.7700	4.447 ^{e-07}
Profondeur_cm	2.6600	1	8.4046	0.006936
Site :Profondeur_cm	1.8412	2	2.9087	0.070049
Residuals	9.4949	30		

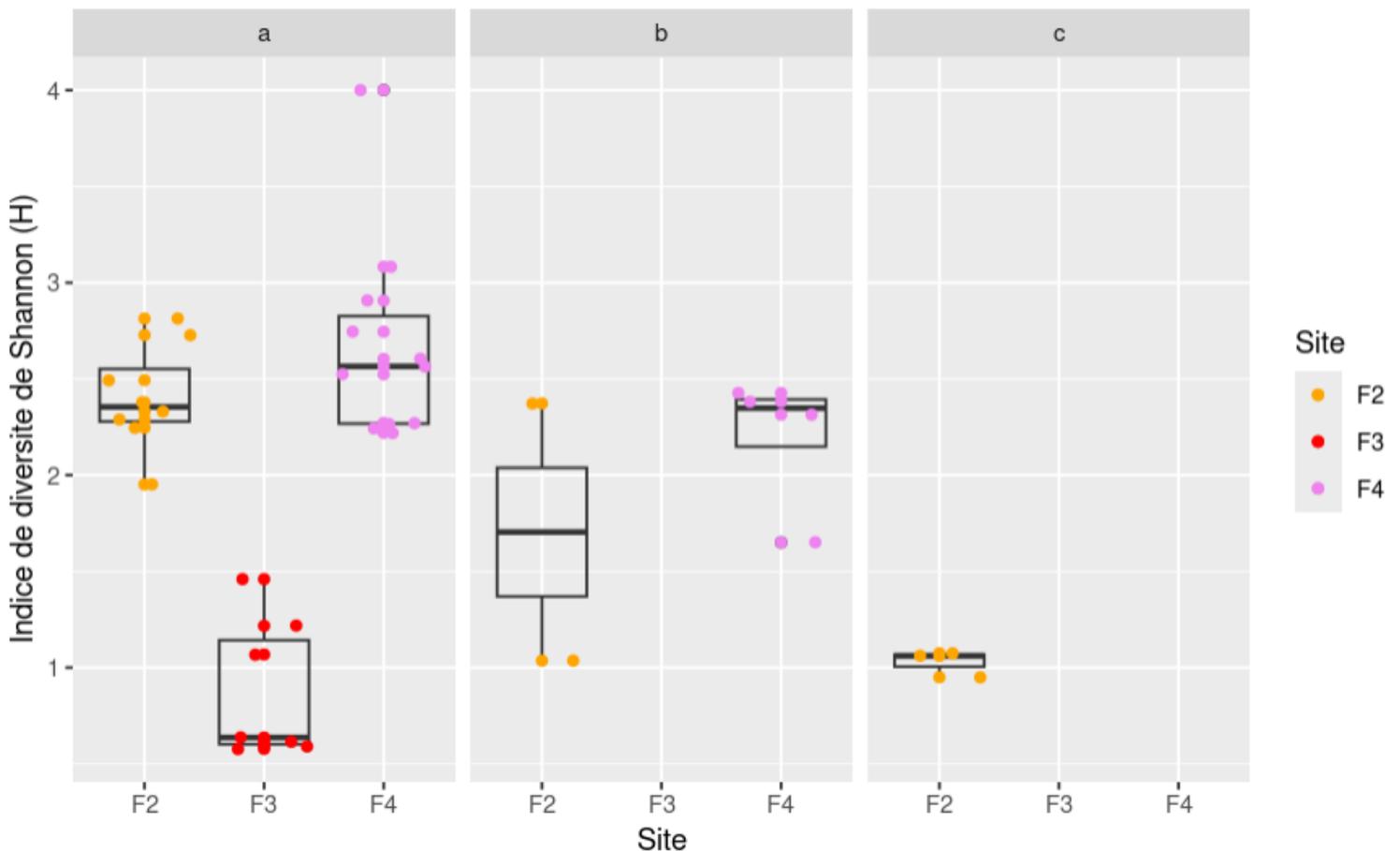


Figure 9: Boxplot de la diversité alpha des eucaryotes fossiles en fonction des différentes époques (a, b et c) pour chaque site.

L'analyse du boxplot ainsi que du résumé du modèle nous permettent d'observer la diminution de la diversité alpha eucaryote en fonction des différentes époques délimitées par les archéologues dans la Figure 2. On peut voir que l'indice de diversité de Shannon est bien différent entre les époques pour les carottes F2 et F4, mais également entre les sites pour les époques a, b et c. L'absence de F4c s'explique par l'absence d'ADN eucaryotes fossiles sur cette période. Le résumé du modèle utilisé pour les boxplot de diversité des différentes époques (Tableau 7)

montre les différents résultats d'analyses de la mesure de l'indice de diversité de Shannon en fonction des variables "Site" et "Époque" ainsi que de leurs interactions.

Tableau 7: Résumé du modèle utilisé pour les boxplot des de la diversité alpha eucaryote, avec un R2 ajusté de 0.7334, une statistique-F de 19.71 et une p-value de 1.546e-08.

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
(Intercept)	2.4038	0.1522	15.797	8.77 ^{e-16}
SiteF3	-1.5236	0.2228	-6.840	1.64 ^{e-07}
SiteF4	0.02714	0.2000	1.357	0.1852
Epoque b	-0.6997	0.3403	-2.056	0.0488
Epoque c	-1.3757	0.2914	-4.721	5.50 ^{e-05}
SiteF3:Epoque b	NA	NA	NA	NA
SiteF4:Epoque b	0.2179	0.4230	0.515	0.6104
SiteF3:Epoque c	NA	NA	NA	NA
SiteF4: Epoque c	NA	NA	NA	NA

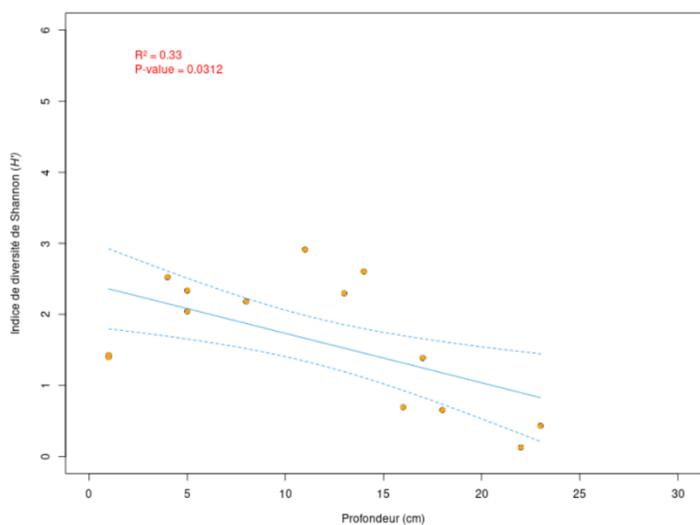
On peut voir que l'indice de diversité de notre site F3 est significativement plus bas que celui de notre site F2 alors que notre site F4 n'a pas de différence significative ($p = 1.64 \times 10^{-7}$ et $p = 0.1852$) de même que pour notre modèle précédent (Tableau 4). Pour les époques, on peut voir que l'époque b a un indice de diversité inférieur de 0.6997 et que l'époque c a une diversité inférieure de 1.3757, par rapport à l'époque de référence, a. Ces différences sont toutes deux significatives avec des p-value de 0.0488 et 5.50×10^{-5} . Donc pour un même site, la différence entre les époques impact significativement notre diversité alpha eucaryote fossile. Enfin, on note que les interactions entre les sites et les époques ne jouent pas un rôle significatif sur la variation de la diversité alpha. Dans ce modèle, le R² ajusté montre que 73,34% de la variance de l'indice de Shannon est expliquée par ce modèle. Avec une statistique F de 19.71 et une p-value de 1.546×10^{-8} , notre modèle est statistiquement significatif.

3.3.3. Communautés des Archées

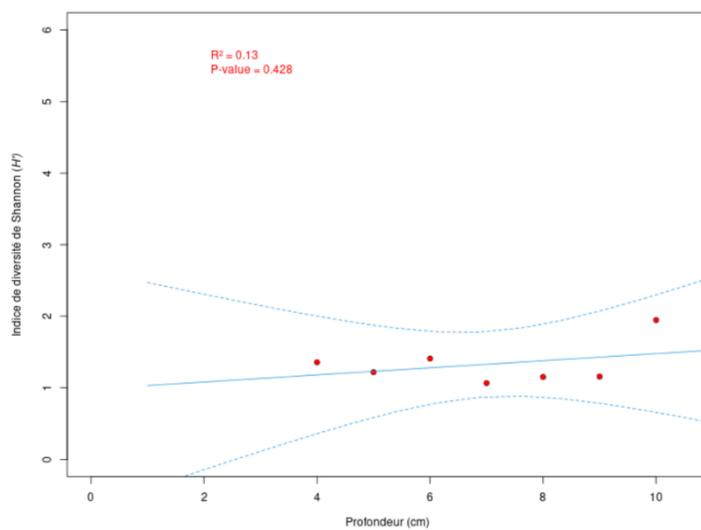
Les analyses de régression linéaire entre l'indice de diversité de Shannon et la profondeur des carottes (en cm), ainsi que le résumé du modèle et l'analyse de variance (Figure 10, Tableaux 8 et 9), nous permettent de constater que la diversité alpha des archées fossiles (Indice de Shannon)

a significativement diminué avec la profondeur de nos carottes: pour les sites F2 et F4, nous avons une diminution de la diversité avec la profondeur qui est semblable. Pour le site F3, on remarque que la pente est positive, ce qui signifie une augmentation de la diversité alpha. Cependant, comme chez les bactéries et les eucaryotes, si on regarde la distribution des points sur le site F2 (et légèrement sur F4), on peut constater qu'il y a une augmentation de la diversité à 10 cm de profondeur avant qu'elle redescende.

Site F2



Site F3



Site F4

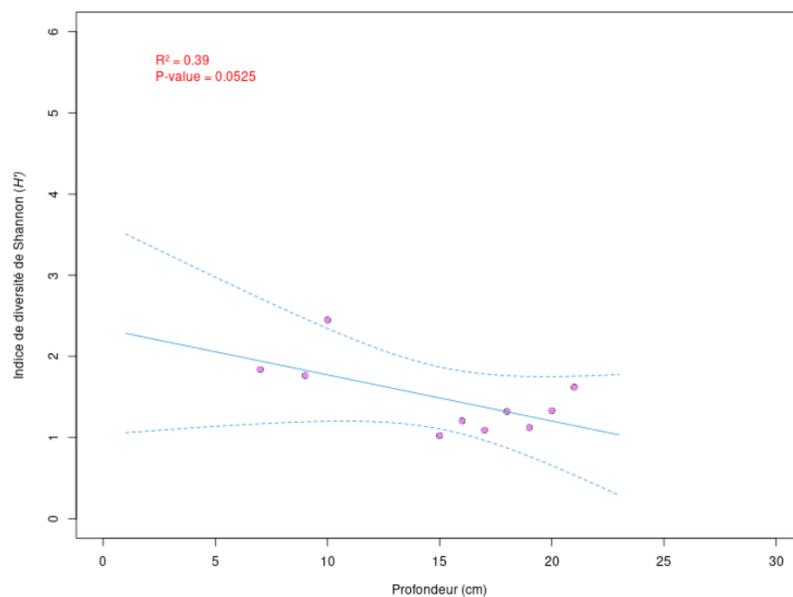


Figure 10 : Droites de régression linéaire de l'indice de diversité de Shannon (H') des archées fossiles en fonction de la profondeur des carottes (cm) pour chaque site (F 2, F3 et F4).

Le résumé du modèle utilisé pour les droites de régression linéaire (Tableau 7) montre que l'indice de diversité de Shannon n'est pas significativement différent pour notre site F3 par rapport à notre site F2 (Intercept) ainsi que pour notre site F4. Il est similaire pour nos trois sites. On peut également constater qu'une augmentation de la profondeur est associée à une diminution significative de l'indice de diversité de Shannon : pour chaque cm de profondeur, l'indice de diversité de Shannon diminue significativement de 0.06962 unités, avec une p-value de 0.00382. Les interactions entre le site et la profondeur montrent que l'effet de la profondeur n'est pas significativement différent au site F3 et F4 par rapport au site de référence : l'indice de diversité de Shannon pour le site F3 est en moyenne 0.11919 unité plus haute que celui du site de référence F2 par cm de profondeur avec un p-value de 0.30003, quant au site F4, il est 0.01276 unité plus haute que celui du site de référence avec une p-value de 0.78101. Dans ce modèle, le R² ajusté montre que 22.73% de la variance de l'indice de Shannon est expliquée par ce modèle. Avec une statistique F de 2.765 et une p-value de 0.04026, notre modèle est statistiquement significatif, bien que moins représentatif que pour la diversité alpha bactérienne et eucaryote.

Tableau 8 : Résumé du modèle utilisé pour les droites de regression linéaire de la diversité alpha des archées, avec un R2 ajuste de 0.2273, une statistique-F de 2.765 et une p-value de 0.04026.

	Estimate	Std. Error	T-value	P-value
(Intercept)	2.42888	0.29180	8.324	1.13 ^{e-08}
SiteF3	-1.44626	0.85566	-1.690	0.10342
SiteF4	-0.08849	0.69686	-0.127	0.89997
Profondeur_cm	-0.06962	0.02184	-3.189	0.00382
SiteF3 :Profondeur_cm	0.11919	0.11262	1.058	0.30003
SiteF4 :Profondeur_cm	0.01276	0.04541	0.281	0.78101

Les résultats de l'analyse de variance (ANOVA) pour évaluer l'effet des facteurs sur l'indice de diversité de Shannon (Tableau 9). Ce tableau confirme que c'est bien la Profondeur (p-value = 0.002537) et non le Site (p-value = 0.099647) qui joue un rôle significatif sur l'indice de diversité de Shannon des archées. L'interaction entre le site et la profondeur n'est pas significatif, avec une p-value de 0.569000, comme le montre le Tableau 8.

Tableau 9 : Résultats de l'analyse de variance (Anova, Type II) de l'indice diversité de shannon des archées en fonction des différents facteurs et de leur interaction.

	SumSq	Df	F-value	P-value
Site	1.7313	2	2.5326	0.099647
Profondeur_cm	3.8467	1	11.2538	0.002537
Site :Profondeur_cm	0.3943	2	0.5768	0.569000
Residuals	8.5453	25		

L'analyse du boxplot ainsi que du résumé du modèle (Figure 11, Tableau 10) nous permettent d'observer la diminution de la diversité alpha des archées en fonction des différentes époques délimitées par les archéologues dans la Figure 2. On peut voir que l'indice de diversité de Shannon est bien différent entre les époques pour les carottes F2 et F4, mais également entre les sites pour les époques a, b et c. L'absence de F4c s'explique par l'absence d'ADN archées fossiles sur cette période. Le résumé du modèle utilisé pour les boxplot de diversité des différentes époques (Tableau 10) montre les différents résultats d'analyses de la mesure de l'indice de diversité de Shannon en fonction des variables "Site" et "Époque" ainsi que de leurs interactions.

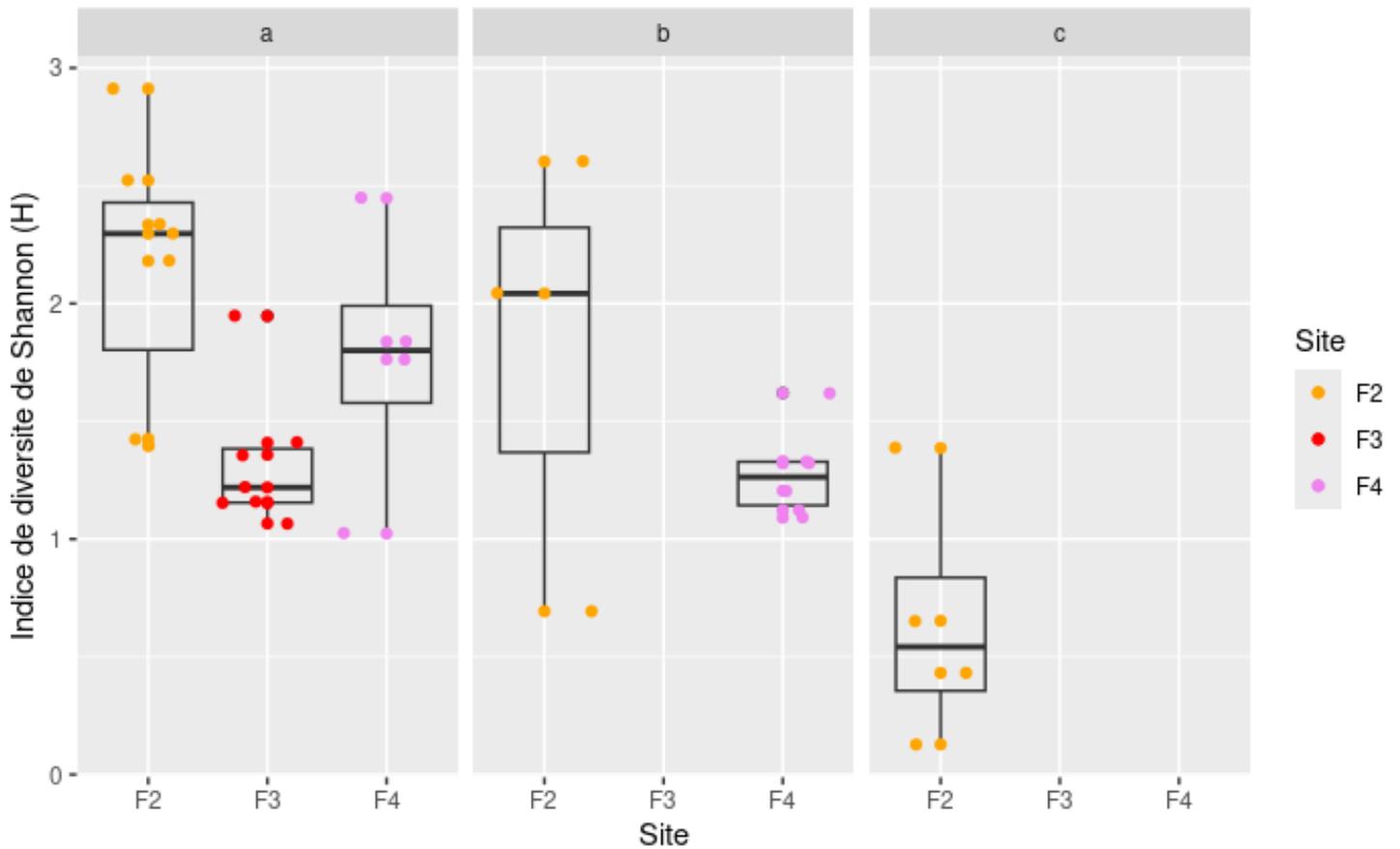


Figure 11 : Boxplot de la diversité alpha des archées fossiles en fonction des différentes époques (a, b et c) pour chaque site.

Tableau 10: Résumé du modèle utilisé pour les boxplot des de la diversité alpha des archées fossiles, avec un R^2 ajusté de 0.4215, une statistique-F de 5.372 et une p-value de 0.00173.

	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
(Intercept)	2.1525	0.1912	11.258	$2.79e^{-11}$
SiteF3	-0.8229	0.2704	-3.043	0.00544
SiteF4	-0.3846	0.3171	-1.213	0.23644
Epoque b	-0.3731	0.3491	-1.069	0.2936
Epoque c	-1.5030	0.3171	-4.740	$7.31e^{-05}$
SiteF3:Epoque b	NA	NA	NA	NA
SiteF4:Epoque b	-0.1132	0.4780	-0.237	0.81474
SiteF3:Epoque c	NA	NA	NA	NA
SiteF4: Epoque c	NA	NA	NA	NA

On peut voir que l'indice de diversité alpha de notre site F3 est significativement plus bas que celui de notre site F2 alors que notre site F4 n'a pas de différence significative. Pour les époques, on peut voir que l'époque b a un indice de diversité inférieur de 0.3731 et que l'époque c a une diversité inférieure de 1.5030, par rapport à l'époque de référence, a. La différence entre les époques a et b n'est pas significative, avec une p-value de 0.2936; en revanche, elle l'est avec l'époque c, avec une p-value de 7.31×10^{-5} . Enfin, on note que les interactions entre les sites et les époques ne jouent pas un rôle significatif sur la variation de la diversité alpha. Dans ce modèle, le R^2 ajusté montre que 42,15% de la variance de l'indice de Shannon est expliquée par ce modèle. Avec une statistique F de 5.372 et une p-value de 0.00173, notre modèle est statistiquement significatif, bien que moins représentatif que pour la diversité alpha bactérienne et eucaryote.

3.4 Diversité beta et corrélation avec les variables environnementales

3.4.1. Communautés des Bactéries

Nous avons effectué une analyse en coordonnées principales (PCoA, diversité beta, distance Hellinger) des communautés bactériennes fossiles : le modèle utilisé pour cette analyse utilise comme variables environnementales les différents sites, la profondeur de chacun en cm ainsi que le pH des sols (Figure 12, Tableau 11). Cette PCoA (Figure 12) nous permet d'observer ici des communautés bactériennes distinctes entre nos trois sites. On peut voir que les échantillons les plus profonds des sites F2 et F4 (voir annexe E et F) convergent vers le même endroit, ce qui peut indiquer une similarité des communautés les plus anciennes, alors que les échantillons les plus récents s'étendent dans des directions différentes. On remarque également que la communauté du site F3 est très éloignée, et donc distincte des deux autres sites.

On constate avec l'analyse permutative de variance (Tableau 11) que toutes les variables ont un impact significatif sur la structure des communautés (diversité beta), avec des p-values significatives, excepté pour la variable d'interaction site : profondeur qui est dix fois moins impactante que les autres dans notre étude. Néanmoins, on constate que le site reste le facteur le plus important, et qu'il explique 34% de la variance de la communauté, suivis du pH avec 7,55% puis de la profondeur avec 7,35%. Ce modèle explique 50,63% de la variation de nos

communautés bactériennes fossiles. D'autres variables environnementales pourraient être rajoutés dans de prochaines études pour affiner ce modèle.

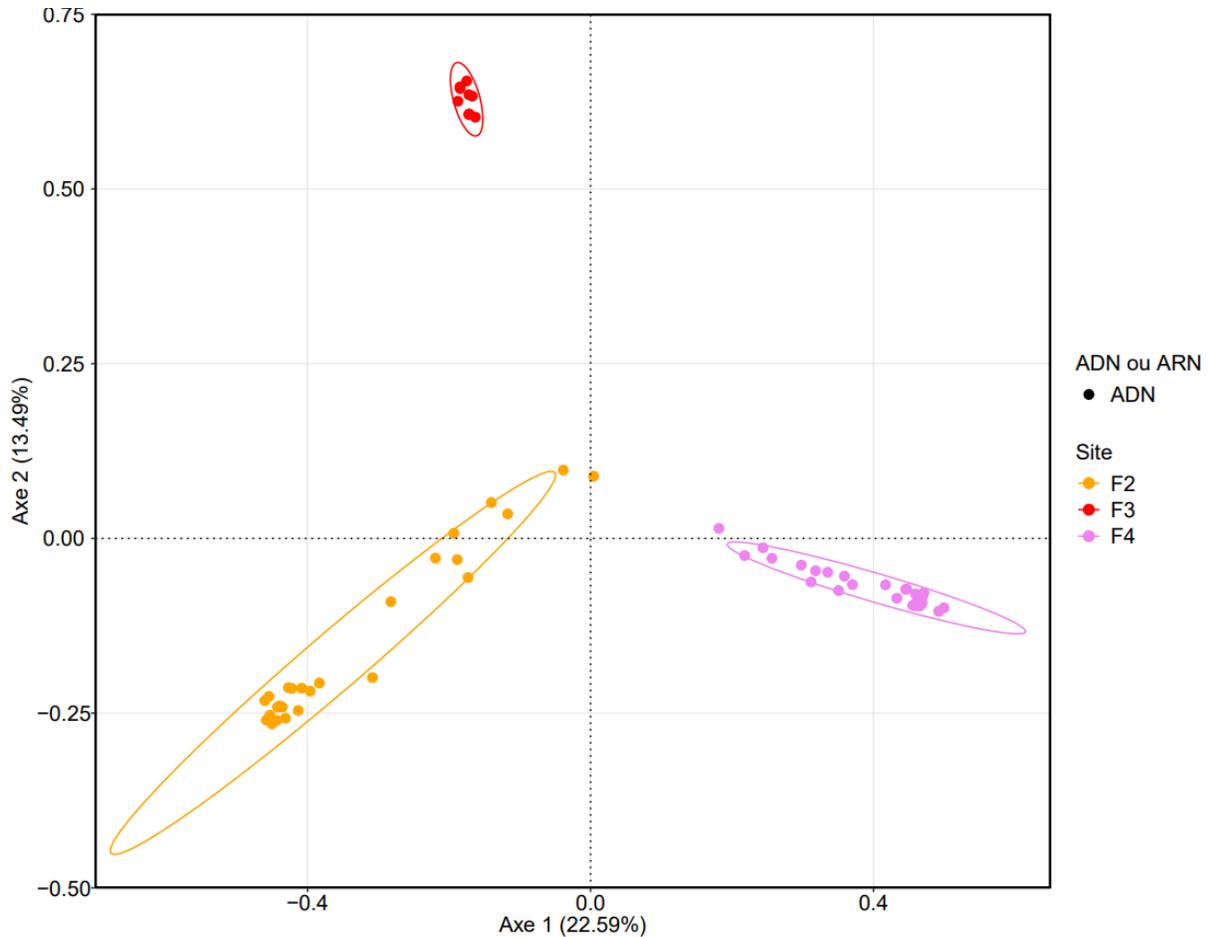


Figure 12: Analyse par PCoA (Principal Coordinates Analysis) de la diversité des ASVs (Amplicon Sequence Variants) bactériens fossiles dans les différents sites en fonction de la profondeur et du pH des sols.

Tableau 11: Tableau de résultat de la Permanova (Permutational Analysis Of Variance) de notre modèle multivarié, expliquant l'importance des différentes variables sur la diversité bactérienne fossile. Le R2 ajusté du modèle est de 0.5063129.

	Df	SumOfSqs	R2	F-value	P-value
Site	2	12.267	0.34014	15.8464	0.001
Profondeur	1	2.649	0.07346	6.8447	0.001
pH sol	1	2.723	0.07550	7.0350	0.001
Site :profondeur	2	2.344	0.06500	3.0281	0.001
Site : pH	2	1.373	0.03807	1.7738	0.011
Residus	38	14.708	0.40783		

3.4.2. Communautés des Eucaryotes

Nous avons effectué une analyse en coordonnées principales (PCoA, diversité beta, distance Hellinger) de nos communautés eucaryotes fossiles : le modèle utilisé pour cette analyse prend en compte les différents sites, la profondeur de chacun en cm ainsi que le pH des sols. Cette PCoA (Figure 13) nous permet d'observer ici des communautés eucaryotes distinctes entre nos trois sites. Même si les résultats sont moins marqués que pour les bactéries, on peut voir que les échantillons les plus profonds (voir annexe E et F) des sites F2 et F4 converge également vers le même endroit, ce qui peut indiquer une similarité des communautés les plus anciennes, alors que les échantillons les plus récents s'étendent dans des directions différentes. On remarque également que la communauté du site F3 est plus éloignée, mais semble cette fois se rapprocher quand même des communautés des deux autres sites.

On constate avec l'analyse permutacionnelle de variance (Tableau 12) que nos variables site et profondeur ont un impact significatif sur notre diversité beta, avec des p-values significatives. Néanmoins, on constate que le site reste le facteur le plus important, et qu'il explique 44,16% de la variance de la communauté. Ce modèle explique 58,76% de la variation de nos communautés eucaryotes fossiles. Contrairement à nos communautés bactériennes, le facteur pH ne joue pas un rôle significatif. Enfin, on peut noter que l'interaction Site : profondeur n'a pas non plus d'impact significatif dans notre étude.

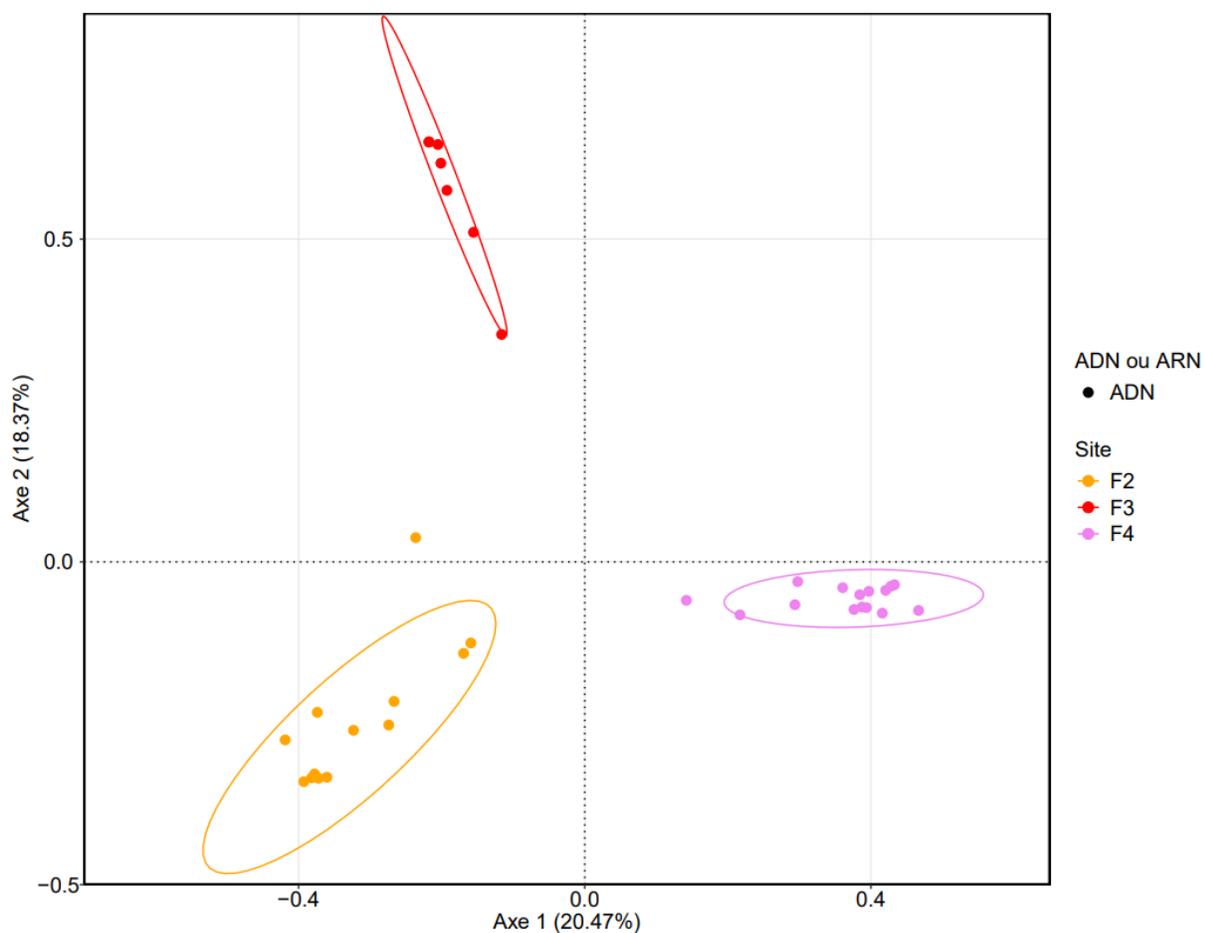


Figure 13 : Analyse par PCoA (Principal Coordinates Analysis) de la diversité des ASVs (Amplicon Sequence Variants) eucaryotes fossiles dans les différents sites en fonction de la profondeur et du pH des sols.

Tableau 12: Tableau de résultat de la Permanova (Permutational Analysis Of Variance) de notre modèle multivarié, expliquant l'importance des différentes variables sur la diversité eucaryote fossile. R2 ajusté du modèle = 0.5875692.

	Df	SumOfSqs	R2	F-value	P-value
Site	2	11.9726	0.44159	18.2018	0.001
Profondeur	1	1.0634	0.03922	3.2334	0.009
pH sol	26	12.3173	0.45430	1.4404	0.056
Site :profondeur	2	0.7727	0.02850	1.1747	0.288
Site : pH	NA	NA	NA	NA	NA
Residus	3	0.9869	0.03639		

3.4.3. Communautés des Archées

Enfin, nous avons effectué une analyse en coordonnées principales (PCoA, diversité beta, distance Hellinger) de nos communautés archées fossiles : le modèle utilisé pour cette analyse prend en compte les différents sites, la profondeur de chacun en cm ainsi que le pH des sols. L'analyse en coordonnées principales (Figure 14) nous permet d'observer ici des communautés d'archées distinctes entre nos trois sites. Comme pour les communautés de bactéries et d'eucaryotes, on peut voir que les échantillons les plus profonds (voir annexe E et F) des sites F2 et F4 convergent vers le même endroit, ce qui peut indiquer une similarité des communautés les plus anciennes, alors que les échantillons les plus récents s'étendent dans des directions différentes. On remarque également que la communauté du site F3 est plus éloignée, et donc distincte des deux autres sites.

On constate avec l'analyse permutative de variance (Tableau 13) que nos variables site, profondeur et pH ont un impact significatif sur la diversité beta, avec des p-values significatives. Néanmoins, on constate que le site reste le facteur le plus important, et qu'il explique 44,16% de la variance de la communauté, suivis du pH avec 40,58%. Ce modèle explique 67,19% de la variation des communautés archées fossiles. Enfin, on peut également noter que les interactions entre sites, pH et profondeur n'ont pas d'impacts significatifs dans notre étude.

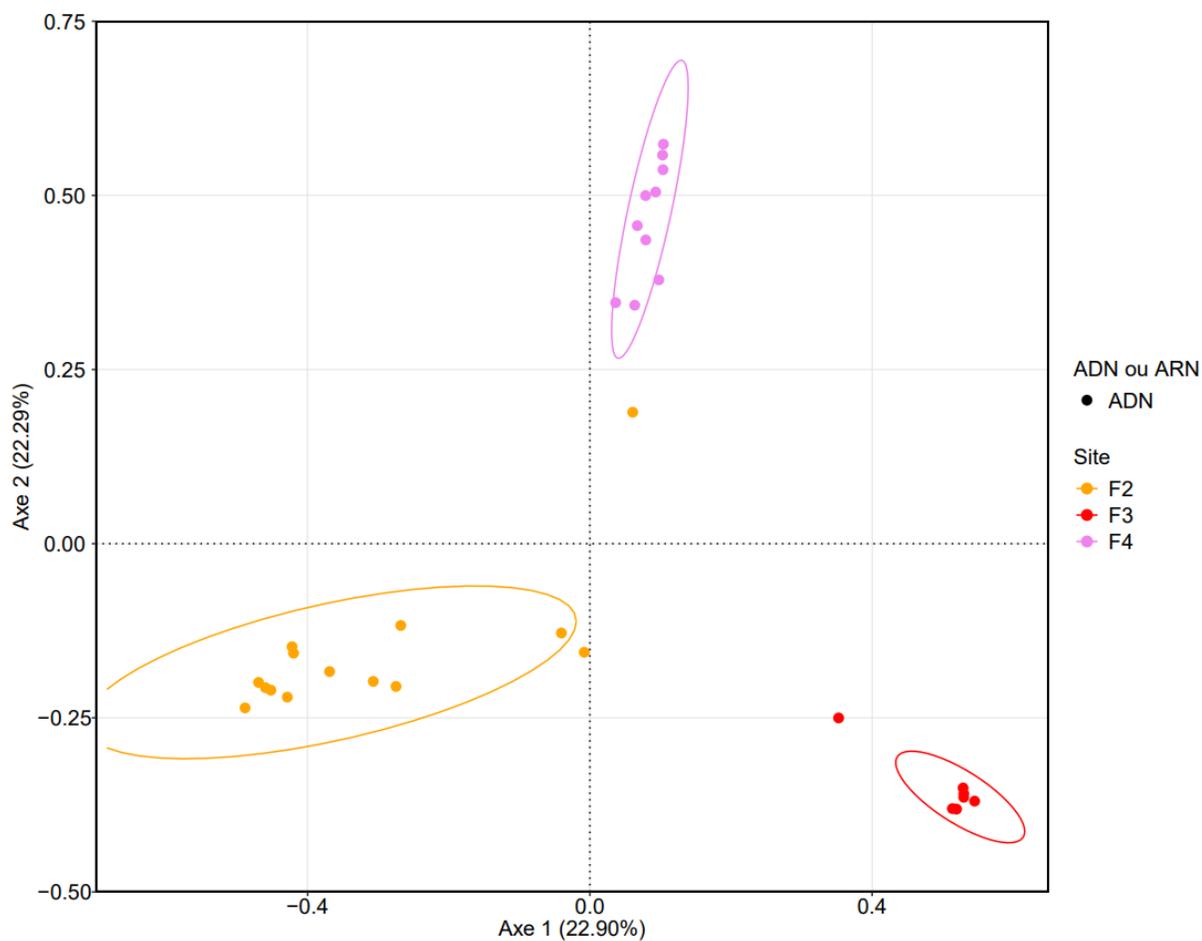


Figure 14 : Analyse par PCoA (Principal Coordinates Analysis) de la diversité des ASVs (Amplicon Sequence Variants) archées fossiles dans les différents sites en fonction de la profondeur et du pH des sols.

Tableau 13: Tableau de résultat de la Permanova (Permutational Analysis Of Variance) de notre modèle multivarié, expliquant l'importance des différentes variables sur la diversité archées fossile. R2 ajusté du modèle = 0.6718634.

	Df	SumOfSqs	R2	F-value	P-value
Site	2	10.3232	0.44378	20.2863	0.001
Profondeur	1	1.9948	0.08575	7.8401	0.001
pH sol	21	9.4386	0.40575	1.7665	0.013
Site :profondeur	1	0.0541	0.00233	0.2126	0.931
Site : pH	1	0.4336	0.01864	1.7042	0.112
Residus	4	1.0178	0.04375		

3.5 Taxons discriminants qui expliquent les différences entre groupes d'échantillons

On a utilisé un test de LefSe pour voir quelles sont les taxons fossiles discriminants pour chaque site (qui sont différents des taxons discriminants des communautés vivantes, voir annexe I). On peut voir que la plupart des taxons présents sur un seul de nos trois sites, et donc exclusifs à celui-ci, sont discriminants et donc contribuent à la différenciation des communautés fossiles. Pour les Bactéries, on remarque que unc. *IMCC26256*, qui est présent sur les trois sites, est en fait un taxon discriminant du site F2, c'est donc son abondance qui lui permet de jouer un rôle discriminant sur ce site (Figure 15). Chez les Eucaryotes, on remarque que plusieurs taxons présents sur plusieurs sites sont discriminant du fait de leur abondance relative: *Pezizomycotina* pour le site F2, *Chromadoreia* pour le site F3 et *Agaricomycotina* pour le site F4 (Figure 16). Cette analyse n'a pas pu être réalisée pour les archées en raison de leur trop grande proximité. En effet, les taxons identifiés ne sont pas suffisamment discriminants entre les trois sites pour marquer une différence de communautés.

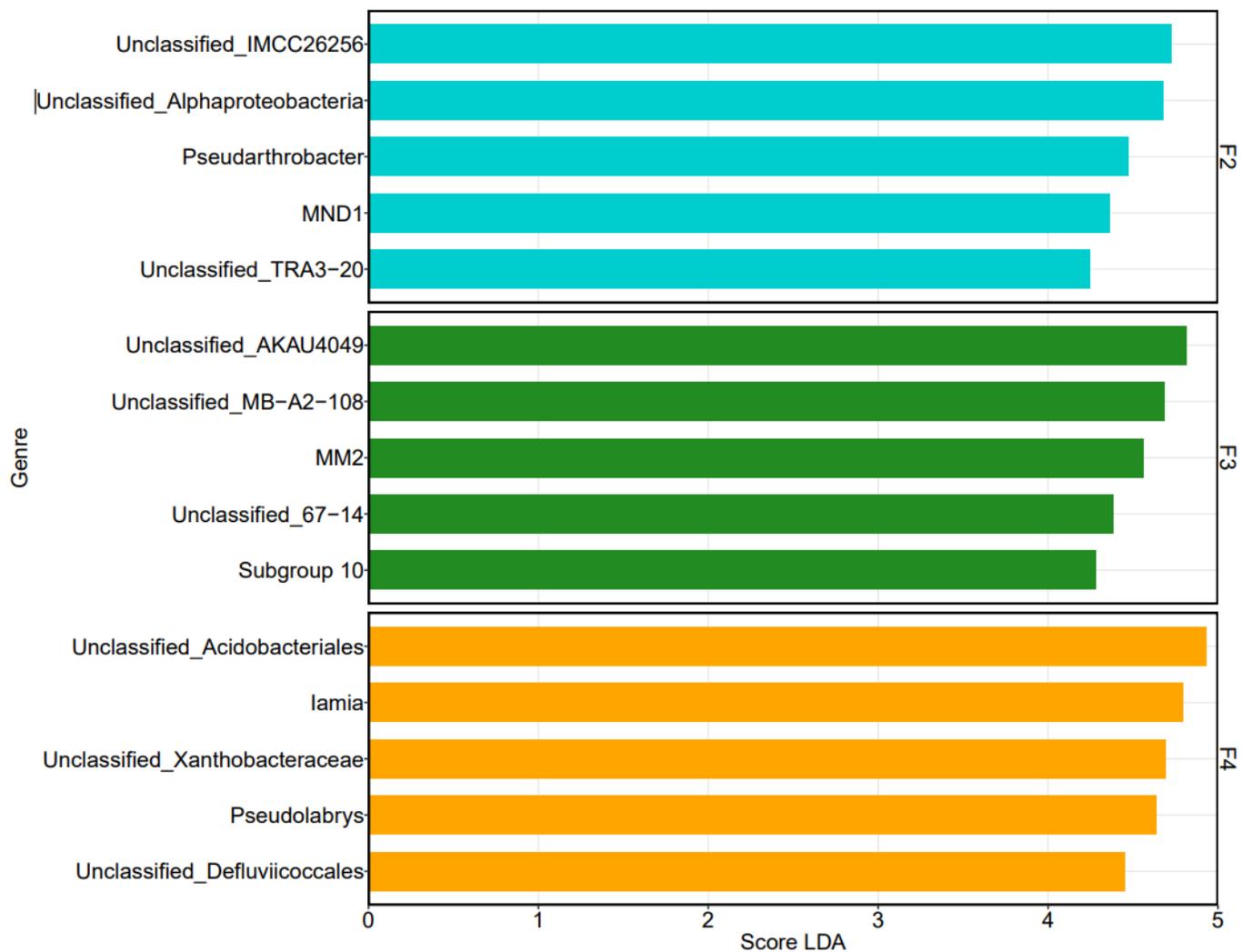


Figure 15 : Résultats de l'analyse par LefSe (Linear discriminant analysis Effect Size) des genres bactériens fossiles entre les différents sites, avec un score de LDA supérieur à 4. La distance utilisée est « Bray-Curtis ».

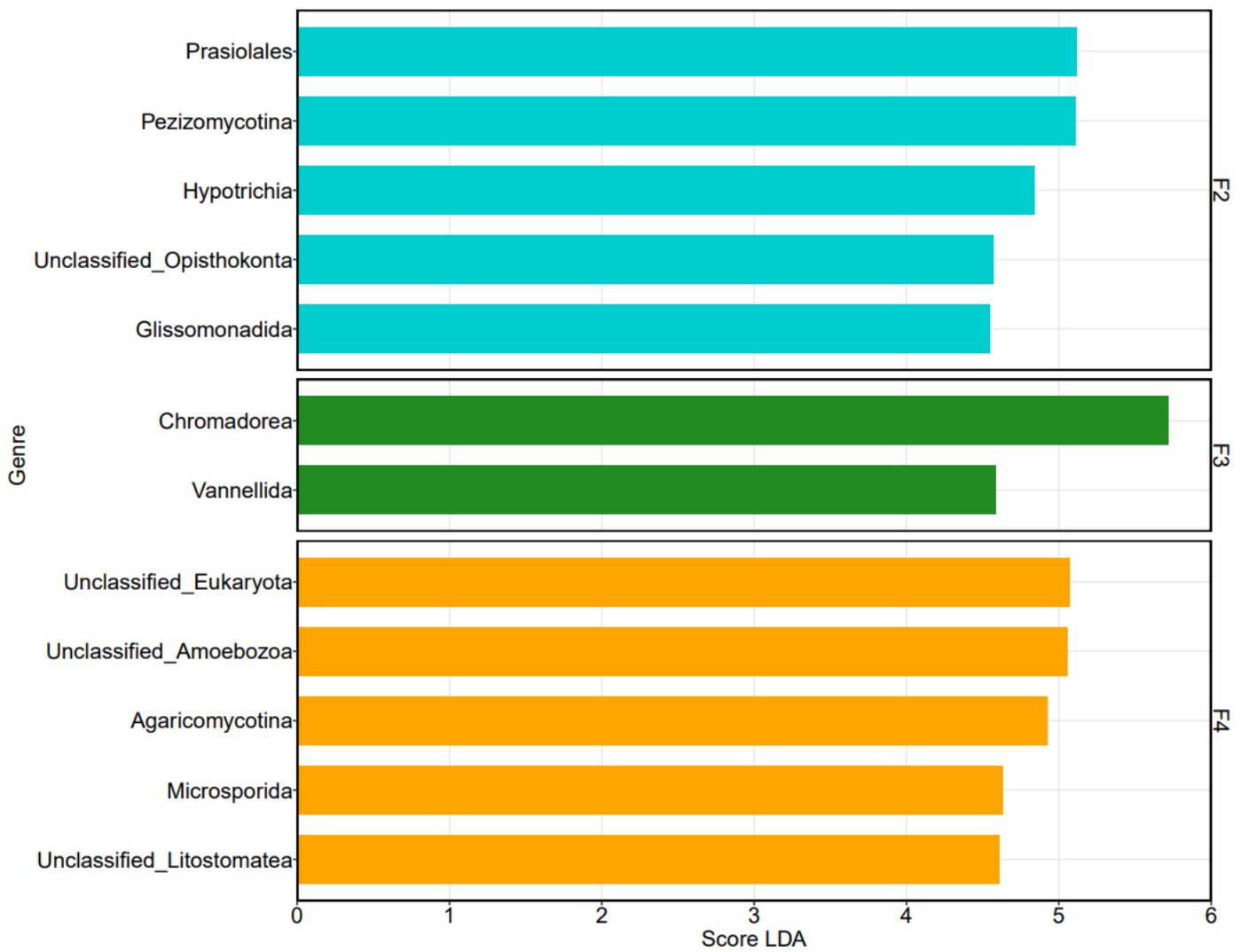


Figure 16: Résultats de l'analyse par LefSe (Linear discriminant analysis Effect Size) des genres eucaryotes fossiles entre les différents sites, avec un score de LDA supérieur à 4. La distance utilisée est « Bray-Curtis ».

IV. DISCUSSION

Notre étude avait pour objectif d'explorer un nouvel aspect de la paléomicrobiologie en étudiant les communautés bactériennes, eucaryotes et archées des sols archéologiques du musée de Pointe-à-Callière. Si de nombreuses études utilisent aujourd'hui l'ADN et l'ARN des microorganismes, notre étude est l'une des premières à s'intéresser à l'utilisation potentielle des microorganismes comme marqueur d'évènements historiques et climatiques (lors des variations) sur un site archéologique.

4.1 La diversité alpha est plus importante dans les couches supérieures que dans les couches profondes

Nous pensions que la diversité allait évoluer dans ce sens dû à la succession des évènements historiques. L'environnement ayant changé de façon successive ces dernières centaines d'années de façon à favoriser l'évolution de la vie (climats moins extrêmes), et les strates du sol s'enfonçant progressivement au cours du temps, nous pensions que les communautés microbiennes allaient se diversifier pour s'adapter à ces nouveaux environnements; créant ainsi un gradient de la diversité alpha.

Nos résultats pour l'analyse de la diversité alpha ont validé nos attentes : nous pouvons voir sur nos droites de régression linéaire ainsi que dans nos tableaux d'ANOVA, que la diversité diminue bien avec la profondeur des carottes, pour les sites F2 et F4 et pour les trois domaines microbiens (Bactérie, Archée, et Eucaryotes). L'évolution de la diversité sur le site F3 concorde également entre nos trois domaines, mais nous donne une pente positive, ce qui signifierait que la diversité alpha augmente avec la profondeur sur ce site. Néanmoins, les données sur ce site s'arrêtant à une profondeur de 10 cm, il est fort possible que cette augmentation de diversité ne soit due qu'au manque de données sur ce site. De plus, on peut observer sur les données des sites F2 et F4 qu'il y a un pic de diversité à 10 cm de profondeur, avant de redescendre. On peut donc suggérer que ce même pic de diversité sur le site F3 modifie le résultat de notre pente. D'après les données des archéologues et des historiens, cette augmentation soudaine de la diversité

pourrait être liée à une recrudescence des activités humaines dans ces environnements. On peut donc penser que certaines activités humaines ont eu tendance à modifier favorablement l'environnement pour un plus grand nombre de microorganismes. Des analyses chimiques des sols pourraient être utilisées pour approfondir les analyses et les liens avec les activités humaines. Les résultats de nos analyses des boxplots confirment pour les sites F2 et f4 la diminution de la diversité alpha avec la profondeur. Ces résultats montrent qu'il est possible d'exploiter ces données en fonction des délimitations fixées par les archéologues dans le temps : en effet, nos résultats, que ce soit avec la profondeur en cm ou par époque, nous permettent des interprétations des données similaires.

Ainsi, ces résultats suggèrent que la diversité alpha est effectivement liée à l'augmentation de l'activité humaine et/ou aux changements environnementaux, et ce, pour les trois domaines du vivant. On voit qu'elle évolue entre la période a (sols d'occupation du fort Ville-Marie), b (sols organiques d'occupation) et c (sols d'argile marine). Cela signifie que les informations sur l'indice de diversité alpha pourraient aider les archéologues en leur donnant une idée des sites fréquentés dans le passé. En revanche, si cette mesure de la diversité alpha est un indicateur de la quantité des changements intervenus, elle ne fournit aucune information sur la nature de ces changements.

4.2 La composition des communautés microbiennes varie en fonction des époques et des lieux

L'hypothèse initiale était que les microorganismes des trois domaines (Bactéries, Archées et Eucaryotes) seraient présents sur chaque site. Pour les périodes les plus anciennes, nous nous attendions à une structure microbienne similaire entre les différents lieux, en raison d'une exposition à un environnement comparable. En revanche, pour les périodes plus récentes, nous pensions que la structure des communautés microbiennes varierait davantage entre les sites, à cause des activités humaines diversifiées au Fort Ville-Marie. Ces changements au fil du temps pourraient ainsi refléter des événements historiques marquants, ce qui ferait des différents taxons microbiens des témoins de ces moments passés.

Les résultats obtenus par les analyses de PCoA et de PERMANOVA ont montré que pour chacun des domaines - Bactéries, Archées, et Eucaryotes– nous avons des communautés distinctes entre nos trois sites. Elles nous permettent également de voir que la composition de la communauté change avec le temps, pour les sites F2 et F4, qui sont les plus profonds et donc qui remontent le plus loin dans le temps. Grâce aux analyses taxonomiques des taxons fossiles présents sur chaque site, et à leur abondance relative, on peut également constater que les taxons dominants ne sont pas identiques, ni pour chaque site, ni pour chaque échantillon.

Plusieurs taxons microbiens sont présents sur les trois sites étudiés, et ils partagent des fonctions écologiques communes. Les *Gemmatimonadaceae*, par exemple, sont impliquées dans le traitement des eaux usées et se retrouvent dans des environnements variés, tels que les habitats d'eau douce, les sols agricoles, et même des sols de forêts méditerranéennes (Valentin Waschulin *et al.* 2022). Leur présence suggère une activité humaine liée à la gestion des ressources en eau et des sols, tout au long de l'occupation du site. Les *IMCC26256* sont des actinobactéries non classifiées au niveau genre ni cultivées, connues pour leur rôle dans la décomposition de la matière organique et la libération de nutriments dans les sols, y compris dans des environnements aussi extrêmes que les sols antarctiques (Valentin Waschulin *et al.* 2022). Leur fonction dans la dégradation organique pourrait indiquer une interaction prolongée avec des déchets organiques humains ou animaux. Les *Agaricomycotina*, un sous-embranchement de champignons, sont également présents sur les trois sites. Ces champignons sont capables de décomposer la matière organique et d'entrer en symbiose avec des plantes, mais peuvent aussi devenir des parasites ou des pathogènes (Torda Varga *et al.* 2019). Leur rôle dans la décomposition des matières ligneuses pourrait indiquer des liens avec les pratiques de construction ou d'agriculture.

La diversité beta observée dans nos résultats a confirmé que les communautés microbiennes sont aussi distinctes que nous l'avions anticipé. Les trois sites étudiés ont servi à des activités humaines variées, notamment durant l'occupation autochtone et à l'intérieur du Fort Ville-Marie. Ces différences, qui s'accroissent avec le temps, renforcent l'idée que les taxons microbiens peuvent servir de marqueurs d'événements historiques spécifiques. Par exemple, les communautés

anciennes des sites F2 et F4 sont associées à la période où la mer de Champlain recouvrait l'île de Montréal. Ces liens pourraient être appuyés par une datation au carbone 14 dans une étude complémentaire. Les *Woesearchaeales*, des archées non classifiées présentes sur ces sites, sont probablement des indicateurs d'environnements marins anciens, en lien avec cette période. De même, la présence de *Rhizobiales* non classifiées, endophytes racinaires favorisant la croissance des plantes, sur les sites F2 et F4, pourrait indiquer une activité agricole ou une végétation dense à l'époque (Xiaoxu Sun *et al.* 2021).

Sur les sites F2 et F3, nous avons également identifié des *Nitrosarchaeum*, des archées impliquées dans le cycle de l'azote. Leur présence témoigne d'une régulation importante des processus de nitrification dans les sols, un aspect essentiel pour maintenir l'équilibre des écosystèmes (Hongbin Zhang *et al.* 2021). En outre, des genres comme *Bauldia*, présents sur F2 et F4, sont connus pour leur rôle dans la dégradation de la matière organique et la purification de l'eau, en lien avec le cycle de l'azote (Benjamin Yee *et al.* 2010). Ces processus biochimiques pourraient être associés à l'impact humain sur l'environnement local, notamment en lien avec des systèmes de gestion de l'eau ou de traitement des déchets.

Certains taxons apparaissent spécifiquement sur certains sites, soulignant les différences entre les lieux et les périodes. Par exemple, des *Bathyarchaeia* non classifiées et des *Nitrosopumilaceae* ont été retrouvées exclusivement sur le site F4, ce qui pourrait refléter un environnement plus ancien ou des conditions particulières liées à la mer de Champlain. Les unc. *SCGC AAA011-D5*, observées sur le site F2, sont probablement liées à des écosystèmes marins ou aquatiques anciens, en raison des similarités avec d'autres taxons présents dans des environnements marins ou estuariens. Enfin, le site F3 se distingue nettement des autres, car il est plus récent et ne mesure que 10 cm. Ce fait est cohérent avec sa structure microbienne distincte, reflétant une activité humaine plus récente et une influence environnementale différente par rapport aux sites plus anciens.

En somme, la composition des communautés microbiennes varie non seulement selon les époques mais aussi selon les lieux, et ces variations sont souvent liées aux événements

historiques et aux activités humaines. Les communautés les plus anciennes des sites F2 et F4 témoignent d'une influence marine, probablement liée à la mer de Champlain, tandis que le site F3 reflète des activités plus récentes. Les différences microbiennes observées offrent des indices précieux pour reconstruire l'histoire environnementale et humaine des sites étudiés.

4.3 Les microorganismes correspondent aux faits historiques du lieu

La présence constante de microorganismes dans les sols permet d'envisager l'utilisation de l'ADN fossile dans les études archéologiques. L'hypothèse initiale était qu'il serait possible de générer une base de données répertoriant les différents taxons de microorganismes en fonction des périodes historiques. L'analyse des communautés microbiennes provenant de différents sites archéologiques pourrait ainsi offrir un aperçu de l'histoire environnementale et humaine, reliant les espèces microbiennes aux activités humaines passées et aux caractéristiques environnementales spécifiques de ces lieux. Les tests de LefSe nous ont permis de cibler des taxons discriminants pour chaque site, et grâce à l'aide des historiens et archéologues qui ont travaillé sur ces sites, nous pouvons commencer à les associer à différentes activités.

4.3.1 Corrélation entre les taxons microbiens fossiles retrouvé et les activités humaines du site F2

Le site F2 semble être associé à des cultures ou d'anciens égouts, avec une diversité microbienne qui reflète potentiellement ces usages historiques. Parmi les taxons observés, on trouve *Woesia*, dont les lignées sont généralement associées aux mers profondes ou côtières, selon des études récentes (Katy Hoffmann *et al.* 2020). Le genre *Chryseolinea* est quant à lui typique des sédiments d'eau douce (Jing-jing Wang *et al.* 2018), tandis que les *Alphaproteobacteria* non classifiées sont connus pour leur rôle dans le cycle des nutriments et leur symbiose avec les plantes (Sergio A Munoz-Gomez *et al.* 2019). D'autres taxons tels que *Pseudarthrobacter* sont associés à la dégradation des hydrocarbures et à l'adaptation aux climats extrêmes, notamment en Antarctique (Kallayane Naloka *et al.* 2024), alors que des lignées non classifiées comme *Zixibacteria* sont retrouvées dans des environnements d'eaux salines anoxiques au Nord du Canada (Adrien Vigneron *et al.* 2021). Certaines espèces, telles que *Nitrospira*, jouent un rôle clé

dans l'oxydation de l'ammoniac et des nitrites, processus présent dans divers environnements (Alejandro Palomo *et al.* 2022). De même, *Bacillus* et les *MND1* sont impliqués dans le cycle de l'azote, tant dans les sols que dans l'eau (Mengjie Yu *et al.* 2021). Enfin, les *Prasiolales*, des algues vertes courantes dans des environnements extrêmes comme les régions polaires, montrent des associations symbiotiques avec les champignons ascomycètes (Svenja Heesch *et al.* 2016). Les communautés fongiques du site incluent également des *Pezizomycotina*, souvent en symbiose avec les plantes et formant des lichens, mais qui peuvent aussi être pathogènes pour les plantes, animaux et humains. De manière similaire, des *Opisthokonta* non classifiés pourraient appartenir à des animaux, champignons ou protistes, souvent en relation symbiotique ou pathogène (Jordi Paps *et al.* 2013). Des protozoaires tels que les *Hypotrichia* et les *Glissomonadida* contribuent à la décomposition de la matière organique et régulent les populations microbiennes dans les sols et eaux douces (Xiaotian Luo *et al.* 2021 ; Alexis T. *et al.* 2011). Les archées *Methanomassiliicoccus* et les archées marines unc. *Marine Group II* sont également représentés, illustrant des associations possibles avec des environnements variés, y compris marins (Christian Rinke *et al.* 2019).

4.3.2 Corrélation entre les taxons microbiens fossiles retrouvé et les activités humaines du site F3

Le site F3, qui est principalement composé de remblai pourrait contenir des sols venant d'une ancienne fosse (qui serait l'équivalent d'un égout) ou à une zone de peinture, avec des communautés microbiennes distinctes de celles des autres sites. Parmi les taxons observés, on trouve des lignées non classifiées telles que *AKAU4049*, associées à la décomposition de la matière organique dans les sols et l'eau (Ze-Ying Zhao *et al.* 2023), et *67-14*, appartenant à l'ordre des *Sulirobacterales*, également impliqué dans la décomposition organique (Siyu Chen *et al.* 2022). D'autres taxons comme *MM2* et *MB-A2-108* montrent des capacités similaires de dégradation de substances récalcitrantes et de stockage du carbone, contribuant ainsi aux cycles biogéochimiques (Hongxin Sun *et al.* 2024). Le *Subgroup 10* et les archées unc. *Nitrosphaeraceae*, quant à eux, participent à la dégradation de la matière organique, au cycle de l'azote et entretient des relations symbiotiques avec les plantes, tout en contribuant à la dégradation des polluants (Yingyi Fu *et al.* 2022; Melinda Megyes *et al.* 2021). Du côté des

nématodes, les *Chromadorea* jouent un rôle dans la régulation des populations microbiennes et la décomposition de la matière organique (Jiyeon Kim *et al.* 2016). De même, les amibes *Vanellida* interviennent dans ces processus, que ce soit dans les sols, les eaux douces ou salées (Y. Mesentsev *et al.* 2021). Enfin, un des taxons les plus présents des communautés d'archées présent sur ce site est la lignée unc. *Termoplasmata* qui joue un rôle important dans la production de méthane et qui est connue pour survivre dans des environnements extrêmes tels que les mines d'acides ou les sources chaudes (Yang Yuan *et al.* 2021).

4.3.3 Corrélation entre les taxons microbiens fossiles retrouvé et les activités humaines du site F4

Le site F4, potentiellement associé à des activités telles que le dépeçage d'animaux ou l'entreposage d'ordures, révèle la présence de microorganismes spécifiques de ces conditions. Les unc. Acidobacterales sont impliqués dans la dégradation de la matière organique et favorisent la croissance des plantes (Melinda Megyes *et al.* 2021). D'autres taxons comme *Defluviicoccales* sont connus pour leur rôle dans la dégradation des hydrocarbures et des polluants organiques, en particulier dans des environnements marins comme le détroit de Fram (Matthias Wietz *et al.* 2021). Les genres tels que *Pseudolabrys* et *Lamia* contribuent aux cycles biogéochimiques des sols et à la fertilité, tout en participant à la dépollution (Yu-Hong Huang *et al.* 2024 ; Wenjun Tan *et al.* 2020). De plus, des bactéries non classifiées *Xanthobacteraceae* fixent l'azote et dégradent les hydrocarbures, souvent en symbiose avec les plantes légumineuses (Yingying Zhou *et al.* 2024). Les archées unc. *Nitrosotaleaceae*, quant à eux, sont connues pour oxyder l'ammoniac dans les sols à faible pH. Dans la faune protozoaire, des groupes comme les *Amoebozoa* non classifiés et les *Litostomatea* remplissent des rôles écologiques essentiels, recyclant les nutriments et servant d'indicateurs de la qualité des sols et des eaux (Yonas I. Tekle *et al.* 2022 ; Peter Vďačný *et al.* 2013). D'autres eucaryotes non classifiés, notamment des *Microsporida*, sont des parasites intracellulaires, tandis que les *Flamellidae* contribuent à la décomposition de la matière organique et colonisent la rhizosphère (Patrick J. Keeling et Naomi M. Fast, 2002 ; Javier A. Ceja-Navarro *et al.* 2021). Candidatus *Methanoperedens* est également un acteur dans les rhizosphères ou le traitement des eaux usées en procédant à l'oxydation

anaérobie du méthane, un processus qui est essentiel pour réduire les émissions de méthane, un puissant gaz à effet de serre (Li-dong Shen *et al.* 2021).

V. CONCLUSION

Les résultats de cette étude ouvrent de nouvelles perspectives prometteuses dans le domaine de la paléomicrobiologie. L'analyse des communautés microbiennes – Bactéries, Archées et Eucaryotes – fossilisées révèle un potentiel d'application important pour d'autres sites archéologiques, soulignant la pertinence d'étendre cette approche à une plus grande variété de sites. Les communautés microbiennes, qu'elles soient fossiles ou vivantes, jouent un rôle complémentaire dans les analyses, et leur étude approfondie permet d'enrichir notre compréhension des écosystèmes anciens et des activités humaines passées.

Il est crucial de mener une analyse complète des communautés microbiennes fossiles pour interpréter leur évolution et leur interaction avec leur environnement. Cette démarche repose non seulement sur l'histoire du site étudié, mais aussi sur des paramètres tels que le type de sol, la nature des roches, le pH et la durée d'exposition à un milieu aquatique ou terrestre. Ces facteurs influencent la conservation et la composition des communautés microbiennes fossilisées.

De plus, les communautés microbiennes encore vivantes, présentes sur ces sites depuis plusieurs centaines d'années, pourraient apporter de nouvelles perspectives. Leur étude, conjointe avec celle des fossiles, pourrait révéler des éléments encore méconnus de la dynamique des écosystèmes microbiens à travers le temps, enrichissant ainsi notre compréhension des interactions entre micro-organismes et environnements anciens.

ANNEXE A : Kit d'extraction

RNeasy PowerSoil Total RNA Kit	(25)
Catalog no.	12866-25
Number of preps	25
PowerBead Tubes, Carbide	25
PowerBead Solution	2 x 42 ml
Solution SR1	7 ml
Solution IRS	2 x 15 ml
Solution SR3	42 ml
Solution SR4	6 x 27.5 ml
Solution SR5	110 ml
Solution SR6	28 ml
Solution SR7	2 x 1.5 ml
JetStar 2.0 Mini Columns	25
Collection Tubes (2.2 ml)	25
Collection Tubes (15 ml)	2 x 50
Quick Start Protocol	1

Tableau S1: Composition du kit d'extraction RNeasy PowerSoil Total RNA Kit

ANNEXE B : Protocole de rétrotranscription

Materials and Equipment

Kit Types Table 1 lists the four available kit sizes.

Table 1 Available kits

Kit Name	Applied Biosystems Part Number
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, 1000 reactions	4368813
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, 200 reactions	4368814
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, 1000 reactions	4374967
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, 200 reactions	4374966

Kit Components Table 2 lists all the kit components.

Table 2 Kit components

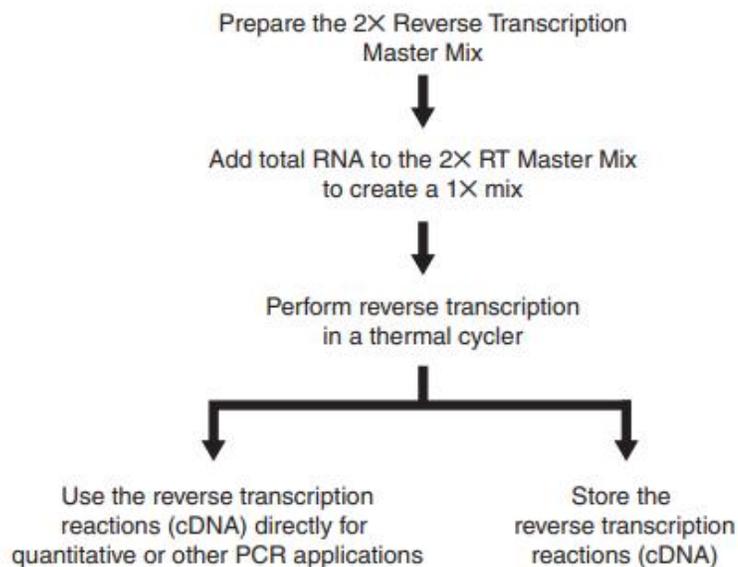
Component	Quantity in 1000 reaction kit	Quantity in 200 reaction kit
10X RT Buffer, 1.0 mL	2 tubes	1 tube
10X RT Random Primers, 1.0 mL	2 tubes	1 tube
25X dNTP Mix (100 mM)	1 tube, 1.0 mL	1 tube, 0.2 mL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/μL	1 tube, 1.0 mL	2 tubes, 0.1 mL
RNase Inhibitor [‡] , 100 μL	10 tubes	2 tubes

[‡] Only in orders that include RNase inhibitor (PN 4374966 or 4374967).

Kit Storage Store all kit components at –15 to –25 °C.

Using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits

Overview To synthesize single-stranded cDNA from total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits:



RNA Template Guidelines For optimal performance of the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems recommends using RNA that is:

- Free of inhibitors of reverse transcription and PCR
- Dissolved in PCR-compatible buffer or water
- Free of RNase activity

Note: If you suspect that the RNA contains RNase activity, add RNase Inhibitor to the reverse transcription reaction at a final concentration of 1.0 U/ μ L.

Input Amount of Total RNA Use up to 2 μ g of total RNA per 20- μ L reaction.

Preparing the 2X Reverse Transcription Master Mix

Prepare the 2X RT master mix using the kit components before preparing the reaction plate.

To prepare the 2X RT master mix (per 20- μ L reaction):

1.	Allow the kit components to thaw on ice.																										
2.	<p>Referring to the table below, calculate the volume of components needed to prepare the required number of reactions.</p> <p>Note: Prepare the RT master mix on ice.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Component</th> <th colspan="2">Volume/Reaction (μL)</th> </tr> <tr> <th>Kit with RNase Inhibitor</th> <th>Kit without RNase Inhibitor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10X RT Buffer</td> <td>2.0</td> <td>2.0</td> </tr> <tr> <td>25X dNTP Mix (100 mM)</td> <td>0.8</td> <td>0.8</td> </tr> <tr> <td>10X RT Random Primers</td> <td>2.0</td> <td>2.0</td> </tr> <tr> <td>MultiScribe™ Reverse Transcriptase</td> <td>1.0</td> <td>1.0</td> </tr> <tr> <td>RNase Inhibitor</td> <td>1.0</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>Nuclease-free H₂O</td> <td>3.2</td> <td>4.2</td> </tr> <tr> <td>Total per Reaction</td> <td>10.0</td> <td>10.0</td> </tr> </tbody> </table> <p>IMPORTANT! Include additional reactions in the calculations to provide excess volume for the loss that occurs during reagent transfers.</p> <p> WARNING CHEMICAL HAZARD. 10X Reverse Transcription Buffer may cause eye, skin, and respiratory tract irritation. Read the MSDS, and follow the handling instructions. Wear appropriate eyewear, clothing, and gloves.</p>	Component	Volume/Reaction (μ L)		Kit with RNase Inhibitor	Kit without RNase Inhibitor	10X RT Buffer	2.0	2.0	25X dNTP Mix (100 mM)	0.8	0.8	10X RT Random Primers	2.0	2.0	MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0	1.0	RNase Inhibitor	1.0	—	Nuclease-free H ₂ O	3.2	4.2	Total per Reaction	10.0	10.0
Component	Volume/Reaction (μ L)																										
	Kit with RNase Inhibitor	Kit without RNase Inhibitor																									
10X RT Buffer	2.0	2.0																									
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8	0.8																									
10X RT Random Primers	2.0	2.0																									
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0	1.0																									
RNase Inhibitor	1.0	—																									
Nuclease-free H ₂ O	3.2	4.2																									
Total per Reaction	10.0	10.0																									
3.	Place the 2X RT master mix on ice and mix gently.																										

Preparing the cDNA Reverse Transcription Reactions

To prepare the cDNA RT reactions:

1.	Pipette 10 μ L of 2X RT master mix into each well of a 96-well reaction plate or individual tube.
2.	Pipette 10 μ L of RNA sample into each well, pipetting up and down two times to mix.
3.	Seal the plates or tubes.
4.	Briefly centrifuge the plate or tubes to spin down the contents and to eliminate any air bubbles.
5.	Place the plate or tubes on ice until you are ready to load the thermal cycler.

Performing Reverse Transcription

To perform reverse transcription:

1.	<p>Program the thermal cycler conditions using one of the thermal cyclers listed in Table 3 on page 4.</p> <p>IMPORTANT! These conditions are optimized for use with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits.</p> <table border="1" data-bbox="613 1045 1279 1184"> <thead> <tr> <th></th> <th>Step 1</th> <th>Step 2</th> <th>Step 3</th> <th>Step 4</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Temperature ($^{\circ}$C)</td> <td>25</td> <td>37</td> <td>85</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>Time</td> <td>10 min</td> <td>120 min</td> <td>5 min</td> <td>∞</td> </tr> </tbody> </table>		Step 1	Step 2	Step 3	Step 4	Temperature ($^{\circ}$ C)	25	37	85	4	Time	10 min	120 min	5 min	∞
	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4												
Temperature ($^{\circ}$ C)	25	37	85	4												
Time	10 min	120 min	5 min	∞												
2.	Set the reaction volume to 20 μL .															
3.	Load the reactions into the thermal cycler.															
4.	Start the reverse transcription run.															

**Storing cDNA
Reverse
Transcription
Reactions**

You can store cDNA RT plates or tubes prepared using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits for short-term or long-term storage.

Storage Duration	Storage Temperature (°C)
Short-term (up to 24 hours before use) [‡]	2 to 6
Long-term	-15 to -25

[‡] For prolonged storage at 2 to 6 °C, add EDTA to a final concentration of 1 mM to chelate cations and to prevent nucleic acid degradation.

IMPORTANT! If required, briefly centrifuge the archive plates or tubes before storing to spin down the contents and to eliminate any air bubbles.

ANNEXE C : Amorces PCR

Tableau S2 : Amorces PCR utilisées pour l'amplification et le séquençage des gènes ARNr 16S et 18S.

Domaines	Amorces	Régions ciblées	Séquence (5'-3')	Référence
Bactéries ARNr 16S	B341F	V3-4	'CCTACGGGAGGCAGCAG'	(Klindworth et al., 2013; Wear et al., 2018)
	B785R	V3-4	'CTACCAGGGTATCTAATCC'	(Klindworth et al., 2013; Wear et al., 2018)
Eucaryotes ARNr 18S	E960F	V7	'GGCTTAATTTGACTCAACRCG'	(Ovreås et al., 1997)
	NSR1438R	V7	'GGGCATCACAGACCTGTTAT'	(Ovreås et al., 1997)
Archées ARNr 16S	A340F	V3-5	'CCCTACGGGGYGASCAG'	(Debroas et al., 2017; Gast et al., 2004; Van de Peer et al., 2000)
	A915R	V3-5	'GTGCTCCCCGCCAATTCCT'	(Debroas et al., 2017; Van de Peer et al., 2000)

ANNEXE D : Conditions des PCR

Tableau S3 : Conditions des PCR utilisées pour l'amplification et le séquençage des gènes ARNr 16S et 18S.

Domaines		Dénaturation	Hybridation	Extension	Fin de l'extension
Bactéries	Nombre de cycles		33		1
	Temps	30s	1min	1min	10min
	Température	98°C	57°C	72°C	72°C
Eucaryotes	Nombre de cycles		40		1
	Temps	30s	30s	1min	10min
	Température	98°C	56.6°C	72°C	72°C
Archées	Nombre de cycles		40		1
	Temps	30s	30s	1min	10min
	Température	98°C	58°C	72°C	72°C

ANNEXES E : PCOA des communautés microbiennes complètes

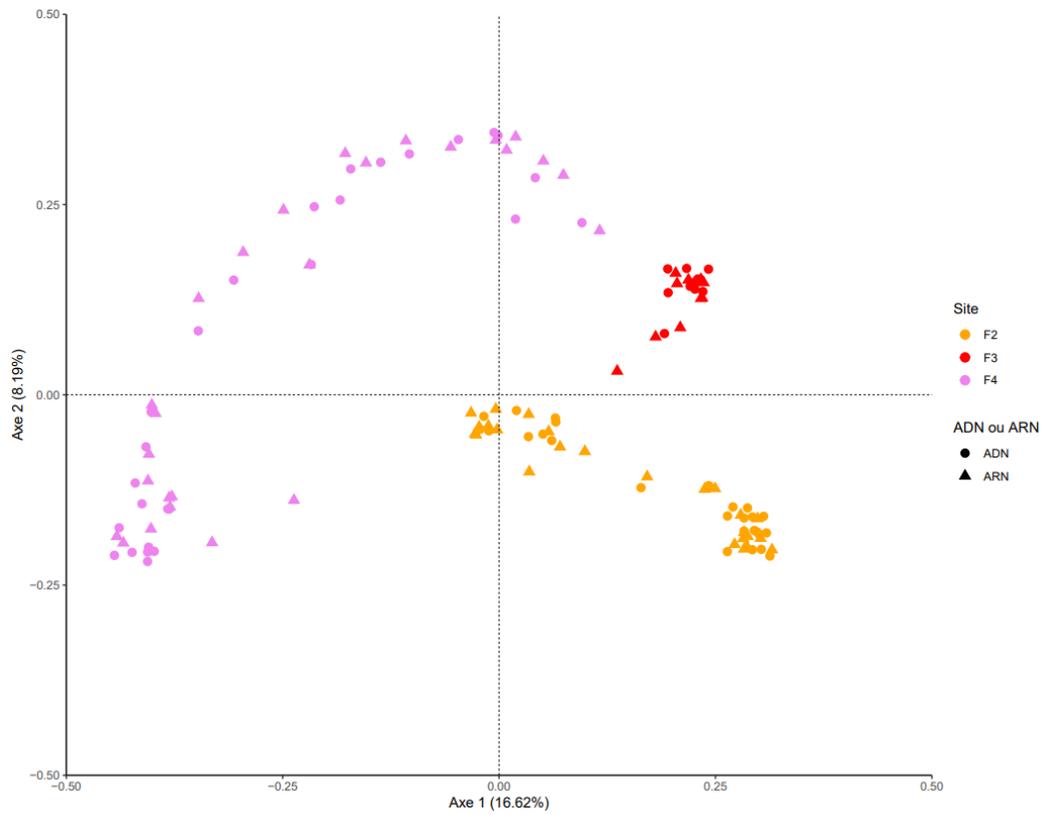


Figure S1 : PCOA des communautés bactériennes complètes (ADN total).

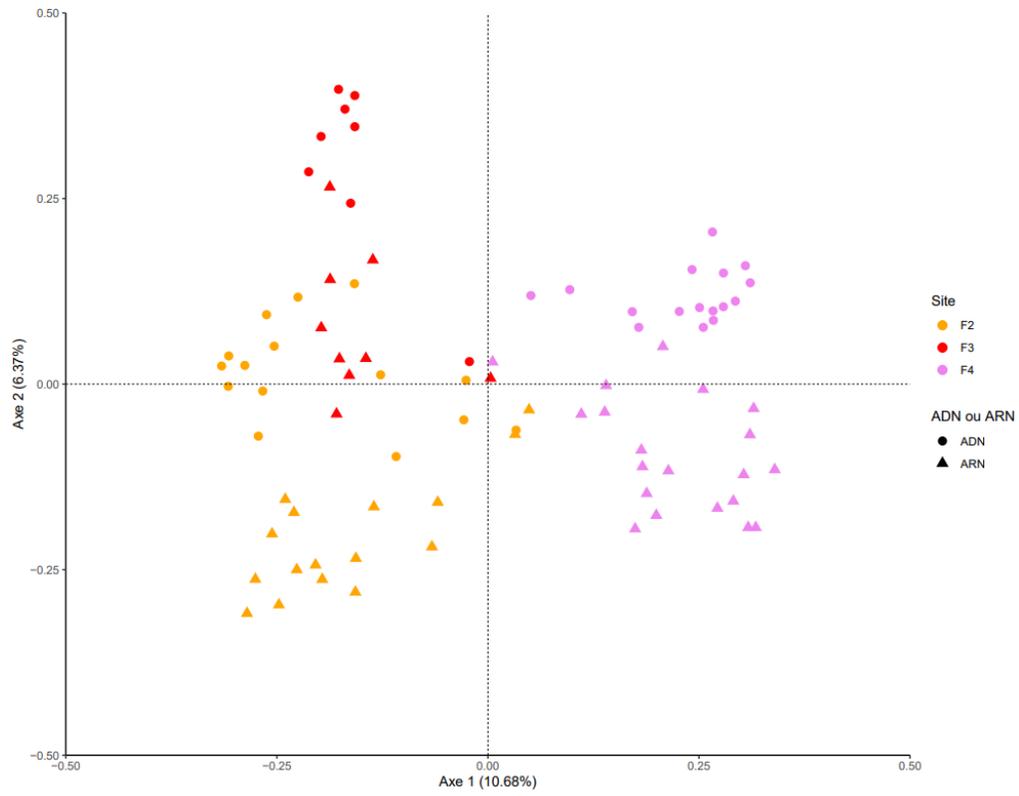


Figure S2 : PCOA des communautés eucaryotes complètes (ADN total).

ANNEXE F : PCOA des communautés microbiennes complètes avec les noms des échantillons.

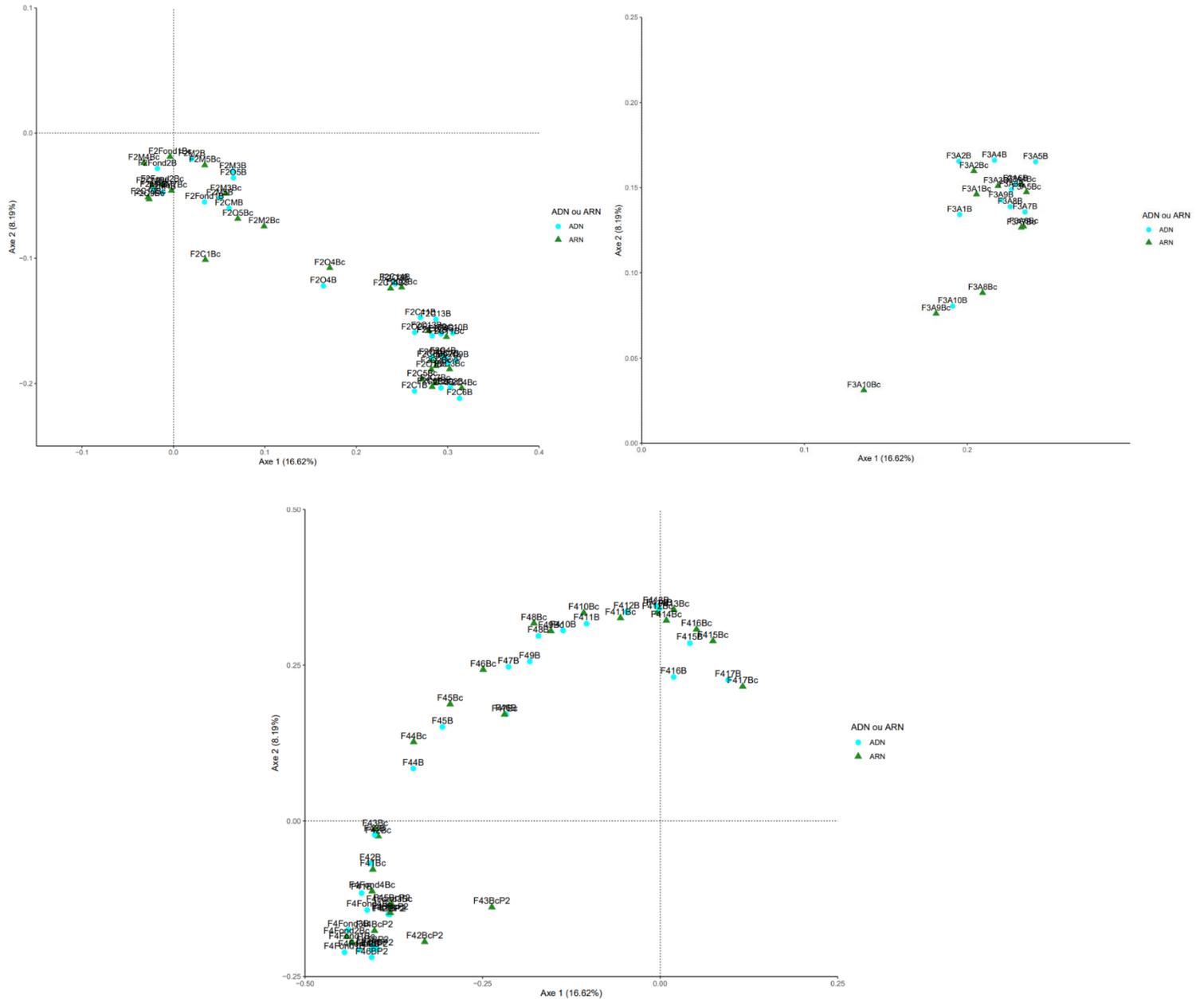


Figure S4 : PCoA des communautés bactériennes complètes (ADN total) avec le nom des échantillons pour chaque site.

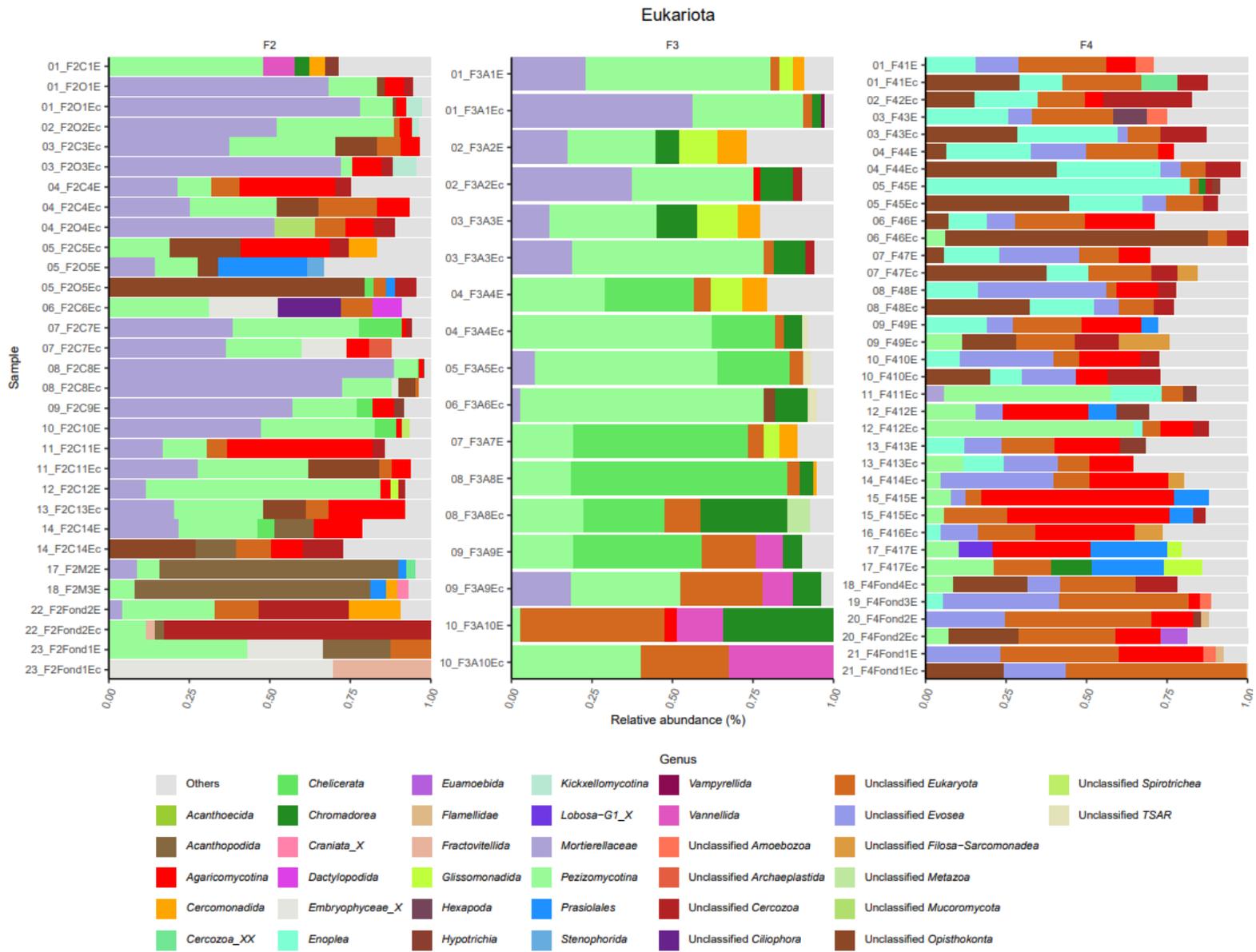


Figure S8 : Taxonomie des communautés eucaryotes complètes (ADN total).

Archaea

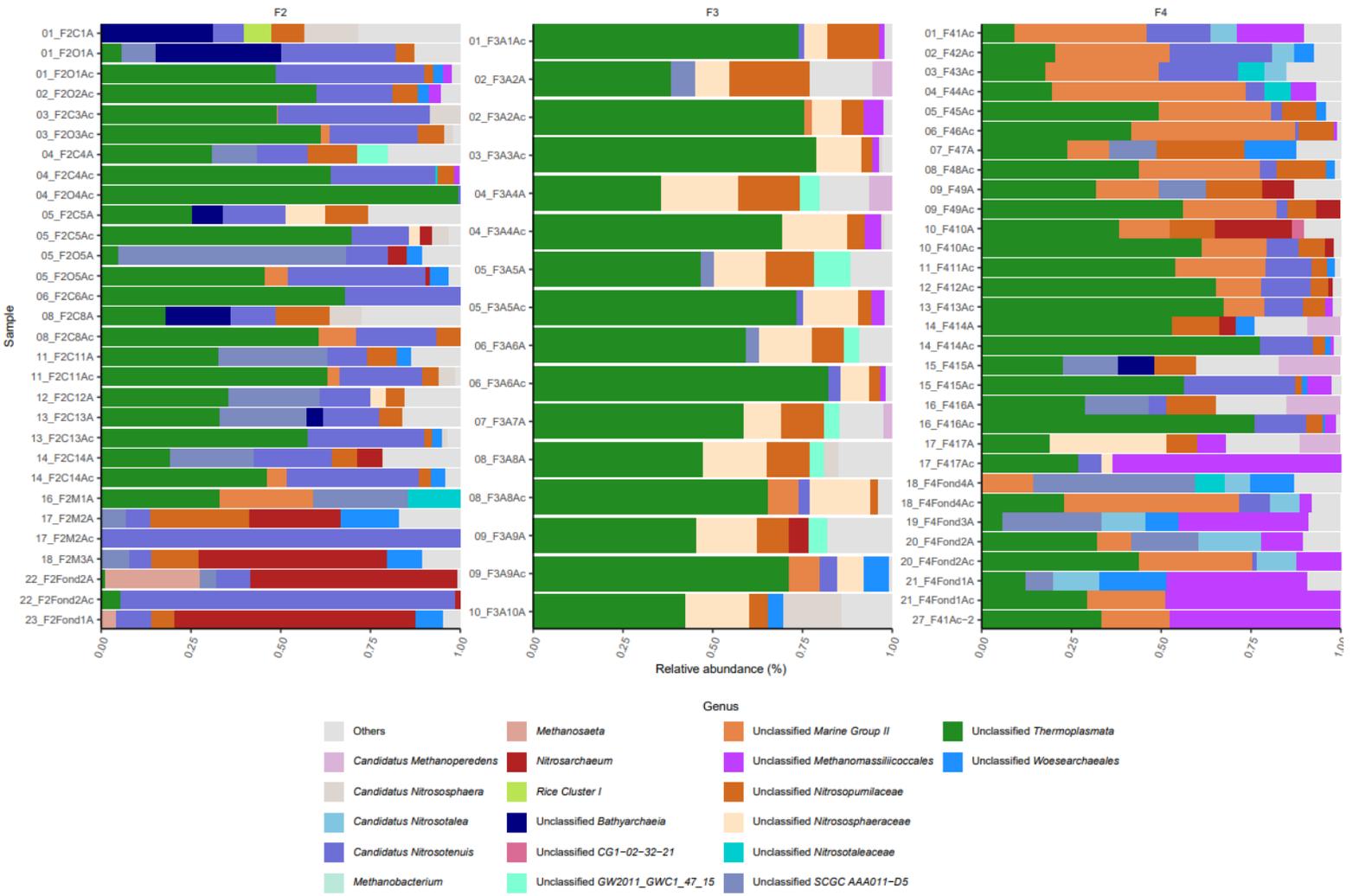


Figure S9 : Taxonomie des communautés d'archées complètes (ADN total).

ANNEXE H : Taxonomie ARN uniquement

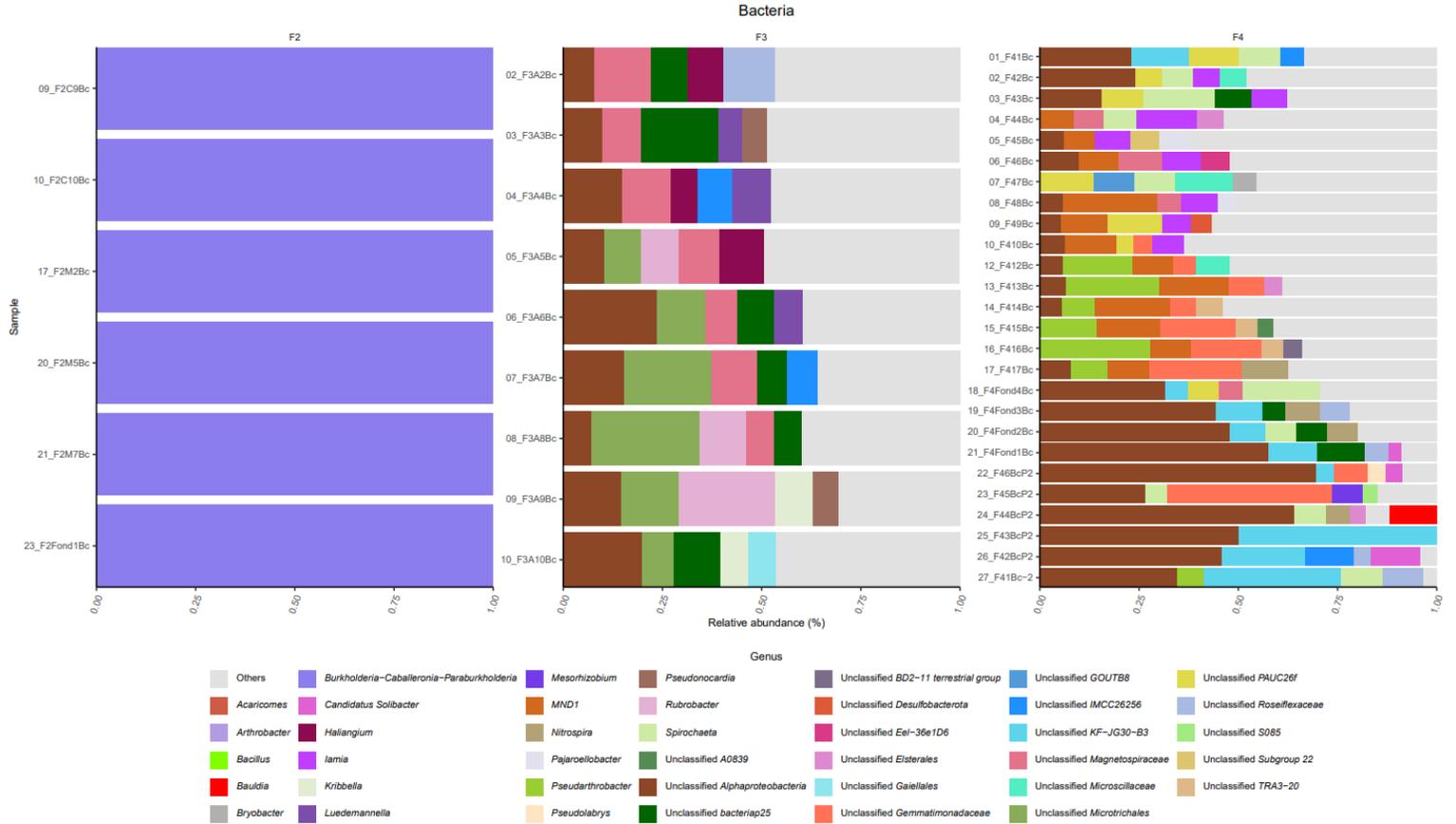


Figure S10 : Taxonomie des communautés bactériennes vivantes (ARN).

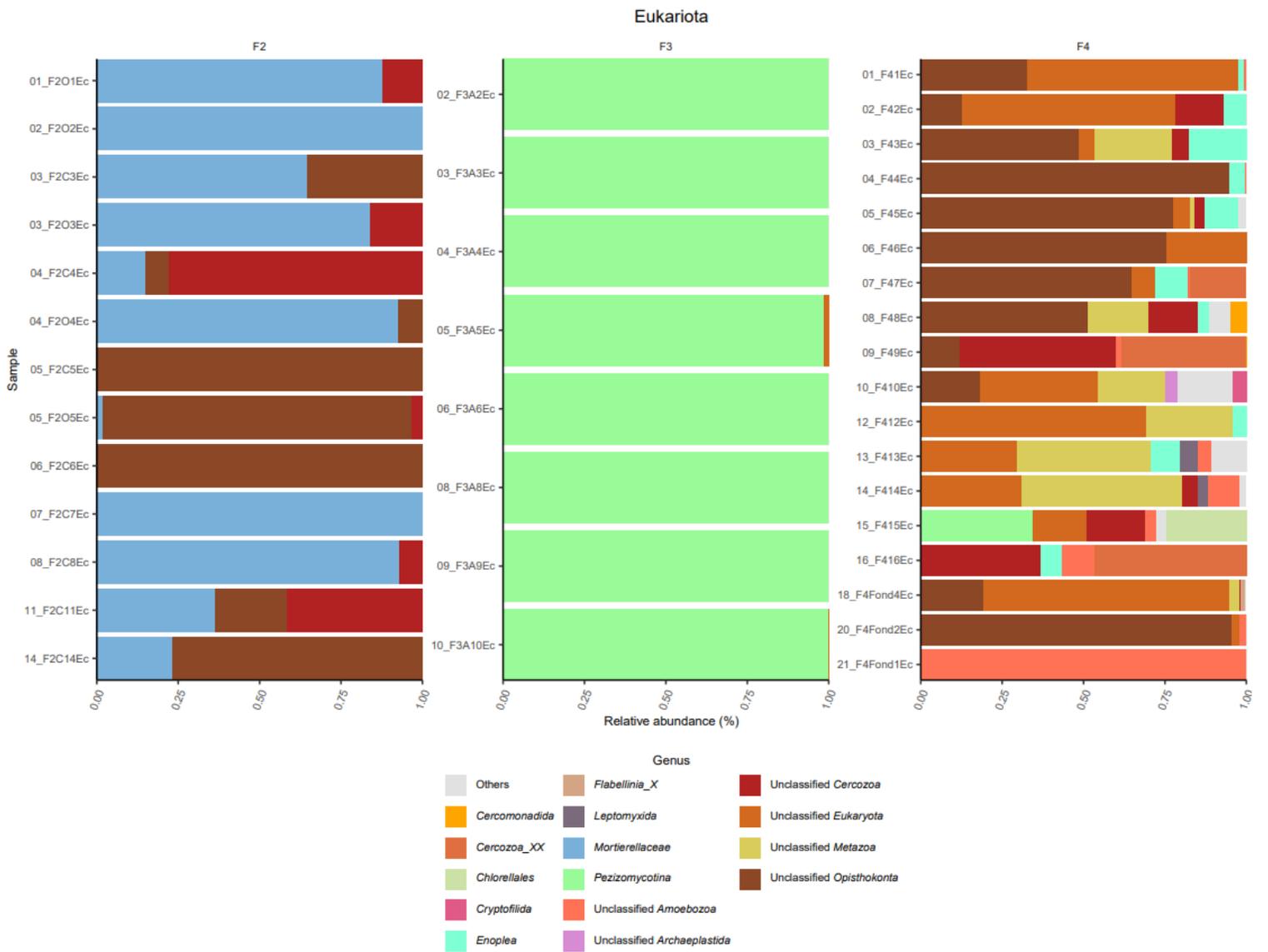


Figure S11 : Taxonomie des communautés eucaryotes vivantes (ARN).

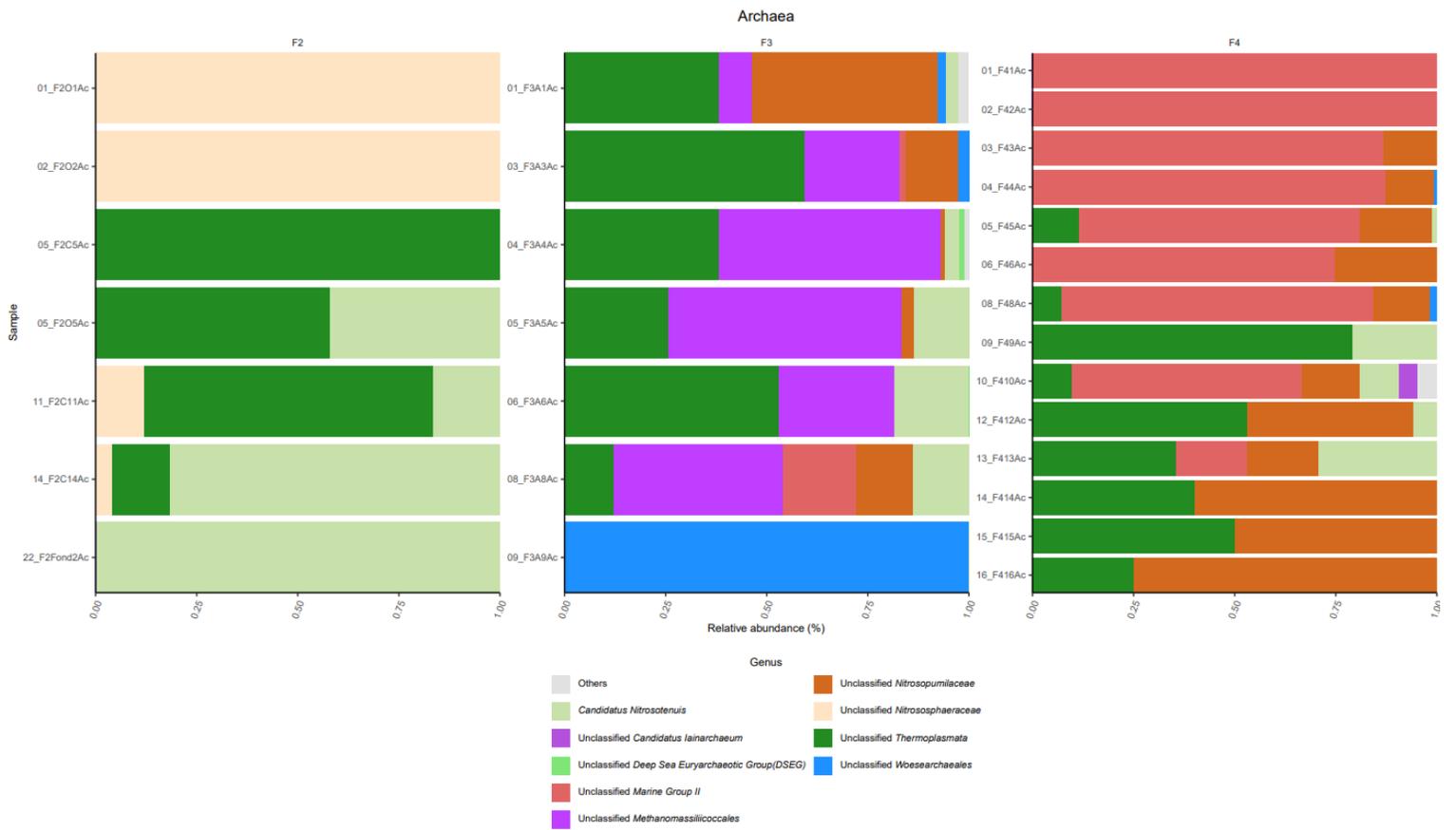


Figure S12 : Taxonomie des communautés d'archées vivantes (ARN).

ANNEXE I : LefSe des communautés complètes

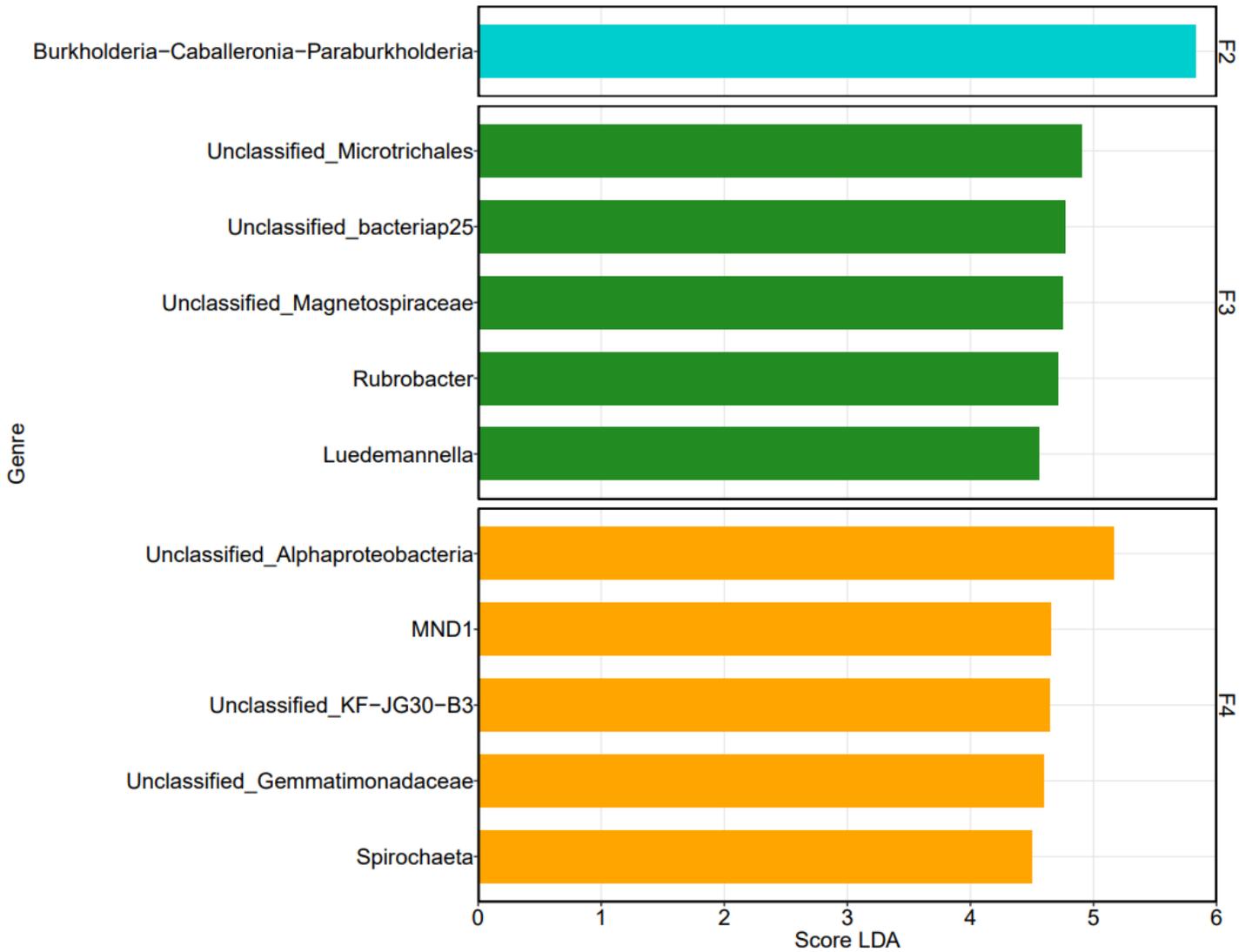


Figure S13 : Résultats de l'analyse par LefSe (Linear discriminant analysis Effect Size) des genres bactériens vivants entre les différents sites. La distance utilisée est « Bray-Curtis »

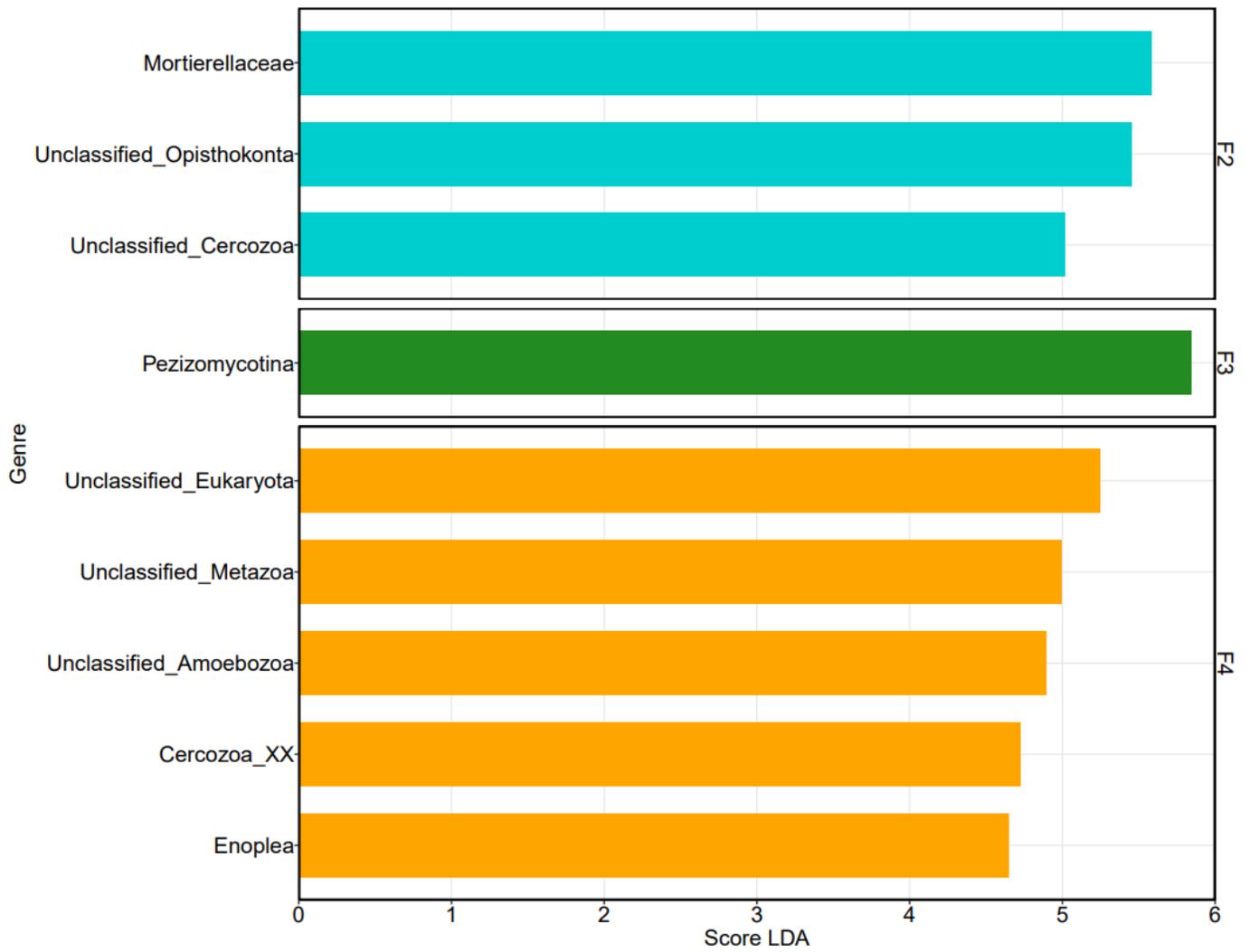


Figure S14 : Résultats de l'analyse par LefSe (Linear discriminant analysis Effect Size) des genres eucaryotes vivants entre les différents sites. La distance utilisée est « Bray-Curtis »

BIBLIOGRAPHIE

- Alex Lefrancois-Leduc et Mélanie Johnson-Gervais sous la direction de Christian Bélanger et Brad Loewen ; *Fouilles archéologiques dans l'îlot Callière à Montréal, BfJ-101 Rapport d'activités – Intervention de 2013* ; Université de Montréal.
- Alison M. Cupples, Jean-Rene Thelusmond; *Predicting the occurrence of monooxygenases and their associated phylotypes in soil microcosms*; (2021)
- Barnes, Matthew & Turner, Cameron. (2015). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*. 17. 10.1007/s10592-015-0775-4.
- C.R. Woese, & G.E. Fox, *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (11) 5088-5090 (1977).
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016 Jul;13(7):581-3. doi: 10.1038/nmeth.3869. Epub 2016 May 23. PMID: 27214047; PMCID: PMC4927377.
- Capo E, Monchamp ME, Coolen MJL, Domaizon I, Armbrecht L, Bertilsson S. Environmental paleomicrobiology: using DNA preserved in aquatic sediments to its full potential. *Environ Microbiol*. 2022 May;24(5):2201-2209. doi: 10.1111/1462-2920.15913. Epub 2022 Feb 7. PMID: 35049133; PMCID: PMC9304175.
- Cassandre Lazar et Valérie Bertrand; *Rapport d'étude : dans le cadre du contrat de service établi entre l'université du Québec à Montréal et le musée d'archéologie pointe-à-callière* (2019).
- Castro HF, Classen AT, Austin EE, Norby RJ, Schadt CW. Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Feb;76(4):999-1007. doi: 10.1128/AEM.02874-09. Epub 2009 Dec 18. PMID: 20023089; PMCID: PMC2820983.
- Cathryn Abbott et al ; *Lignes directrices sur l'utilisation des analyses ciblées d'ADN environnemental (ADNe) pour la gestion des espèces aquatiques envahissantes et des espèces en péril* ;(2021).
- Ceja-Navarro JA, Wang Y, Ning D, Arellano A, Ramanculova L, Yuan MM, Byer A, Craven KD, Saha MC, Brodie EL, Pett-Ridge J, Firestone MK. Protist diversity and community complexity in the rhizosphere of switchgrass are dynamic as plants develop. *Microbiome*. 2021 Apr 28;9(1):96. doi: 10.1186/s40168-021-01042-9. PMID: 33910643; PMCID: PMC8082632.
- Chen S, Sun Y, Wei Y, Li H, Yang S. Different rhizosphere soil microbes are recruited by tomatoes with different fruit color phenotypes. *BMC Microbiol*. 2022 Aug 31;22(1):210. doi: 10.1186/s12866-022-02620-z. PMID: 36045321; PMCID: PMC9429755.
- Erwan, Roussel & Laure, Sauvadet & Allard, Jonathan & Carine, Chaduteau & Richard, Pierre & Cambon-Bonavita, Marie-Anne & Chaumillon, Eric. (2009). Archaeal Methane Cycling Communities Associated with Gassy Subsurface Sediments of Marennes-Oleron Bay (France). *Geomicrobiology Journal*. 26. 31-43. 10.1080/01490450802599284.

- Escobar-Zepeda A, Vera-Ponce de León A, Sanchez-Flores A. The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. *Front Genet.* 2015 Dec 17;6:348. doi: 10.3389/fgene.2015.00348. PMID: 26734060; PMCID: PMC4681832.
- Fierer N, Jackson RB. *The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 17;103(3):626-31. doi: 10.1073/pnas.0507535103. Epub 2006 Jan 9. PMID: 16407148; PMCID: PMC1334650.
- Francine Lelièvre; *Au temps de la fondation de Montréal, Pointe-à-Callière ; Pointe-à-Callière Cité d'archéologie et d'histoire de Montréal,* (2017).
- Francine Lelièvre; *Pointe-à-Callière, carrefour d'archéologie et d'histoire ; Pointe-à-Callière Cité d'archéologie et d'histoire de Montréal,* (2020).
- Francine Lelièvre; *Pointe-à-Callière, lieu de fondation de Montréal ; Pointe-à-Callière Cité d'archéologie et d'histoire de Montréal,* (2017).
- G.T. Hill, N.A. Mitkowski, L. Aldrich-Wolfe, L.R. Emele, D.D. Jurkonie, A. Ficke, S. Maldonado-Ramirez, S.T. Lynch, E.B. Nelson, Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities, *Applied Soil Ecology*, Volume 15, Issue 1, 2000, Pages 25-36, ISSN 0929-1393,
- Groult B, Bredin P, Lazar CS. Ecological processes differ in community assembly of Archaea, Bacteria and Eukaryotes in a biogeographical survey of groundwater habitats in the Quebec region (Canada). *Environ Microbiol.* 2022 Dec;24(12):5898-5910. doi: 10.1111/1462-2920.16219. Epub 2022 Oct 5. PMID: 36135934.
- Hoffmann K, Bienhold C, Buttigieg PL, Knittel K, Laso-Pérez R, Rapp JZ, Boetius A, Offre P. Diversity and metabolism of Woeseiales bacteria, global members of marine sediment communities. *ISME J.* 2020 Apr;14(4):1042-1056. doi: 10.1038/s41396-020-0588-4. Epub 2020 Jan 27. PMID: 31988474; PMCID: PMC7082342.
- Hongxin Sun, Miaomiao Chen, Liang Wei, Peiyong Xue, Quanli Zhao, Peipei Gao, Liping Geng, Qingxi Wen, Wenju Liu, Roots recruited distinct rhizo-microbial communities to adapt to long-term Cd and As co-contaminated soil in wheat-maize rotation, *Environmental Pollution*, Volume 342, 2024, 123053, ISSN 0269-7491
- Howe AT, Bass D, Chao EE, Cavalier-Smith T. New genera, species, and improved phylogeny of Glissomonadida (Cercozoa). *Protist.* 2011 Nov;162(5):710-22. doi: 10.1016/j.protis.2011.06.002. Epub 2011 Jul 23. PMID: 21783412.
- Jean-Claude Duplessy, Maurice Arnold, Edouard Bard, Elsa Cortijo, Laurent Labeyrie, et al. Le carbone 14: progrès récents et limitations de la méthode de datation. *Hydrologie et géochimie iso topique.* Causse C. (ed.), Gasse F. (ed.). ORSTOM, Paris, pp. 229-250. (Colloques et Séminaires). ISBN 2-709-1377-1, pp.229-250, 1998. hal-02506101
- Jiyeon Kim, Elizabeth Kern, Taeho Kim, Mikang Sim, Jaebum Kim, Yuseob Kim, Chungoo Park, Steven A. Nadler, Joong-Ki Park, Phylogenetic analysis of two Plectus mitochondrial genomes (Nematoda: Plectida) supports a sister group relationship between Plectida and Rhabditida within

Chromadorea, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Volume 107, 2017, Pages 90-102, ISSN 1055-7903

Jordi Paps, Luis A. Medina-Chacón, Wyth Marshall, Hiroshi Suga, Iñaki Ruiz-Trillo, *Molecular Phylogeny of Unikonts: New Insights into the Position of Apusomonads and Ancyromonads and the Internal Relationships of Opisthokonts*, *Protist*, Volume 164, Issue 1, 2013, Pages 2-12, ISSN 1434-4610

Keeling PJ, Fast NM. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol.* 2002; 56:93-116. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160854. Epub 2002 Jan 30. PMID: 12142484.

Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan 7;41(1):e1. doi: 10.1093/nar/gks808. Epub 2012 Aug 28. PMID: 22933715; PMCID: PMC3592464.

Köhler JM, Ehrhardt L, Günther PM. Archaeal and Extremophilic Bacteria from Different Archaeological Excavation Sites. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 14;24(6):5519. doi: 10.3390/ijms24065519. PMID: 36982593; PMCID: PMC10052888.

L, Bennett KD, Ficetola GF, Alsos IG, Suyama Y, Wood JR, Pedersen MW. Ancient plant DNA in lake sediments. *New Phytol.* 2017 May;214(3):924-942. doi: 10.1111/nph.14470. Epub 2017 Apr 3. PMID: 28370025.

Lacelle D, Fisher DA, Coulombe S, Fortier D, Frappier R. Buried remnants of the Laurentide Ice Sheet and connections to its surface elevation. *Sci Rep.* 2018 Sep 5;8(1):13286. doi: 10.1038/s41598-018-31166-2. PMID: 30185871; PMCID: PMC6125386.

Lhoste, E., Comte, F., Brown, K., Delisle, A., Jaclin, D., Ponsin, V., Rosabal, M., & Lazar, C. S. (2023). Bacterial, Archaeal, and Eukaryote Diversity in Planktonic and Sessile Communities Inside an Abandoned and Flooded Iron Mine (Quebec, Canada). *Applied Microbiology*, 3(1), 45-63.

Li, J.; Delgado-Baquerizo, M.; Maestre, F.T.; Reich, P.B.; Jeffries, T.C.; Gaitan, J.J.; Encinar, D.; Berdugo, M.; Campbell, C.D.; Singh, B.K. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. Nat. Commun. (2016), 7, 10541.

Luo X, Bourland WA, Song W, Huang J. New contributions to the taxonomy of urostyleid ciliates (Ciliophora, Hypotrichia), with establishment of a new genus and new species. *Eur J Protistol.* 2021 Aug; 80:125810. doi: 10.1016/j.ejop.2021.125810. Epub 2021 May 19. PMID: 34303130.

Melinda Megyes, Andrea K. Borsodi, Tamás Árendás, Károly Márialigeti, Variations in the diversity of soil bacterial and archaeal communities in response to different long-term fertilization regimes in maize fields, *Applied Soil Ecology*, Volume 168, 2021, 104120, ISSN 0929-1393

Mengjie Yu, Wei-qin Su, Laibin Huang, Sanjai J. Parikh, Caixian Tang, Randy A. Dahlgren, Jianming Xu, Bacterial community structure and putative nitrogen-cycling functional traits along a charosphere gradient under waterlogged conditions, *Soil Biology and Biochemistry*, Volume 162, 2021, 108420, ISSN 0038-0717

- Muñoz-Gómez SA, Hess S, Burger G, Lang BF, Susko E, Slamovits CH, Roger AJ. An updated phylogeny of the *Alphaproteobacteria* reveals that the parasitic *Rickettsiales* and *Holosporales* have independent origins. *Elife*. 2019 Feb 25;8: e42535. doi: 10.7554/eLife.42535. PMID: 30789345; PMCID: PMC6447387.
- Naloka K, Kuntaveesuk A, Muangchinda C, Chavanich S, Viyakarn V, Chen B, Pinyakong O. *Pseudomonas* and *Pseudarthrobacter* are the key players in synergistic phenanthrene biodegradation at low temperatures. *Sci Rep*. 2024 May 25;14(1):11976. doi: 10.1038/s41598-024-62829-y. PMID: 38796616; PMCID: PMC11127967.
- Nguyen VH, Wemheuer B, Song W, Bennett H, Webster N, Thomas T. Identification, classification, and functional characterization of novel sponge-associated acidimicrobial species. *Syst Appl Microbiol*. 2023 Jul;46(4):126426. doi: 10.1016/j.syapm.2023.126426. Epub 2023 Apr 28. PMID: 37141831.
- Pace NR, Stahl AD, Lane JD, Olson JG (1986) *Advances in Microbial Ecology; Analyzing natural microbial populations by ribosomal RNA sequences*.
- Palomo A, Dechesne A, Pedersen AG, Smets BF. Genomic profiling of *Nitrospira* species reveals ecological success of comammox *Nitrospira*. *Microbiome*. 2022 Nov 30;10(1):204. doi: 10.1186/s40168-022-01411-y. PMID: 36451244; PMCID: PMC9714041.
- Pedersen MW, Overballe-Petersen S, Ermini L, Sarkissian CD, Haile J, Hellstrom M, Spens J, Thomsen PF, Bohmann K, Cappellini E, Schnell IB, Wales NA, Carøe C, Campos PF, Schmidt AM, Gilbert MT, Hansen AJ, Orlando L, Willerslev E. Ancient and modern environmental DNA. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015 Jan 19;370(1660):20130383. doi: 10.1098/rstb.2013.0383. PMID: 25487334; PMCID: PMC4275890.*
- Pedersen MW, Overballe-Petersen S, Ermini L, Sarkissian CD, Haile J, Hellstrom M, Spens J, Thomsen PF, Bohmann K, Cappellini E, Schnell IB, Wales NA, Carøe C, Campos PF, Schmidt AM, Gilbert MT, Hansen AJ, Orlando L, Willerslev E. Ancient and modern environmental DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015 Jan 19;370(1660):20130383. doi: 10.1098/rstb.2013.0383. PMID: 25487334; PMCID: PMC4275890.
- R. giguère-tremblay ; *Diversité microbienne et multifonctionnalité des écosystèmes forestiers boréaux du québec* (2020)
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA*
URL <http://www.rstudio.com/>.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463. PMID: 271968; PMCID: PMC431765.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W; Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 17;109(16):6241-6. doi: 10.1073/pnas.1117018109. Epub 2012 Mar 27. PMID: 22454494; PMCID: PMC3341068.

- Schuenemann VJ, Peltzer A, Welte B, van Pelt WP, Molak M, Wang CC, Furtwängler A, Urban C, Reiter E, Nieselt K, Teßmann B, Francken M, Harvati K, Haak W, Schiffels S, Krause J. Ancient Egyptian mummy genomes suggest an increase of Sub-Saharan African ancestry in post-Roman periods. *Nat Commun.* 2017 May 30; 8:15694. doi: 10.1038/ncomms15694. PMID: 28556824; PMCID: PMC5459999.
- Sébastien Terrat, Battle Karimi, Samuel Dequiedt, Nicolas Chemidlin Prévost-Bouré, Walid Horrigue, et al. La caractérisation des communautés microbiennes du sol à l'échelle de la France pour évaluer l'effet de l'usage des sols. *Innovations Agronomiques*, 2018, 69, pp.27-37. 10.15454/IO3VXY. hal 02002766
- Smith CI, Chamberlain AT, Riley MS, Stringer C, Collins MJ. The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *J Hum Evol.* 2003 Sep;45(3):203-17. doi: 10.1016/s0047-2484(03)00106-4. PMID: 14580590.
- Svenja Heesch, Marie Pažoutová, Mónica B.J. Moniz & Fabio Rindi (2016) Prasiolales (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) of the Svalbard Archipelago: diversity, biogeography and description of the new genera Prasionella and Prasionema, *European Journal of Phycology*, 51:2, 171-187
- Tan W, Wang J, Bai W, Qi J, Chen W. Soil bacterial diversity correlates with precipitation and soil pH in long-term maize cropping systems. *Sci Rep.* 2020 Apr 7;10(1):6012. doi: 10.1038/s41598-020-62919-7. PMID: 32265458; PMCID: PMC7138807.
- Tekle YI, Wang F, Wood FC, Anderson OR, Smirnov A. New insights on the evolutionary relationships between the major lineages of Amoebozoa. *Sci Rep.* 2022 Jul 1;12(1):11173. doi: 10.1038/s41598-022-15372-7. PMID: 35778543; PMCID: PMC9249873.
- Théis ZT Jensen et al ; *Un génome humain et un microbiome oral vieux de 5700 ans à partir de poix de bouleau mâché* ; (2019).
- Thibaut Varin ; *Métagénomique des tapis microbiens polaires* ; (2013)
- Varga T, Krizsán K, Földi C, Dima B, Sánchez-García M, Sánchez-Ramírez S, Szöllősi GJ, Szarkándi JG, Papp V, Albert L, Andreopoulos W, Angelini C, Antonín V, Barry KW, Bougher NL, Buchanan P, Buyck B, Bense V, Catcheside P, Chovatia M, Cooper J, Dämon W, Desjardin D, Finy P, Geml J, Haridas S, Hughes K, Justo A, Karasiński D, Kautmanova I, Kiss B, Kocsubé S, Kotiranta H, LaButti KM, Lechner BE, Liimatainen K, Lipzen A, Lukács Z, Mihaltcheva S, Morgado LN, Niskanen T, Noordeloos ME, Ohm RA, Ortiz-Santana B, Ovrebo C, Rácz N, Riley R, Savchenko A, Shiryaev A, Soop K, Spirin V, Szebenyi C, Tomšovský M, Tulloss RE, Uehling J, Grigoriev IV, Vágvölgyi C, Papp T, Martin FM, Miettinen O, Hibbett DS, Nagy LG. Megaphylogeny resolves global patterns of mushroom evolution. *Nat Ecol Evol.* 2019 Apr;3(4):668-678. doi: 10.1038/s41559-019-0834-1. Epub 2019 Mar 18. PMID: 30886374; PMCID: PMC6443077.
- Vďačný P, Breiner HW, Yashchenko V, Dunthorn M, Stoeck T, Foissner W. The chaos prevails: molecular phylogeny of the Haptoria (Ciliophora, Litostomatea). *Protist.* 2014 Jan;165(1):93-111. doi: 10.1016/j.protis.2013.11.001. Epub 2013 Dec 1. PMID: 24524973.
- Vigneron A, Cruaud P, Culley AI, Couture RM, Lovejoy C, Vincent WF. Genomic evidence for sulfur intermediates as new biogeochemical hubs in a model aquatic microbial ecosystem.

- Microbiome. 2021 Feb 16;9(1):46. doi: 10.1186/s40168-021-00999-x. PMID: 33593438; PMCID: PMC7887784.
- Wang JJ, Chen Q, Li YZ. *Chryseolinea flava* sp. nov., a new species of *Chryseolinea* isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018 Nov;68(11):3518-3522. doi: 10.1099/ijsem.0.003022. Epub 2018 Sep 17. PMID: 30222097.
- Waschulin V, Borsetto C, James R, Newsham KK, Donadio S, Corre C, Wellington E. Biosynthetic potential of uncultured Antarctic soil bacteria revealed through long-read metagenomic sequencing. *ISME J*. 2022 Jan;16(1):101-111. doi: 10.1038/s41396-021-01052-3. Epub 2021 Jul 12. PMID: 34253854; PMCID: PMC8692599.
- White, T.J. & Bruns, Tom & Lee, Steven & Taylor, John. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. (1989). 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.
- Wietz M, Bienhold C, Metfies K, Torres-Valdés S, von Appen WJ, Salter I, Boetius A. The polar night shift: seasonal dynamics and drivers of Arctic Ocean microbiomes revealed by autonomous sampling. *ISME Commun*. 2021 Dec 11;1(1):76. doi: 10.1038/s43705-021-00074-4. PMID: 37938651; PMCID: PMC9723606.
- Wisconsin geological and Natural History Survey - University of Wisconsin - Ice Age geology*" (2017).
- Xiaoxu Sun, Benru Song, Rui Xu, Miaomiao Zhang, Pin Gao, Hanzhi Lin, Weimin Sun, Root-associated (rhizosphere and endosphere) microbiomes of the *Miscanthus sinensis* and their response to the heavy metal contamination, *Journal of Environmental Sciences*, Volume 104, 2021, Pages 387-398, ISSN 1001-0742
- Y. Mesentsev, N. Bondarenko, E. Nassonova, A. Smirnov, *Vannella primoblina* n. sp. – an unusual species of the genus *Vannella* (Amoebozoa, Discosea, Vannellida) with pronounced dorsal ridges and folds, *European Journal of Protistology*, Volume 77, 2021, 125757, ISSN 0932-4739
- Yee B, Oertli GE, Fuerst JA, Staley JT. Reclassification of the polyphyletic genus *Prosthecomicrobium* to form two novel genera, *Vasilyevaea* gen. nov. and *Bauldia* gen. nov. with four new combinations: *Vasilyevaea enhydra* comb. nov., *Vasilyevaea mishustinii* comb. nov., *Bauldia consociata* comb. nov. and *Bauldia litoralis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010 Dec;60(Pt 12):2960-2966. doi: 10.1099/ijms.0.018234-0. Epub 2010 Jan 29. PMID: 20118292; PMCID: PMC3052453.
- Yingyi Fu, Yu Luo, Caixian Tang, Yong Li, Georg Guggenberger, Jianming Xu, Succession of the soil bacterial community as resource utilization shifts from plant residues to rhizodeposits, *Soil Biology and Biochemistry*, Volume 173, 2022, 108785, ISSN 0038-0717
- Yingying Zhou, Yuan Celine Zhang, Xueli Hu, Yuanhang Zhou, Yun Bai, Ping Xiang, Zhi Zhang, Overlooked role in bacterial assembly of different-sized granules in same sequencing batch reactor: Insights into bacterial niche of nutrient removal, *Bioresource Technology*, Volume 391, Part B, 2024, 129992, ISSN 0960-8524
- Yu-Hong Huang, Yu-Jie Yang, Jie-Yu Li, Huixiong Lü, Hai-Ming Zhao, Lei Xiang, Hui Li, Ce-Hui Mo, Yan-Wen Li, Quan-Ying Cai, Qing X. Li, Root-associated bacteria strengthen their community stability

against disturbance of antibiotics on structure and functions, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 465, 2024, 133317, ISSN 0304-3894

Ze-Ying Zhao, Peng-Yang Wang, Xiao-Bin Xiong, Rui Zhou, Feng-Min Li, Zheng-Guo Cheng, Wei Wang, Fei Mo, Kiprotich Wesly Cheruiyot, Wen-Ying Wang, Aimee Grace Uzamurera, Hong-Yan Tao, You-Cai Xiong, Plant biomass mediates the decomposition of polythene film-sourced pollutants in soil through plastisphere bacteria island effect, *Environment International*, Volume 178, 2023, 108114, ISSN 0160-4120