



Du nouveau pour l'ADN ancien

Ludovic Orlando
Catherine Hänni

Société Française de Génétique

Président

Jean Généromont, Université Paris-XI,
Orsay

Secrétaire général

Michel Werner, CEA Saclay,
Gif-sur-Yvette

Trésorière

Cécile Fairhead, Institut Pasteur, Paris

Vice-présidents

Roland Berger, Institut de génétique
moléculaire, Paris

Alain Bernheim, Institut Gustave-
Roussy, Villejuif

Claude Chevalet, Inra, Centre
de recherches de Toulouse

Serge Potier, Université Louis-Pasteur,
Strasbourg

Hervé Thielllement, Inra, DGAP,
Versailles

Autres membres du bureau

Anne Cambon-Thomsen, Cnrs
Toulouse

Lionel Larue, Institut Curie, Orsay

Marc Lipinski, Institut Gustave-
Roussy, Villejuif

Louise Telvi, Hôpital Saint-Vincent-
de-Paul, Paris

*Prière d'adresser toute correspondance au
Secrétariat général de la SFG, Michel
Werner, Service de biochimie et de géné-
tique moléculaire, CEA Saclay, bâtiment
142, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France.*

Comité de rédaction

A. Bernheim

M. Bolotin-Fukuhara

M. Fellous

J. Généromont

M.C. Hors-Cayla

R. Motta

A. Nicolas

M. Solignac

S. Sommer

P. Thuriaux

D. de Vienne

Secrétaire

M.L. Prunier

C'est au cours du XIX^e siècle qu'est né le concept d'évolution. Dès lors, le nombre vertigineux d'espèces vivantes et disparues ne s'envisagea plus comme étant hérité *ex nihilo*, mais comme un processus généalogique permanent. Les classifications quittèrent les catégories encyclopédiques statiques du Siècle des Lumières pour adopter un mode buissonnant, plus conforme aux voies empruntées par le vivant. Au cours du XX^e siècle, la démarche analytique des biologistes moléculaires est venue s'ajouter à l'approche comparative des néontologistes et des paléontologistes. En effet, de même que l'on peut rapprocher deux lignées phylogénétiques sur la base du partage de critères morpho-anatomiques, la similitude de leurs séquences d'ADN est un autre élément de comparaison. Par ce raisonnement, les phylogénéticiens moléculaires ont pu comparer des espèces actuelles très distantes sur un même arbre évolutif, et déduire les changements moléculaires probables survenus au cours de l'évolution, et ayant conduit aux séquences existantes actuelles. Cependant, l'approche de l'histoire moléculaire fondée uniquement sur des séquences actuelles n'a pas permis de lever tous les doutes concernant la réalité des séquences ancestrales ainsi reconstruites, ni de préciser la position phylogénétique des espèces aujourd'hui disparues. Il était donc nécessaire d'obtenir des séquences authentiques d'espèces ou de populations du passé.

Avec l'introduction des techniques de clonage moléculaire par transformation bactérienne, les premiers

ADN fossiles ont pu être isolés. Le premier succès concerna l'ADN ancien (ADNa) d'un animal taxidermisé appartenant à une espèce éteinte d'équidé (le quagga [1]), et fut suivi de peu par le clonage de la première séquence humaine ancienne issue d'un tissu de momie égyptienne [2]. La preuve était faite que l'ADN pouvait résister aux ravages du temps ; les phylogénéticiens moléculaires allaient donc pouvoir confronter leurs résultats théoriques à de véritables données historiques. Cependant, les techniques de clonage, qui nécessitent un matériel de départ de très bonne qualité, se sont révélées le plus souvent limitantes, principalement en raison de l'état des molécules d'ADN isolées à partir de fossiles. Mais, dans le même temps, la technique d'amplification de l'ADN par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) était mise au point [3]. Cette technique permet d'amplifier rapidement *in vitro* des fragments d'ADN et d'en obtenir plusieurs millions de copies. L'enthousiasme naissant pour les séquences du passé trouva alors son outil de prédilection, et les études de paléogénétique purent se multiplier (*m/s 1989, n° 8, p. 607*).

Les paléogénéticiens se sont depuis attachés à définir les positions phylogénétiques d'espèces aujourd'hui disparues, comme le tigre à dents de sabre ou le quagga [1, 4], ainsi que celles de diverses espèces du dernier épisode glaciaire, telles que le mammoth ou l'ours des cavernes [5]. En outre, l'ADN retrouvé dans une momie égyptienne a montré qu'il était possible d'étudier des séquences

humaines du passé [2] et a ouvert la voie pour résoudre certaines questions concernant l'évolution récente de l'humanité. Ainsi, il était possible d'aborder l'origine du *pool* génétique de l'homme moderne [6-8], de retracer les voies empruntées lors des vastes migrations humaines préhistoriques [9, 10], d'évaluer les conditions d'hygiène des populations du passé et de suivre l'émergence de nouvelles pathologies ou la survenue des grandes épidémies [11], d'évaluer l'impact de la domestication néolithique sur la variabilité génétique de certaines espèces animales [12] et végétales [13]. Dans cet article, nous nous attacherons à décrire comment certaines de ces promesses ont pu être concrétisées, alors que d'autres n'ont pas encore trouvé de réponse. Enfin, nous discuterons quelles questions pourraient participer de l'avenir de la discipline.

Les fondements de la paléogénétique

• *Le temps de l'insouciance*

Au milieu des années quatre-vingts, deux équipes rapportèrent indépendamment l'extraction de séquences d'ADNa par clonage à partir de restes fossiles [1, 2]. Chacune d'elles avait utilisé des tissus mous en bon état de conservation, soit à la suite de la taxidermisation d'un spécimen de musée¹, soit grâce aux pratiques funéraires d'embaumement, pour une momie² [14]. Bien qu'elles aient établi pour la première fois que de l'ADN vieux de plusieurs siècles pouvait être préservé, ces études pouvaient toutefois apparaître comme accessoires puisque rares sont les fossiles qui connaissent natu-

rellement des conditions aussi favorables de préservation, si l'on excepte les organismes pris dans les glaciers ou les permafrosts³ [15, 16], les tourbières [10] ou encore ceux qui sont desséchés sous climat aride [2]. Afin de dépasser l'anecdote, la paléogénétique se devait de pouvoir extraire des informations à partir des vestiges les plus largement représentés dans les gisements archéologiques, c'est-à-dire les tissus calcifiés [17, 18]. Grâce à l'avènement de la technique d'amplification par PCR, cela a enfin été rendu possible. Dès lors, l'étude de l'ADN provenant de fossiles aussi divers que des dents [11, 17], des ossements [5, 19] ou des coprolites [20] est devenue envisageable.

Les études de paléogénétique se sont d'abord limitées à des périodes récentes, allant de quelques centaines [1, 18, 21] à quelques dizaines de milliers d'années [5, 8, 16]. Cependant, la découverte que des peptides pouvaient être conservés au-delà de plusieurs centaines de milliers d'années [22] lançait l'espoir d'étendre l'extraction et l'analyse des segments d'ADN à des périodes très lointaines. La publication d'une séquence végétale vieille de dix-sept millions d'années, amplifiée à partir de feuilles de *Magnolia* sédimentées en milieu lacustre anoxique [23], a enclenché la course à la recherche de séquences plus vieilles encore. Les limites ayant reculé jusqu'à quelques dizaines de millions d'années (insectes préservés dans l'ambre (*m/s* 1993, n° 11, p. 1267) – os de dinosaure [24]), on passa aussitôt à des charançons préservés dans l'ambre, vieux de plus de cent millions d'années (*m/s* 1993, n° 8-9, p. 985). Rien ne semblait donc retenir cette irrésistible progression jusqu'à ce que l'on procède à un examen plus attentif des séquences amplifiées. Ainsi, la plus vieille séquence décrite n'allait pas survivre un an de plus à sa publication ; on avait pris la séquence d'un champignon tout à fait actuel pour celle d'un charançon vieux de plus de cent millions d'années [25, 26] ! L'histoire allait se répéter avec la séquence de dinosaure, cette fois reconnue comme un

contaminant... humain, manifestement un fragment d'ADNmt inséré dans le génome nucléaire. La technique très sensible d'amplification par PCR qui avait, pensait-on, permis d'amplifier les infimes vestiges d'ADN contenus dans ces fossiles vieux de plusieurs millions d'années était en fait tout aussi sensible pour amplifier des traces d'ADN moderne, qui constituent une matrice bien meilleure. Il fallut donc se rendre à l'évidence : l'ADN n'est pas éternel dans les fossiles. Sur la base théorique de la demi-vie de molécules d'ADN en solution aqueuse, on estime que seules des conditions exceptionnelles permettent de préserver une information génétique au-delà de 50 000 à 100 000 ans [27].

• *Le temps de la raison*

L'ADN étant soumis à divers processus de dégradation, sa durée de vie est limitée et bien peu parvient à subsister dans les fossiles : les techniques de PCR semi-quantitative mettent toujours en évidence un déficit d'ADN de trois à six ordres de grandeur lorsque des extraits de fossiles sont comparés à des échantillons modernes [28, 29]. Ainsi, dans les tissus d'Ötzi (*m/s* 1994, n° 12, p. 1335), la momie de cinq mille ans retrouvée dans un glacier alpin, seul l'équivalent de dix à vingt génomes nucléaires par gramme de tissu a subsisté [15]. C'est la raison pour laquelle on préfère étudier des marqueurs moléculaires présents en grand nombre d'exemplaires ; l'ADNmt, présent jusqu'à plusieurs milliers de copies par cellule, constitue ainsi l'un des marqueurs privilégiés des paléogénéticiens.

Les phénomènes responsables de la dégradation de l'ADN sont de nature variée. Lorsqu'on observe l'ADN extrait de fossiles en microscopie électronique, il apparaît le plus souvent sous forme double brin, comme un substrat d'ADN natif, mais excessivement fragmenté. Ces fragments ont une taille généralement comprise entre 100 et 200 pb, et rarissimes sont les molécules qui atteignent la taille de 1,5 kpb [28]. Cette fragmentation de l'ADN *post-mortem*

1. Un quagga.

2. Égyptienne d'environ 2500 ans

3. Permafrost ou permagel : sol minéral brut des régions froides, gelé en permanence à une certaine profondeur.

s'explique par des réactions d'autolyse. Après la mort, la rupture des membranes cellulaires conduit à la libération des enzymes lysosomiques ; parmi elles, les nucléases, membres de la grande famille des hydrolases, clivent les liaisons phosphodiester (endonucléases). Des exonucléases réduisent ensuite la taille des fragments d'ADN. Ce phénomène de dégradation est accentué par l'action de la putréfaction induite par les micro-organismes saprophytes [30] ; tant que les tissus ne sont pas déshydratés, l'hydrolyse se poursuit. Un milieu sec limite donc le phénomène de fragmentation tandis qu'un milieu humide sera au contraire hautement permissif pour les réactions d'hydrolyse. Ainsi, on comprend pourquoi Svante Pääbo a pu réussir à cloner un fragment d'ADN long de 2,4 kpb à partir de tissus de momie égyptienne : la dessiccation y avait été accélérée par les pratiques d'embaumement (alun ferrique, [14]) et le climat chaud et sec de l'Égypte [2]. Les réactions d'hydrolyse ne se limitent pas aux liaisons phosphodiester de l'ADN ; elles attaquent également les liaisons N-glycosidiques, conduisant à la perte de bases. Les sites abasiques ainsi formés affaiblissent l'hélice d'ADN et potentialisent sa fragmentation [31]. Non seulement les réactions d'hydrolyse raccourcissent les fragments d'information génétique, mais encore elles effacent une partie du message. Enfin, par l'intermédiaire d'autres réactions, le contenu du message génétique peut être déformé. En effet, le profil chromatographique d'un substrat ancien, obtenu par HPLC après hydrolyse acide, contraste fortement avec celui d'un ADN fraîchement préparé (*figure 1* et [28]). Alors que les bases puriques sont retrouvées en quantité équivalente pour les deux types de substrats analysés, un déficit marqué en pyrimidines s'observe dans l'ADN ancien, parallèlement à l'émergence de nouveaux pics d'éluion. Les pyrimidines sont donc préférentiellement dégradées dans l'ADN et transformées en de nouvelles bases chimiquement modifiées (formamido-pyrimidines par exemple). On esti-

me qu'au moins une base pyrimidique sur dix est ainsi oxydée [10, 28]. Les réactions d'oxydation des purines conduisent quant à elles à l'apparition de 8-hydroxy guanine [32]. Enfin, sous l'action d'irradiations, des photoproduits ainsi que des bases modifiées, comme la 5-hydroxy 5-méthyl hydantoïne, vont se former.

En fonction de la prévalence d'un ou de plusieurs de ces facteurs physiques de dégradation, un fossile sera affecté par un spectre particulier de lésions [22, 32]. La taphonomie est la science qui étudie les modalités de dégradation des tissus *post-mortem* au cours de la diagenèse. Il est certain qu'irradiation, température, humidité, pH, présence d'agents oxydants sont parmi les facteurs qui influencent de manière prépondérante l'état de préservation des molécules d'ADN au sein des fossiles. L'importance de ces modifications est telle que vraisemblablement plus de 99 % des molécules extraites des spécimens de musée ou des fouilles archéologiques seraient affectées [28].

Les publications de séquences sensées provenir de restes extrêmement anciens comme les insectes de l'ambre et les dinosaures ont été parmi les plus spectaculaires. Cet épisode a discrédité pendant un temps les résultats de la paléogénétique (« *dinosaur DNA debacle* » [33]), mais il a aussi attiré l'attention sur le problème majeur de la paléogénétique, la contamination. L'ADN des fossiles étant rare, fragmenté et fortement dégradé, tout apport d'ADN moderne exogène, même en quantité infime, est susceptible d'entrer en compétition avec les quelques rares molécules préservées d'ADN endogène [31]. Dans certains cas, on peut contourner le problème en ayant recours à des amorces spécifiques qui minimisent les risques. Cependant, dans le cas de l'étude de restes humains, il n'est point de recours possible à des amorces spécifiques pour s'affranchir de la source principale de contamination représentée par l'ADN des manipulateurs, depuis les fouilles archéologiques jusqu'au laboratoire [29]. En conséquence,

une paléoséquence n'est actuellement considérée authentique que lorsqu'un certain nombre de critères sont satisfaits (*Tableau 1*). Certains d'entre eux ne sont que des précautions d'expérimentation. La marche à suivre impose par exemple de travailler dans des salles isolées et spécialement réservées aux manipulations d'ADN, soumises en permanence à une irradiation ultraviolette et à une surpression, afin de limiter la contamination extérieure par de l'ADN moderne. Dans le cas de restes humains, les séquences de toute personne ayant été une fois au contact de l'échantillon doivent être déterminées afin de pouvoir retracer toute source éventuelle de contamination [34]. A l'évidence, d'autres critères plus classiques doivent être respectés, comme notamment le recours à des témoins négatifs d'extraction et d'amplification. Ces critères étant remplis, il en demeure un, essentiel : les résultats obtenus doivent être reproduits dans des laboratoires indépendants. Ce dernier critère n'avait d'ailleurs pas été satisfait dans le cas des prétendues séquences de plusieurs millions d'années [24, 25, 31].

Par ailleurs, une analyse chimique des échantillons fossiles peut permettre de fournir une estimation de l'état de préservation des molécules d'ADN et donc de confirmer ou non la possibilité d'en amplifier des fragments [27]. L'une de ces méthodes repose sur la constatation que la nature a horreur de la symétrie. Ainsi, parmi tous les énantiomères possibles des acides aminés, seules les formes L sont utilisées dans les réactions de biosynthèse protéique. La racémisation des acides aminés décrit la réaction transformant une solution mère composée d'un énantiomère unique en une solution finale composée d'un équilibre entre les deux énantiomères L et D. Cette réaction a lieu au cours de la vie d'un organisme, mais le renouvellement protéique masque en permanence la formation des énantiomères de forme D. Dans un fossile, la cinétique de la réaction de racémisation est fonction à la fois du temps et de paramètres environnementaux, comme la tempé-

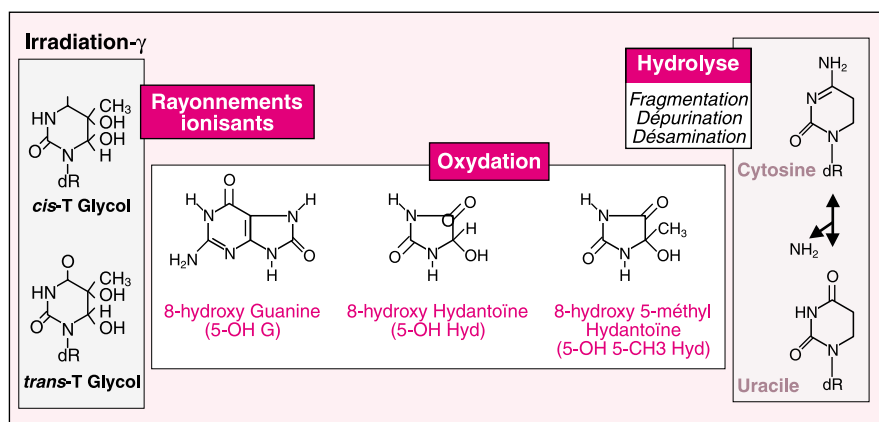


Figure 1. L'ADN des fossiles, une molécule dégradée et chimiquement modifiée. La dégradation des molécules d'ADN débute dès la mort d'un individu et conduit, via l'action de nucléases endogènes et le recrutement d'une communauté de décomposeurs, à la fragmentation du matériel génétique. Ensuite, différents facteurs physico-chimiques, tels l'hydrolyse, les conditions oxydantes, les irradiations ionisantes, poursuivent la dégradation en modifiant la nature chimique des bases nucléiques. Les molécules d'ADN ainsi modifiées sont plus sensibles à une fragmentation. Finalement, la taille des molécules d'ADN sera réduite, et le message génétique altéré sur les fragments restants.

rature et l'humidité, ces mêmes critères qui conditionnent l'état de conservation des molécules d'ADN ancien. On a donc utilisé le taux de racémisation des acides aminés à des fins prédictives pour en déduire

l'état de préservation de l'ADN dans un fossile. En particulier, l'étendue des réactions de racémisation de l'acide aspartique, de l'alanine, et de la leucine semble constituer de bons critères prédictifs de la présence

d'ADN endogène au sein d'un fossile [35]. Les chercheurs ont ainsi remarqué que les fossiles dont le taux D/L est inférieur à 0,08-0,1 pour l'acide aspartique conduisent le plus fréquemment à des résultats positifs d'amplification. D'autre part, l'acide aspartique est l'acide aminé dont la cinétique de racémisation est la plus rapide ; il doit donc être, au sein du fossile, l'acide aminé avec le plus fort rapport D/L. En conséquence, un rapport D/L de l'acide aspartique plus faible que ceux d'autres acides aminés (alanine et leucine) indique qu'il en est entré dans l'échantillon à la suite de contaminations exogènes [35]. Cette méthode permet donc de prédire la présence d'ADN endogène au fossile et, surtout d'en estimer le degré de contamination. Cette technique, qui ne requiert que 10 à 500 mg d'échantillon constitue donc un critère supplémentaire d'authenticité [6, 24, 36]. Elle a d'ailleurs précipité la débâcle des prétendues séquences de dinosaure et d'insectes préservés dans l'ambre [31].

Bien que la PCR ait permis de débloquent l'accès au patrimoine génétique des espèces éteintes [5] et des popu-

Tableau I

SÉLECTION, MANIPULATION ET AUTHENTIFICATION DES SÉQUENCES DU PASSÉ

Sélection des échantillons fossiles

- Précautions lors des fouilles archéologiques pour minimiser toute contamination moderne des échantillons
- Vestiges d'âge raisonnable (*i.e.* inférieur à 50-100 000 ans)
- Conditions favorables à la préservation (température basse, milieu peu oxydant...)
- Diagnostic de conservation de l'ADN (racémisation des acides aminés, isotopes...)

Manipulation des échantillons fossiles

- Abrasion de la surface externe de l'échantillon
- Extraction dans une salle spécialement dévolue, traitée à l'eau de Javel, irradiée en permanence sous UV (dégradation des acides nucléiques), et soumise à une surpression (limitation des apports exogènes)
- Stérilisation des tampons par autoclavage et filtration
- Témoins négatifs d'extraction et d'amplification ; interdiction des témoins positifs d'amplification
- Alternance d'échantillons d'espèces différentes pour détecter toute contamination croisée

Authentification des paléoséquences

- Reproductibilité du résultat
- Position phylogénétique (détection des contaminants interspécifiques)
- Distribution des erreurs d'élongation de la *Taq* polymérase évaluées par clonage

lations du passé [34, 37], elle se révèle parfois limitante. La présence d'inhibiteurs de la *Taq* polymérase, coextraits avec l'ADNa, peut conduire à l'absence d'amplification. Ces inhibiteurs peuvent agir en *trans* puisque la simple dilution des produits d'extraction suffit généralement à abolir leur effet [19], et que certains protocoles d'extraction réduisent leur copurification [38]. La possibilité de contourner l'effet de l'inhibition en *trans* [18] fait que l'on connaît relativement peu de choses sur la nature de ces inhibiteurs. Certains seraient dérivés des constituants même des tissus de l'organisme fossile, tels les produits de Maillard (issus de la formation de liens entre des protéines, qui deviennent brunes et

fluorescentes), les résidus porphyriques, le collagène de type I, alors que d'autres seraient dérivés de composants du sol (acides humiques, fulviques, tannins) [39]. Certains tissus, naturellement confinés, ne recèlent aucun inhibiteur en *trans* d'origine exogène (*m/s* 1999, n° 15, p. 107). L'ADN de la pulpe dentaire semble ainsi préservé de certains inhibiteurs d'amplification que l'on trouve dans d'autres fossiles [19]. Si de simples dilutions peuvent permettre de contourner l'effet *trans*-inhibiteur des extraits d'ADN fossile, elles ne permettent pas de contrer les effets inhibiteurs en *cis*. Les matrices d'ADN ancien sont hautement dégradées et chimiquement altérées [28, 32] et l'existence de *nicks* sur les frag-

ments à amplifier ainsi que l'encombrement stérique lié à la présence de bases chimiques atypiques (dimères de pyrimidines par exemple) bloque l'élongation par la *Taq* polymérase [14]. Certains milieux de sédimentation limitent cet effet *cis*-inhibiteur, en favorisant la préservation de l'ADN fossile [32].

La dégradation et les modifications chimiques de l'ADNa sont responsables d'une seconde limitation de l'efficacité de la PCR. Lorsque le substrat de départ est dégradé, il arrive que le fragment amplifié soit d'une taille plus grande que celle attendue [40]. Il s'agit, si on peut éliminer l'hypothèse de contaminations aspécifiques, d'amplicons chimériques produits lors des premiers cycles d'amplification (*figure 2* et [13, 28]) au cours desquels l'information présente à différents locus génétiques peut être recombinée de manière aléatoire. De tels résultats ne sont pas interprétables et ont conduit, lors des premières expérimentations, à des conclusions erronées. Par exemple, la majorité des séquences reportées pour les termites de l'ambre de Saint-Domingue (30 MA) ont été reconnues comme étant des molécules chimères provenant de plusieurs espèces, incluant des champignons et la drosophile [25].

La nature dégradée et chimiquement modifiée des substrats d'ADNa est responsable de mésappariements qui constituent à un troisième type d'artefact de PCR. La *Taq* polymérase ne possédant aucun système de correction des erreurs d'élongation (*DNA proofreading*), tout mésappariement est conservé au cours de l'amplification. De telles erreurs sont généralement négligées lors d'amplification de substrats modernes et intégrées puisque moins d'un appariement sur neuf mille est incorrect [14]. En revanche, le taux d'erreur de la *Taq* polymérase est significativement plus élevé avec les substrats anciens. Par exemple, parmi les principales lésions formées à la suite de l'exposition à des conditions oxydantes, la 8oxoG s'apparie préférentiellement à la base A plutôt qu'à la base C [27]. Lors de chaque cycle d'élongation, la *Taq* polymérase est

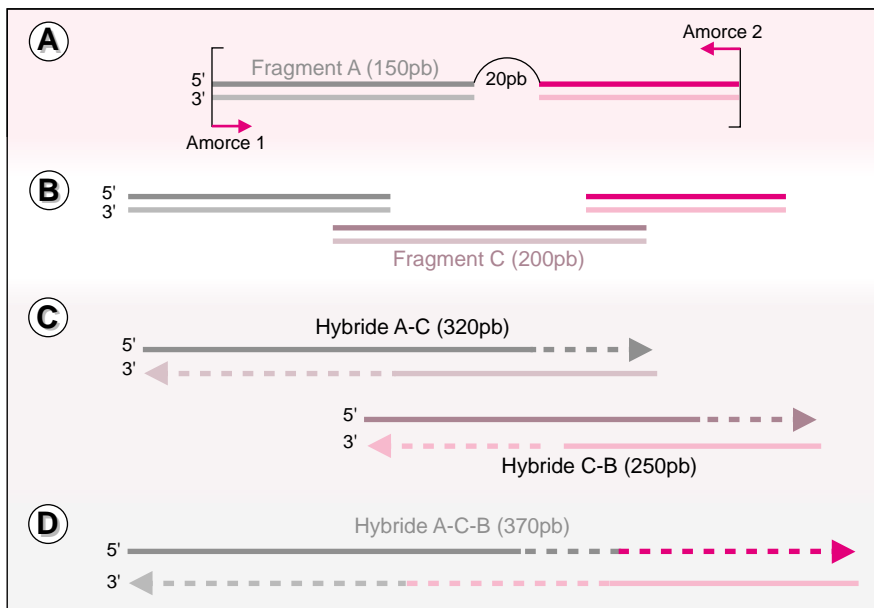


Figure 2. **La « jumping-PCR », un artefact d'amplification.** Dans cet exemple, l'expérimentateur attend un amplicon de 250 pb, en utilisant un couple d'amorces spécifiques. Or, dans l'extrait d'ADN fossile, la matrice attendue n'est pas présente. En revanche, des segments de 150 pb en 5' sont présents (fragment A), ainsi que des segments de 80 pb en 3' (fragment B). Les amorces ne peuvent s'y hybrider et conduire à l'amplification attendue puisqu'il manque 20 pb intermédiaires. Cependant, il existe dans l'ADN extrait un troisième fragment génétique de taille 200 pb (fragment C) dont l'extrémité 5' peut s'apparier avec l'extrémité 3' du fragment A et dont l'extrémité 3' peut s'apparier avec le fragment B. Un premier cycle de PCR peut conduire à l'amplification d'une molécule chimère A-C d'une part, et B-C d'autre part. Les molécules chimères peuvent s'apparier dans leur région C, et servir d'amorces à l'amplification des molécules chimères A-C-B dans les prochains cycles d'amplification. La taille du produit amplifié dépasse les 250 pb attendues, et combine l'information de différents locus génétiques de manière aléatoire.

donc susceptible d'engendrer des transversions C → A, brouillant considérablement l'information présente dans la séquence primaire du fragment ancien. Les études de paléogénétique portant nécessairement sur des séquences courtes (100 à 200 pb), on comprend à quel point ces artefacts peuvent fausser le peu d'information recueillie. Plusieurs stratégies ont été développées pour contourner ces problèmes et authentifier les mutations observées. La première consiste à comparer les sites variables sur l'ADNa à ceux d'autres espèces. Si une différence est observée au niveau d'un site très conservé, il est peu vraisemblable que la mutation amplifiée possède une réalité biologique. Ce raisonnement simple a permis de repérer que les deux mutations observées entre des segments de la cytochrome oxydase du quagga et de celle du zèbre des plaines étaient des artefacts, puisque chez les Vertébrés, les codons « mutés » trouvés chez le quagga demeuraient invariants du xénope à l'homme [4]. Ces mutations fausses sont donc vraisemblablement apparues *post-mortem* en raison des modifications chimiques de l'ADN. Cependant, tous les marqueurs génétiques étudiés ne permettent pas d'aligner aussi fidèlement les séquences. Une seconde méthode consiste alors à cloner systématiquement les produits d'amplification pour étudier la distribution des mutations dues aux erreurs de la *Taq* polymérase [31]. La séquence majoritaire est ensuite retenue, en postulant que les mutations liées à l'activité de la polymérase sont aléatoires et qu'il est donc peu vraisemblable qu'elles affectent systématiquement les mêmes sites [6, 7, 16].

L'histoire de la paléogénétique comporte quelques résultats très critiques qui n'ont pas manqué d'entourer cette discipline d'un scepticisme général. Il semble cependant qu'elle ait atteint l'âge de la maturité puisque l'essentiel des artefacts liés aux matériels anciens a maintenant été identifié et que les paléogénéticiens s'imposent des critères de manipulation très stricts. Ainsi, malgré toutes les difficultés techniques

pour décrypter les séquences du passé, la paléogénétique a déjà permis de résoudre un certain nombre de questions.

Les champs d'études de la paléogénétique

• Position phylogénétique d'espèces éteintes

L'histoire de l'ADN ancien a commencé avec l'extraction d'un fragment d'ADN d'une espèce éteinte depuis plus d'un siècle, le quagga [1]. En comparant les séquences de deux gènes mitochondriaux extraits à partir d'un animal taxidermisé, Higuchi *et al.* ont pu affilier les quaggas aux zèbres [4]. La paléontologie moléculaire offrait donc un outil de choix pour trancher des questions de systématique et résoudre la position phylogénétique d'espèces disparues de la surface du globe (Tableau II). Un bel exemple est celui des moas, oiseaux géants ne volant pas (ratites) qui se sont brutalement éteints en Nouvelle-Zélande avec l'arrivée des premiers migrants polynésiens, il y a mille ans environ [41]. Plus de cent soixante mille oiseaux furent exterminés en quelques décennies. Les systématiciens pensaient que les moas étaient proches des kiwis, seuls ratites vivant encore en Nouvelle-Zélande. L'analyse des séquences d'ADN 12S anciennes et actuelles de ratites a considérablement bouleversé cette vision. Les kiwis en effet sont plus proches des émeus et casoars d'Australie que des moas de Nouvelle-Zélande. Il semble donc que la Nouvelle-Zélande ait été colonisée une première fois par un ancêtre des moas, il y a vraisemblablement plus de quatre-vingts millions d'années puis, plus récemment, par l'ancêtre des kiwis actuels, venu d'Australie. Or, les territoires de l'Australie et la Nouvelle-Zélande se sont séparés voilà quatre-vingts millions d'années. Il est donc possible que les ancêtres des kiwis soient venus d'Australie en volant, et qu'ils n'aient perdu l'usage du vol qu'ultérieurement. Dans ce cas, les caractères partagés par les

moas et les kiwis, gigantisme et perte du vol, ne seraient que les résultats d'une évolution convergente liée au partage du même habitat insulaire [42]. L'évolution dans un habitat insulaire peut en effet conduire à des adaptations spectaculaires. Ainsi, le bovidé *Myotragus balaericus* a vécu pendant près de cinq millions d'années sur les îles Baléares, complètement coupé du reste du monde. Cette espèce naine, qui s'est éteinte après l'arrivée des premiers hommes sur ces terres, avait développé de nombreuses caractéristiques en relation avec son milieu; ainsi, ses dents, dont l'usure était progressive, lui permettaient de ronger les plantes les plus coriaces, et ses pattes courtes l'adaptaient à un terrain particulièrement rocheux. Ses singularités morphologiques sont telles que certains auteurs ont pensé classer cette espèce dans une sous-famille des *Caprinae*, les *Myotraginae*. Si l'amplification de 259 pb du gène codant le cytochrome *b* a confirmé son appartenance à cette famille, elle n'a pas permis de résoudre la question de sa place par rapport aux autres espèces [43]. Une meilleure résolution devrait prochainement être obtenue avec un marqueur évoluant plus rapidement, par exemple la région de contrôle de la réplication de l'ADNmt; ce marqueur a en effet déjà permis à notre équipe de déterminer la position phylogénétique de l'ours des cavernes (*Ursus spelaeus*), disparu il y a douze mille ans, comme rameau frère de l'ours brun (*U. arctos*) au sein de la famille des ursidés [5, 71].

La paléogénétique intervient également dans la protection d'espèces menacées d'extinction. Le phascolome (*Lasiorninus knefftii*), un marsupial australien, est l'une de ces espèces. Ses populations ont connu une réduction d'effectif drastique il y a cent vingt ans, consécutive à l'arrivée massive des colons européens. La population est ainsi passée très rapidement d'un territoire vaste de plusieurs milliers de km² à une aire de répartition exiguë de moins de 100 km². Pour classer ce marsupial parmi les espèces menacées d'extinction, il était nécessaire de

Tableau II
QUELQUES APPORTS DE LA PALÉOGÉNÉTIQUE À LA PALÉONTOLOGIE

Thématique	Espèce, matériel étudié	Âge	Références
• Biosystématique d'espèces éteintes	<i>Equus quagga</i> (quagga)	1 siècle	Higuchi <i>et al.</i> , 1987
	<i>Megalapteryx didinus</i> (moa)	3 000 ans	Cooper <i>et al.</i> , 1993
	<i>Smilodon darwini</i> (tigre à dents de sabre)	14 000 ans	Janczewski <i>et al.</i> , 1992
	<i>Nothrotheriops shastensis</i> (paresseux)	20 000 ans	Poinar <i>et al.</i> , 1998
	<i>Mammuthus primigenius</i> (mammouth)	> 25 000 ans	Noro <i>et al.</i> , 1998
	<i>Ursus spelaeus</i> (ours des cavernes)	35 000 ans	Hänni <i>et al.</i> , 1994
• Conservation de la biodiversité	<i>Lasiorhinus knefftii</i> (phascolome)	Année 1940	Roy <i>et al.</i> , 1994
• Évolution de la phylogéographie des espèces	<i>Ursus arctos</i> (ours brun)	14 000 à 42 000 ans	Leonard <i>et al.</i> , 2000
• Corrélation évolution morphologique/évolution moléculaire	<i>Thomomys talpoides</i> (gaufre à poches)	2 400 ans à actuel	Hadly <i>et al.</i> , 1998
• Domestication des espèces animales	<i>Bos primigenius</i> (auroch)	12 000 à 500 ans	Bailey <i>et al.</i> , 1996
	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (lapin)	11 000 ans à actuel	Hardy <i>et al.</i> , 1995
• Domestication des espèces végétales	<i>Zea mays</i>	4 700 ans à actuel	Goloubinoff <i>et al.</i> , 1993
• Identification d'espèces végétales	<i>Triticum sp.</i> (graines de blé)	Âge du fer	Allaby <i>et al.</i> , 1994

montrer qu'il avait subi une réduction importante de sa variabilité génétique. Avec l'aide des vastes collections de musée, il a été possible de démontrer qu'une réduction de 40 % à 70 % de la variabilité génétique s'était produite au cours des cent vingt dernières années, ce qui a

conduit à renforcer les mesures de protection de cette espèce [21]. Les programmes de conservation des espèces en danger prévoient parfois la réintroduction, dans des biotopes que l'espèce occupait autrefois, d'individus nés en captivité. L'aire de répartition qu'occupait une espèce

aujourd'hui quasiment éteinte est déterminée à partir des fossiles. Cependant, l'identification précise d'un fossile est parfois impossible sur les critères morphométriques classiques, et seule la paléogénétique permet de déterminer l'espèce dont il s'agit. C'est notamment le cas pour

des os retrouvés dans des dépôts pléistocènes et holocènes de l'île principale de l'archipel d'Hawaï. L'état des fossiles ne permettait pas de préciser si l'espèce était le canard de l'île de Laysan (*Anas laysan*) ou le koloa (*A. wyvilliana*). L'analyse génétique d'environ 500 pb de la région de contrôle de l'ADNmt a montré qu'il s'agissait du canard de l'île de Laysan, aujourd'hui endémique de ce site. Cette espèce couvrait donc dans le passé un territoire plus vaste, ce qui a justifié sa réintroduction dans l'archipel d'Hawaï [44].

• *Populations animales et phylogéographie*

Ainsi, l'ADN des fossiles permet de suivre l'histoire génétique des populations animales du passé, et leur répartition dans l'espace et le temps [37, 45]. Ces deux types d'information peuvent se révéler importantes dans la structuration d'un programme sérieux de protection des espèces menacées. A des échelles de temps plus grandes, le suivi de populations animales permet d'envisager comment se comportent divers marqueurs génétiques face à des bouleversements majeurs des conditions de vie. Un premier type de changement des conditions de vie, jalonnant toute l'histoire du quaternaire, est l'alternance des conditions climatiques entre des périodes de glaciation et de déglaciation. Comment évoluent les marqueurs génétiques face à ces bouleversements climatiques? Quelles répercussions ces bouleversements ont-ils sur la répartition géographique des espèces? Plusieurs équipes, dont la nôtre, recherchent les conséquences des glaciations sur la répartition des ours bruns (*Ursus arctos*). Récemment, Leonard *et al.* ont étudié la répartition des ours bruns au cours d'une période allant de -42 000 à -12 000 ans [45]. Il existe trois clades d'ours bruns (II, III, et IV), qui se distinguent par le polymorphisme de la région de contrôle de leur ADNmt, typiques des ours peuplant l'Amérique du Nord, l'Alaska et le Canada, respectivement. Ces trois clades peuplaient déjà les alentours

du détroit de Behring il y a 36 000 ans. Lors du dernier maximum glaciaire, qui dura jusqu'à -12 000 ans, seul le clade III a persisté sur le continent. En revanche, on retrouve des ours du clade II sur l'île bordière du Prince-de-Galles, située au nord de Vancouver. Après la déglaciation, les ours ont migré jusqu'à occuper leur position actuelle. Les îles bordières du nord-ouest de l'Amérique ont donc vraisemblablement constitué un refuge, où la variabilité des ours bruns a pu être conservée, puis redistribuée à l'ensemble du continent nord-américain. Sans ce refuge, tous les ours du continent nord-américain seraient actuellement du clade III. La même question se pose en Europe à propos de deux espèces d'ours, l'ours brun (*Ursus arctos*), vivant encore actuellement, et l'ours des cavernes (*U. spelaeus*), espèce éteinte depuis environ douze mille ans [5, 71]. Nous tentons d'élucider si la répartition actuelle des ours bruns ouest-européens en deux clades est héritée de certains refuges glaciaires (péninsule ibérique et péninsule balkanique) et d'estimer l'impact des glaciations sur la variabilité génétique de l'ours des cavernes. Une réduction de cette variabilité aurait alors pu réduire son potentiel adaptatif et conduire cette espèce à l'extinction.

• *Impact génétique de la domestication des espèces*

Un autre type de changement de mode de vie pour certaines espèces est celui qui découle du phénomène de néolithisation. Au cours de l'ère Néolithique, l'homme, jusqu'alors cueilleur-chasseur, devient agriculteur-éleveur. Il commence à pratiquer la culture de certaines plantes à des fins alimentaires, et à élever des animaux pour l'alimentation et le travail de la terre. Ainsi, la domestication a nécessité que l'homme sélectionne les variétés de céréales les plus propres à la consommation, ou les individus les plus robustes pour le bétail de trait. La paléogénétique peut venir à l'aide de la génétique des populations pour évaluer les effets de cette vaste expérience de

sélection génétique débutée au Néolithique, en particulier pour déceler précisément quand et où ces phénomènes se sont systématisés. Le bœuf est l'une des espèces dont l'histoire est fortement liée à celle de l'humanité. C'est à partir d'une espèce unique, l'auroch sauvage (*Bos primigenius*), que le bœuf actuel a été domestiqué au cours du Néolithique. Mais les liens de parenté entre l'auroch et les bœufs ne peuvent pas être mesurés par les généticiens des populations puisque l'auroch s'est éteint voilà plus de quatre cents ans [12]; seule l'étude de l'ADN d'aurochs fossiles permet d'apporter ici une réponse. L'auroch peuplait de vastes étendues en Asie, Europe et Afrique du Nord; l'homme a donc pu domestiquer plusieurs fois indépendamment l'auroch en des lieux distincts. Il a pu aussi, comme pour les chèvres, les moutons et certaines céréales, domestiquer l'auroch au Moyen-Orient et l'introduire ailleurs par la suite. Une analyse de séquences anciennes de la région de contrôle de l'ADNmt a montré qu'il existait des populations très diverses d'aurochs il y a douze mille ans. Vers quatre à cinq mille ans, les populations européennes ont connu une forte expansion. Il n'est pas impossible que cette expansion soit le résultat de l'arrivée d'une population d'aurochs domestiquée au Moyen-Orient, hypothèse compatible avec le fait que les aurochs d'Égypte étaient, il y a deux mille ans, du même type que celui qui s'est répandu en Europe [12]. Il reste à déterminer si c'est bien ce type d'auroch qui peuplait le Moyen-Orient il y a quatre à cinq mille ans...

L'histoire de la domestication du lapin a également été abordée par les techniques de l'ADNa [37]. Contrairement aux aurochs, les populations de lapins sauvages ont montré une grande stabilité génétique du Néolithique au Moyen Âge en France. Mais, à cette époque, une population étrangère d'un type génétique particulier les a rapidement remplacées. Il est donc probable qu'à partir du Moyen Âge, en développant les garennes, l'homme soit intervenu pour favoriser le développement de



ce type génétique précis dans nos contrées.

Parmi les espèces végétales domestiquées au néolithique figurent le blé et le maïs. Le blé a été l'une des premières plantes cultivées il y a dix mille ans par les agriculteurs néolithiques du Croissant fertile [46]. Pendant près de deux mille ans, ces premiers agriculteurs ont diversifié les espèces domestiquées, et ont sélectionné des souches suivant l'attrait de leurs caractères phénotypiques [47]. La sortie du Croissant fertile s'est effectuée après cette période de diversification génétique. Diverses variétés domestiquées sont retrouvées dans les Balkans il y a huit mille ans, d'où elles ne tardent pas à se répandre en Europe *via* le Danube, la vallée du Rhin et la mer Méditerranée [47]. Cette extension géographique a été le fruit du contact de proche en proche entre populations néolithiques. Retrouver un même cultivar de plante domestique dans des sites archéologiques différents est le signe des connexions qui reliaient ces populations dans le passé. L'équipe de T.A. Brown espère décrypter les relations entre populations néolithiques d'Europe et du Moyen-Orient par cette méthode en s'appuyant sur le blé. Ils utilisent le gène nucléaire codant pour la gluténine, un gène très polymorphe qui permet de caractériser les différents cultivars [48].

La domestication du maïs a débuté en Amérique centrale voilà sept mille ans, à partir de la téosinte sauvage, son ancêtre [13]. Une analyse d'un gène nucléaire codant l'alcool déshydrogénase 2 sur des échantillons datant de -4700 ans à nos jours a montré une étonnante conservation de la variabilité génétique chez le maïs au cours du temps [13]. Il est donc vraisemblable qu'à la suite de sa domestication le maïs ait pu se croiser avec la téosinte, perpétuant ainsi la variabilité génétique de la souche sauvage d'origine. Mais dans ce cas, quel a été le support génétique de la domestication? La domestication du maïs à partir de la téosinte n'a que très peu affecté la partie structurale des gènes, mais a été accompagnée d'une forte sélection sur certaines régions régulatrices et, en modifiant l'expression d'un

nombre limité de gènes, a conduit à former des plantes aux caractères très différents [49].

• *Origine du pool génique de l'homme moderne* (Tableau III)

La question de la parenté entre l'homme de Neandertal et les hommes modernes a déjà fait couler beaucoup d'encre. Ce chasseur robuste, de musculature imposante, a peuplé l'extrême ouest du continent asiatique et l'Europe pendant près de trois cent mille ans, avant de s'éteindre il y a environ trente mille ans [8]. Dans une partie de cette aire de répartition, l'homme de Neandertal a cohabité avec l'homme moderne pendant quelques milliers d'années. La question se pose de savoir s'il a participé à la diversité de notre *pool* génique. En 1997 et en 1999, une équipe allemande a réussi à obtenir les séquences de régions mitochondriales hypervariables du spécimen type de l'homme de Neandertal découvert en Allemagne en 1856, dans la caverne de Feldhofer, située dans la vallée de la Neander [6, 7]. L'analyse phylogénétique se révéla sans appel: la séquence obtenue de l'homme de Néandertal est exclue de toutes les séquences humaines modernes. L'ADNmt neandertalien et celui de l'homme moderne semblaient donc avoir évolué comme deux entités indépendantes [7]. Récemment, cette conclusion vient d'être confirmée par une seconde équipe, avec l'étude d'un second échantillon, plus récent et provenant d'un site caucasien (vingt-huit mille ans [8]). Il est maintenant possible d'envisager des analyses génétiques des populations néandertaliennes, et de définir leurs rapports avec les populations contemporaines d'hommes de Cro-Magnon. Cependant, il reste à établir si des gènes nucléaires néandertaliens ont été brassés avec ceux de l'homme moderne [50].

• *Vagues de migration et colonisations humaines* (Tableau III)

Couvrant près d'un quart de la surface de la planète, le Pacifique offre

une constellation d'îles à la fois distantes du continent et éloignées entre elles. Malgré cela, elles ont été colonisées très tôt et des vestiges archéologiques témoignent de l'occupation de la Papouasie-Nouvelle-Guinée il y a soixante mille ans et des îles Salomon il y a trente mille ans (Mélanésie [51]). Au centre du Pacifique, en Polynésie (îles Fidji, Tonga et Samoa), la présence humaine n'est attestée que bien plus tard, vers trois mille cinq cents ans environ. Ce peuplement, de culture Lapita, a dû naviguer sur plusieurs milliers de kilomètres pour atteindre ces îles, véhiculant avec lui des animaux domestiques. Les embarcations étaient-elles parties des côtes d'Asie ou de Mélanésie? Les linguistes avaient remarqué la forte unité des langages polynésiens; pour eux, il ne faisait donc aucun doute que la Polynésie ait été colonisée en une seule vague par un peuple dont le langage s'apparenterait aux dialectes de Taïwan et d'Indonésie [52]. Les colons en semblaient donc pas être des Mélanésiens, dont le langage n'est pas apparenté au langage polynésien. Les généticiens des populations ont découvert un haplotype spécifique des Polynésiens, caractérisé par une délétion de neuf paires de bases dans la région V de l'ADNmt. Dans les populations actuelles, cet haplotype est très fréquent chez les peuples asiatiques et il est absent des îles mélanésiennes. La génétique rejoignait donc la linguistique pour proposer que les Polynésiens descendaient d'un peuple venu récemment d'Asie, et non de Mélanésie. L'affaire semblait classée jusqu'à ce que des paléogénéticiens relancent le débat en analysant le profil génétique de l'ADNmt des plus vieux ossements polynésiens, attribués à la culture Lapita. Contre toute attente, ils ne possédaient pas la délétion de neuf paires de bases [51]. Il semble donc qu'une première vague de migration ait déferlé de la Mélanésie en Polynésie, et qu'elle ait été suivie rapidement par une vague venue d'Asie. La culture Lapita serait donc mélanésienne, et le peuplement subséquent venu d'Asie aurait favorisé

Tableau III ARCHÉOLOGIE MOLÉCULAIRE			
• Pool génique de l'homme moderne	<i>Homo neanderthalensis</i>	100 000- 30 000 ans et 28 000 ans	Krings <i>et al.</i> , 1997, 1999 Ovchinnikov <i>et al.</i> , 2000
• Vagues de colonisation humaine	Peuplement polynésien	3 500 ans	Hagelberg <i>et al.</i> , 1997
	Peuplement américain	1000 à 1350 ap. J.-C.	Parr <i>et al.</i> , 1996
• Analyse génétique de nécropoles	Sépulture d'un site précolombien (Illinois)	1300 ap. J.-C.	Stone et Stoneking, 1993
	Sépulture japonaise (Kyushu)	2 000 ans	Shinoda <i>et al.</i> , 1994
• Relations entre populations humaines	Échanges commerciaux – <i>Macaca sylvanus</i> (macaque)	2 000 ans	Bailey <i>et al.</i> , 1999
	Échanges culturels – <i>Triticum sp.</i> (blé)	2 000 à 700 ans	Brown <i>et al.</i> , 1994
• Identification des restes d'un personnage historique	Joseph Mengele	Année 1985	Jeffreys <i>et al.</i> , 1992
• Généalogie familiale	Membres de la Maison du Königsfeljd	Années 1549 à 1748	Gerstenberger <i>et al.</i> , 1999

l'expansion démographique en Polynésie [52].

Le Japon a connu une histoire semblable. Il y a deux mille ans, à la période Jomon fédérée autour de la chasse et de la cueillette a succédé la période Yayoi marquée par la culture du riz, fondement de la culture japonaise traditionnelle. La culture Yayoi est-elle apparue parmi les hommes du Jomon ou bien a-t-elle été importée par un peuple immigrant depuis le continent asiatique (Corée [34]) ? Dans une étude fondée sur la comparaison de 190 paires de bases de la région de contrôle mitochondriale, l'équipe d'Horai a mis en évidence une différence génétique entre la

population japonaise contemporaine et celle des hommes qui peuplaient le Japon voilà trois à six mille ans [53]. Certains Japonais vivant actuellement présentent néanmoins le même profil génétique que les hommes du Jomon. Il semble donc bien qu'un peuple venu du continent asiatique ait migré il y a deux mille ans au Japon, et posé les bases de la société japonaise traditionnelle. Ce peuple n'a pas pour autant supplanté les indigènes, puisque les hommes du Jomon ont encore des descendants dans la population japonaise actuelle.

L'histoire du peuplement américain a également suscité une série d'hypo-

thèses. Les Espagnols furent les premiers surpris en trouvant le Nouveau-Monde, une terre inconnue, déjà habitée. Plusieurs milliers d'années auparavant, des hommes venus d'Asie avaient franchi le détroit de Behring et découvert l'Amérique. Chez les Amérindiens natifs, le polymorphisme de restriction de la région de contrôle mitochondriale révèle quatre groupes (A à D), chacun étant apparenté à des groupes asiatiques [9]. Le problème n'est donc pas ici de savoir d'où sont venus les premiers colons américains mais plutôt si le détroit de Behring a été franchi une ou plusieurs fois. Le chiffre de trois migrations a d'abord été avancé par les linguistes qui, en

comparant les champs lexicaux et les similitudes syllabiques de plusieurs centaines de langues des Amériques, ont distingué trois groupes : l'esquimau-aléoute dans l'Arctique, le nadéné au Canada et dans le sud-ouest des États-Unis, l'amérindien partout ailleurs. Ils imaginent par conséquent trois vagues de migration, chacune ayant apporté une langue différente [54]. Sur le plan génétique, chaque vague aurait apporté son propre *pool* d'haplotypes mitochondriaux, retrouvés encore aujourd'hui dans les populations américaines natives (A à D pour les Amérindiens, A et D pour les eskimaux-aléoute et A pour les Na-déné [54]). Une analyse plus fine a permis à l'équipe de Merriwether de distinguer plusieurs sous-types parmi les haplotypes principaux A à D [55]. Curieusement, ces sous-haplotypes étaient tous déjà présents de manière uniforme sur le continent américain au cours des temps préhistoriques (5 000 av. J.-C. à 1 300 apr. J.-C.). Il est peu probable dans ce cas que trois vagues de colonisation indépendantes, dissociées dans le temps, aient apporté strictement le même fond génétique. Comment donc réconcilier ces données avec les observations de linguistique ? Certains auteurs adhèrent au modèle ternaire de colonisation, d'autres imaginent quatre vagues de migrations, une par haplotype, d'autres enfin postulent un événement unique, mais la question reste encore à ce jour très débattue.

Au cours d'une période plus récente, le peuplement des États-Unis a également connu des épisodes dramatiques avec des exterminations massives des Amérindiens menées par les conquistadores. En comparant la variabilité génétique de populations américaines actuelles à celle de populations ayant vécu il y a plus de sept cents ans, c'est-à-dire avant l'arrivée des colons espagnols, Stone et Stoneking n'ont cependant pas décelé de réduction significative de la variabilité génétique [9, 36].

Ainsi, la paléogénétique permet de suivre les migrations des hommes préhistoriques en révélant la trace des nomades qui ont fondé les populations actuelles [54]. Mais avec les

études d'ADN fossile, il est également devenu possible d'envisager les liens entre populations à l'échelle historique, notamment les échanges commerciaux qui unissaient des cités. Par exemple, l'existence de liens commerciaux entre la cité de Pompéi et le Maghreb il y a deux mille ans ne fait plus de doute [56]. En effet, un fossile de singe retrouvé à Pompéi a été caractérisé génétiquement comme un macaque (*Macaca sylvanus*), espèce peuplant les forêts tempérées du Maroc et d'Algérie. Récemment, de l'ADNa a été amplifié à partir de bois fossilisé datant de plusieurs siècles, et permettra de retracer dans les temps historiques les échanges commerciaux, par exemple en déterminant la provenance géographique des bois de fabrication des barils et des tonneaux [57].

• *Analyse génétique des nécropoles*
(Tableau III)

Par l'analyse des nécropoles et des sites funéraires (mode d'inhumation des corps, disposition d'offrandes), un anthropologue peut déduire les croyances et les pratiques religieuses des peuples du passé. L'archéologie moléculaire a permis d'investir tout un champ de questions restées à l'état d'hypothèses interprétatives par les anthropologues classiques. En analysant des marqueurs génétiques transmis suivant les lignées maternelles (ADNmt – [18, 58]), ou paternelles (*Y-typing* – [59]), il est possible de déterminer si les morts sont enterrés par famille. L'étude d'un site mortuaire vieux de deux mille ans, situé au nord de l'île japonaise de Kyushu, a révélé un regroupement familial des corps dans une partie du site ; à l'inverse, les corps ne sont pas regroupés par lignages familiaux dans une autre partie du site, et des haplotypes multiples s'y retrouvent [34]. Il est donc possible que ce site ait été scindé en un espace réservé à des concessions familiales, et un autre, correspondant à un tumulus, peut-être réservé aux seuls dignitaires. L'amplification de marqueurs microsatellites permet de pousser encore plus loin l'analyse en

proposant une généalogie complète entre les membres d'une même sépulture [59]. L'approche par les microsatellites semble pleine de promesses ; d'une part, leur taille courte se prête particulièrement à la nature fragmentée de l'ADNa et, d'autre part, la conjugaison de résultats obtenus à plusieurs locus permet des conclusions statistiquement valides. Néanmoins, là encore, l'interprétation de tels marqueurs de taille variable à partir d'un substrat dégradé devra se faire avec prudence [60].

Les anthropologues sont curieux de savoir s'il existe des traitements funéraires spécifiques aux hommes et aux femmes. Cependant, les critères morphométriques classiques (largeur des os du bassin) ne permettent pas toujours la diagnose sexuelle des individus, soit parce que les squelettes ne sont pas conservés dans leur intégralité, soit parce qu'ils ont subi des modifications (crémation par exemple), soit encore parce que les individus sont d'âge prépubère. Diverses techniques de détermination génétique du sexe ont donc été mises au point. Dans un premier temps, la présence d'un marqueur spécifique du chromosome Y (éléments répétés *DYZ1* [61]) a été recherchée. Cependant, l'absence de produit d'amplification par PCR peut résulter de l'absence du chromosome Y qui identifie une femme, mais également d'une inhibition de l'amplification liée à la qualité du matériel ancien. Cette méthode a donc été abandonnée au profit de l'utilisation du gène de l'amélogénine, présent sur la partie autosomique des gonosomes, et dont le premier intron présente une délétion sur le chromosome Y. Ainsi, chez une femme, on peut amplifier 330 pb, tandis que chez un homme un fragment additionnel de 218 pb, caractéristique du chromosome Y est co-amplifié [62]. Faerman *et al.* ont pu ainsi déterminer le sexe de dix-neuf nouveau-nés. Ces derniers ont été retrouvés dans une fosse sur le site d'un bain privé, qui fonctionnait comme un lupanar sous l'empire romain. Tous furent victimes d'infanticide un à deux jours après

leur naissance. La pratique de l'infanticide était alors courante, car si les parents désiraient souvent un garçon qui pouvait constituer un soutien pour leurs vieux jours, une fille était souvent perçue comme un fardeau puisqu'il fallait lui constituer une dot. Or, assez curieusement, l'étude a révélé le sacrifice préférentiel de jeunes garçons [63]. Il est donc probable que les tenanciers supprimaient les fils des courtisanes tandis qu'ils élevaient leurs filles qui bientôt les remplaceraient...

• *Émergence des paléopathologies microbiennes*

L'émergence de nouvelles pathologies est un problème récurrent de santé publique. En retraçant l'histoire évolutive de grandes maladies, on peut espérer comprendre les contextes qui président à l'apparition d'épidémies massives et ainsi développer des programmes de gestion rationnelle de ces phénomènes

(Tableau IV). L'enjeu est de taille lorsqu'on considère que, encore actuellement, plus de trois millions de personnes meurent chaque année de la tuberculose, principalement dans les pays en voie de développement [64]. L'histoire regorge de désastres épidémiques : lèpre, peste bubonique d'Athènes [11], tuberculose [64, 65]. Le problème majeur en paléopathologie est d'identifier les organismes pathogènes présents dans les restes fossiles, parce qu'ils ne laissent souvent aucune trace morphologique, ou parce que ces traces ne peuvent pas toujours être attribuées à un germe unique. Par exemple, si l'ornementation des œufs ou certains stades larvaires diagnostiquent parfaitement telle espèce d'helminthes, l'identification de protozoaires, tels *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas, n'est pas possible [66]. De la même manière, la tuberculose peut laisser des marques ostéologiques, connues sous le nom de cyphose ou mal de Pott, caractérisées par le tassement et la réduction

de vertèbres dorsales, mais des infections bactériennes (*Brucella*) ou fongiques (*Coccidioides immitis*) présentent ce même diagnostic osseux. Rechercher l'ADN spécifique d'organismes pathogènes dans les restes de populations passées doit permettre de déterminer quels agents sont responsables des signes cliniques observés. La présence de *Mycobacterium tuberculosis* dans le Nouveau-Monde avant l'arrivée des premiers colons espagnols a suscité de nombreuses polémiques. Tout d'abord, plusieurs équipes ont reporté l'extraction d'ADN mycobactérien dans des tissus de momies ou divers fragments osseux précolombiens [65]. Cependant, la plupart de ces études s'intéressent à un marqueur typique du genre *Mycobacterium*, mais qui ne permet pas de distinguer les différentes espèces, notamment de séparer l'agent de la tuberculose des mycobactéries du sol, ayant pu infester les fossiles [64]. La polémique est donc partie pour durer encore, et il faudra encore attendre le temps nécessaire à

Tableau IV
DÉPISTAGE DES MALADIES ANCIENNES

• Maladies génétiques	β -thalassémie	XVI ^e -XIX ^e siècles	Filon <i>et al.</i> , 1995
• Pathogènes bactériens	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Année 1940	Persing <i>et al.</i> , 1990
	<i>Yersinia pestis</i>	XVI ^e -XVIII ^e siècles	Drancourt <i>et al.</i> , 1998
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	XIV ^e -XVI ^e siècles	Taylor <i>et al.</i> , 1999
• Parasites protistes	<i>Trypanosoma cruzi</i>	2000 av. J.-C. à 1400 apr. J.-C.	Guhl <i>et al.</i> , 1999
• Pathogènes viraux	Virus <i>Influenza</i> , grippe « espagnole »	Année 1918	Taubenberger <i>et al.</i> , 1998
	HTLV-1	1500 ans	Li <i>et al.</i> , 1999



l'extraction des marqueurs spécifiques de *M. tuberculosis* à partir d'échantillons précolombiens pour connaître la part de responsabilité de Christophe Colomb. Parmi les gènes candidats, un régulateur de réponse oxydante, *OxyD*, semble tout indiqué pour ce travail puisqu'il a déjà été extrait à partir d'échantillons européens anciens et qu'il présente un polymorphisme suffisant pour discriminer entre les différentes souches de mycobactéries [64]. L'analyse de restes osseux cyphose-positifs datant du Néolithique devrait également permettre de savoir si l'agent de la tuberculose humaine a dérivé par transfert d'hôte d'un agent pathogène bovin, *M. bovis*. Ce dernier, capable d'infecter l'homme, a en effet pu se développer dans les populations néolithiques qui ont domestiqué le bétail [64].

La peste a également été l'un des grands maux de l'histoire. En travaillant sur l'identification du pathogène responsable d'une épidémie dévastatrice en Provence aux XVI^e et XVIII^e siècles, Drancourt et ses collaborateurs ont confirmé les nombreux récits historiques en incriminant *Yersinia pestis*, agent de la peste ; mais l'étude montre surtout combien la pulpe dentaire constitue un refuge favorable à la conservation *post-mortem* des agents pathogènes systémiques [11]. Ainsi, la méthode devrait être transposable aux nombreuses maladies causées par des infections systémiques.

Il est évident qu'avec la progression de la pandémie SIDA, la compréhension des événements moléculaires qui conduisent les souches virales vers la pathogénicité et les épidémies constitue une priorité pour les autorités sanitaires. La paléogénétique offre un outil prometteur pour suivre l'évolution des souches virales au cours du temps et retracer leurs passages d'une population à l'autre. Au début du siècle, le virus dit de la grippe espagnole se propagea partout dans le monde et décima, en moins de deux ans, dix fois plus de personnes que la Première Guerre mondiale ; l'épidémie fit plus de vingt millions de morts. A partir de tissus fixés et conservés dans la paraffine,

différents segments codants du génome viral ont pu être amplifiés par RT-PCR (il s'agit des fragments HG, NA, NP, MP1 et MP2). Une analyse phylogénétique a révélé la proximité de cette souche avec des virus de la grippe porcine [67]. Le virus serait donc passé du porc à l'homme, et ce transfert d'hôte s'est manifesté par une extrême virulence, ayant conduit à une épidémie mondiale. Une autre équipe vient d'isoler des fragments d'acides nucléiques du rétrovirus HTLV-1 à partir d'une momie péruvienne de mille cinq cents ans [68]. Bien qu'encore controversée et en attente d'être confirmée, l'étude montre qu'il est possible d'extraire des fragments de génomes viraux provenant d'époques reculées de l'histoire de l'humanité.

L'avenir de la paléogénétique

• ADN ancien et modèles de phylogénie moléculaire

Avec l'émergence de la paléogénétique, une multiplicité de questions a pu être abordée, concernant des domaines aussi variés que la position systématique d'espèces aujourd'hui éteintes, l'origine du *pool* génique de l'homme moderne, les grandes migrations humaines, l'incidence génétique de la domestication d'espèces animales et végétales, ou l'émergence de nouvelles pathologies. Curieusement, les modèles d'évolution moléculaire n'ont encore que relativement peu bénéficié des premiers résultats de la paléogénétique. En effet, actuellement, un arbre de phylogénie moléculaire se construit à partir de l'analyse des seules séquences actuelles. Les séquences ancestrales les plus probables sont estimées à l'aide d'algorithmes mathématiques reposant sur des concepts établis *a priori* concernant l'évolution des séquences. L'un d'eux est celui du maximum de parcimonie qui stipule que l'évolution est économe et que les séquences ancestrales sont nécessairement celles qui nécessitent un minimum de mutations pour conduire à la

diversité des séquences actuelles. Les séquences du passé permettent de suivre pas à pas l'évolution réelle d'un même marqueur génétique au cours du temps. Il ne fait donc pas de doute que l'analyse des paléoséquences permettra de confronter l'évolution historique d'un marqueur à l'évolution inférée des algorithmes de phylogénie moléculaire et d'évaluer si oui ou non l'évolution est parcimonieuse...

• ADN ancien et calibrage de l'horloge moléculaire

Le débat sur les horloges moléculaires fait encore aujourd'hui grand bruit. Les données déjà obtenues par la paléogénétique devraient aider à éclaircir la situation. En effet, très souvent, le calibrage d'une horloge moléculaire souffre de deux approximations : imprécision sur l'âge de séparation des espèces et variations des taux d'évolution sur de longues périodes. Avec l'ADN des fossiles, l'évolution d'un même marqueur génétique sur des périodes courtes et précisément déterminées peut être suivie et il devient possible de quantifier les taux de mutations réels survenus au cours du temps. C'est pourquoi notre équipe retrace actuellement l'évolution de différentes régions de l'ADNmt chez un animal modèle, l'ours des cavernes [71]. La grotte de Scladina (Belgique) se prête bien à ce raisonnement puisqu'on dispose d'ossements d'ours des cavernes parfaitement datés (chronologie relative et radiodattations) couvrant toutes les époques depuis cent trente mille ans. Ainsi, on espère pouvoir proposer un modèle de calibrage de l'horloge moléculaire en voyant pour la première fois défiler ses aiguilles.

• Réparations de l'ADN ancien

Comme nous l'avons vu, l'ADN des fossiles porte en lui la marque du temps ; il est très fragmenté, dégradé, et chimiquement modifié sous l'action de réactions d'hydrolyse, d'agents oxydants et de radiations ionisantes [28, 32]. Les effets de ces modifications sont divers. Certains



s'opposent en *cis* à l'élongation catalysée par la *Taq* polymérase (dimères de T [14]) ; d'autres modifient le message génétique en s'appariant à une autre base que la base attendue (8oxoG [27]). La réparation des substrats anciens, préalable à toute étape d'amplification permettrait donc à la fois de réduire l'effet *cis*-inhibiteur de certaines lésions [14] mais également de limiter les artefacts d'appariement [4]. Le mécanisme de déplacement de coupure (*nick translation*) a déjà permis à deux équipes de «rajeunir l'ADN» pour en faire un meilleur substrat avant de l'amplifier [14, 69] ; le mécanisme de réparation par excision de base semble quant à lui être une stratégie de choix pour réparer *in situ* les bases modifiées des substrats anciens. Il est vraisemblable que la combinaison de ces méthodes facilitera l'accès aux gènes nucléaires, jusqu'à présent utilisés seulement dans un nombre limité d'études [16, 19].

• De la recherche fondamentale à... l'assiette du consommateur

Des secteurs variés bénéficient déjà des innovations techniques développées pour extraire et amplifier les ADN fortement dégradés. A l'évidence, s'il existe une application immédiate des travaux de la paléogénétique, c'est bien la recherche d'ADN en criminologie ; de telles recherches ont d'ailleurs permis d'identifier la dépouille de criminels de guerre, dont celle du docteur Mengele – l'ange noir de la mort à Auschwitz [70]. Dans le secteur de l'agroalimentaire également, les procédés d'appertisation conduisent à une forte dégradation des acides nucléiques. Les services de répression des fraudes peuvent faire actuellement appel à des entreprises spécialisées dans l'analyse de l'ADN de produits alimentaires, pour dépister les indélécatesses d'étiquetage. Il est donc clair que les recherches fondamentales sur l'ADN des fossiles ne cesseront à l'avenir d'apporter des idées d'application dans des domaines inattendus ■

Remerciements

Nous remercions particulièrement Michel Solignac pour la lecture attentive de ce manuscrit ; le CNRS, UCB Lyon I, le MENRT (ACI blanche) et la Fondation pour la recherche médicale, pour leur soutien financier.

Ludovic Orlando, Catherine Hänni

CNRS UMR 5534. Centre de génétique moléculaire et cellulaire, Université Lyon I, Bât. 741, Boulevard du 11-Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

RÉFÉRENCES

1. Higuchi R, Bowman B, Freiberger B, Ryder OA, Wilson AC. DNA sequence from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 1984 ; 312 : 282-4.
2. Pääbo S. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 1985 ; 314 : 644-5.
3. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987 ; 155 : 335-50.
4. Higuchi RG, Wrischnik LA, Oakes E, George M, Tong B, Wilson AC. Mitochondrial DNA of the extinct quagga: relatedness and extent of *postmortem* change. *J Mol Evol* 1987 ; 25 : 283-7.
5. Hänni C, Laudet V, Stéhelin D, Taberlet P. Tracking the origins of the cave bear (*Ursus spelaeus*) by mitochondrial DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 12336-40.
6. Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki HK, Stoneking M, Pääbo S. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 1997 ; 90 : 19-30.
7. Krings M, Geisert H, Schmitz RW, Krainitzki H, Pääbo S. DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the neandertal type specimen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 5581-5.
8. Ovchinnikov IV, Gotherstrom A, Romanova GP, Kharitonov YM, Liden K, Goodwin W. Molecular analysis of Neandertal DNA from the northern Caucasus. *Nature* 2000 ; 404 : 490-3.
9. Stone AC, Stoneking M. Ancient DNA from a pre-Columbian Amerindian population. *Am J Phys Anthropol* 1993 ; 92 : 463-71.
10. O'Rourke DH, Carlyle SW, Parr RL. Ancient DNA: methods, progress and perspectives. *Am J Hum Biol* 1996 ; 8 : 557-71.
11. Drancourt M, Aboudharam G, Signoli M, Dutour O, Raoult D. Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 12637-40.
12. Bailey JF, Richards MB, Macauley VA, et al. Ancient DNA suggests a recent expansion of European cattle from a diverse wild progenitor species. *Proc R Soc Lond B* 1996 ; 263 : 1467-73.
13. Goloubinoff P, Pääbo S, Wilson AC. Evolution of maize inferred from sequence diversity of an *Adh2* gene segment from archaeological specimens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 1997-2001.
14. Rogan P, Salvo JJ. Study of nucleic acids isolated from ancient remains. *Yearbook of Physical Anthropology* 1990 ; 33 : 195-214.
15. Handt O, Richards M, Trommsdorff M, et al. Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science* 1994 ; 264 : 1775-8.
16. Greenwood AD, Capelli C, Possnert G, Pääbo S. Nuclear DNA sequences from late Pleistocene megafauna. *Mol Biol Evol* 1999 ; 16 : 1466-73.
17. Hänni C, Laudet V, Sakka M, Begue A, Stéhelin D. Amplification of mitochondrial DNA fragments from ancient human teeth and bones. *C R Acad Sci Paris* 1990 ; 310 : 365-70.
18. Hagelberg E, Sykes B, Hedges R. Ancient bone DNA amplified. *Nature* 1989 ; 342 : 485.
19. Woodward SR, King MJ, Chiu NM, Kuchar MJ, Griggs CW. Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. *PCR Methods Appl* 1994 ; 3 : 244-7.
20. Poinar HN, Hofreiter M, Spaulding WG, et al. Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nototheriops shastensis*. *Science* 1998 ; 281 : 402-6.
21. Roy MS, Girman DJ, Taylor AC, Wayne RK. The use of museum specimens to reconstruct the genetic variability and relationships of extinct populations. *Experientia* 1994 ; 50 : 551-7.
22. Eglinton G, Logan GA. Molecular preservation. *Philos Trans R Soc Lond B* 1991 ; 333 : 315-27 ; discussion 327-8.
23. Golenberg EM, Giannasi DE, Clegg MT, et al. Chloroplast DNA sequence from a miocene *Magnolia* species. *Nature* 1990 ; 344 : 656-8.
24. Woodward SR, Weyand NJ, Bunnell M. DNA sequence from Cretaceous period bone fragments. *Science* 1994 ; 266 : 1229-32.



RÉFÉRENCES

25. DeSalle R, Barria M, Wray C. PCR jumping in clones of 30-million-year-old DNA fragments from amber preserved termites (*Mastotermes electrodominicus*). *Experientia* 1993 ; 49 : 906-9.
26. Gutiérrez G, Marin A. The most ancient DNA recovered from an amber-preserved specimen may not be as ancient as it seems. *Mol Biol Evol* 1998 ; 15 : 926-9.
27. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993 ; 362 : 709-15.
28. Pääbo S. Ancient DNA : extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 1939-43.
29. Handt O, Krings M, Ward RH, Pääbo S. The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am J Hum Genet* 1996 ; 59 : 368-76.
30. Bär W, Kratzer A, Mächler M, Schmid W. *Post-mortem* stability of DNA. *Forensic Sci Int* 1988 ; 39 : 59-70.
31. Austin JJ, Smith AB, Thomas RH. Palaeontology in a molecular world: the search for authentic ancient DNA. *Trends Ecol Evol* 1997 ; 12 : 3036.
32. Höss M, Jaruga P, Zastawny, Dizdaroglu M, Pääbo S. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res* 1996 ; 24 : 1304-7.
33. Stoneking M. Ancient DNA: how do you know when you have it and what can you do with it? *Am J Hum Genet* 1995 ; 57 : 1259-62.
34. Shinoda KI, Kunisada T. Analysis of ancient Japanese society through mitochondrial DNA sequencing. *Int J Ost* 1994 ; 4 : 291-7.
35. Poinar HN, Höss M, Bada J, Pääbo S. Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* 1996 ; 272 : 864-6.
36. Stone AC, Stoneking M. Analysis of ancient DNA from a prehistoric Amerindian cemetery. *Philos Trans R Soc Lond B* 1999 ; 354 : 153-9.
37. Hardy C, Callou C, Vigne JD, et al. Rabbit mitochondrial DNA diversity from prehistoric to modern times. *J Mol Evol* 1995 ; 40 : 227-37.
38. Hänni C, Brousseau T, Laudet V, Stehelin D. Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. *Nucleic Acids Res* 1995 ; 23 : 881-2.
39. Scholz M, Giddings I, Pusch CM. A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I. *Ann Biochem* 1998 ; 259 : 283-6.
40. Golenberg EM, Bickel A, Weihs P. Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Res* 1996 ; 24 : 5026-33.
41. Cooper A, Atkinson IAE, Lee WG, Worthy TH. Evolution of the moa and their effect on the New Zealand flora. *Trends Ecol Evol* 1993 ; 8 : 433-7.
42. Cooper A. Ancient DNA sequences reveal unsuspected phylogenetic relationships within New Zealand wrens (*Acanthisittidae*). *Experientia* 1994 ; 50 : 558-63.
43. Lalueza-Fox C, Bertranpetit J, Alcover JA, Shailer N, Hagelberg E. Mitochondrial DNA from *Myotragus balearicus*, an extinct bovid from the Balearic Islands. *J Exp Zool* 2000 ; 288 : 56-62.
44. Cooper A, Rhymer J, James HF, et al. Ancient DNA and island endemics. *Nature* 1996 ; 381 : 484.
45. Leonard JA, Wayne RK, Cooper A. Population genetics of ice age brown bears. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 1651-4.
46. Diamond J. Location, location, location: the first farmers. *Science* 1997 ; 278 : 1243-44.
47. Brown TA, RG Allaby, Brown KA, O'Donoghue K, Sallares R. DNA in wheat seeds from European archaeological sites. *Experientia*. 1994 ; 50 : 571-5.
48. Allaby RG, Jones MK, Brown TA. DNA in charred wheat grains from the iron age hillfort at Danebury, England. *Antiquity* 1994 ; 68 : 126-32.
49. Pääbo S. Neolithic genetic engineering. *Nature* 1999 ; 398 : 194-5.
50. Höss M. Neanderthal population genetics. *Nature* 2000 ; 404 : 453-4.
51. Hagelberg E. Ancient and modern mitochondrial DNA sequences and the colonization of the Pacific. *Electrophoresis* 1997 ; 18 : 1529-33.
52. Gibbons A. Genes point to a new identity for Pacific pioneers. *Science* 1994 ; 263 : 32-3.
53. Horai S, Kondo R, Murayama K, Hayaishi S, Koike H, Nakai N. Phylogenetic affiliation of ancient and contemporary humans inferred from mitochondrial DNA. *Philos Trans R Soc Lond B* 1991 ; 333 : 409-16 ; discussion 416-7.
54. William N. Ancient DNA. The trials and tribulations of cracking the prehistoric code. *Science* 1995 ; 269 : 923-4.
55. Merriwether DA, Rothhammer F, Ferrel RE. Genetic variation in the new world: ancient teeth, bone, and tissue as sources of DNA. *Experientia* 1994 ; 50 : 590-601.
56. Bailey JF, Henneberg M, Colson IB, Ciarallo A, Hedges REM, Sykes B. Monkey business in Pompeii-unique find of a juvenile barbary macaque skeleton in Pompeii identified using osteology and ancient DNA techniques. *Mol Biol Evol* 1999 ; 16 : 1410-4.
57. Dumolin-Lapegue S, Pemonge MH, Gielly L, Taberlet P, Petit RJ. Amplification of oak DNA from ancient and modern wood. *Mol Ecol* 1999 ; 8 : 2137-40.
58. Delefosse T, Hänni C. Molecular archaeology: familial relationship into a neolithic deposit. *C R Seances Soc Biol Fil* 1997 ; 191 : 521-8.
59. Gerstenberger J, Hummel S, Schultes T, Hack B, Herrmann B. Reconstruction of a historical genealogy by means of STR analysis and Y-haplotyping of ancient DNA. *Eur J Hum Genet* 1999 ; 7 : 469-77.
60. Taberlet P, Griffin S, Goossens B, et al. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res* 1996 ; 24 : 3189-94.
61. Sykes B, Leiboff A, Low-Beer J, Tetzner S, Richards M. The origins of the Polynesians: an interpretation from mitochondrial lineage analysis. *Am J Hum Genet* 1995 ; 57 : 1463-75.
62. Faerman M, Bar-Gal GK. Determining the sex of infanticide victims from the late Roman era through ancient DNA analysis. *J Arc Sci* 1998 ; 25 : 8621-5.
63. Faerman M, Filon D, Kahila G, Greenblatt CL, Smith P, Oppenheim A. Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. *Gene* 1995 ; 167 : 327-32.
64. Taylor GM, Legge AJ, Shaw RJ, Young D. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* from medieval human remains. *Microbiology* 1999 ; 145 : 899-904.
65. Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 2091-4.
66. Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, et al. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am J Phys Anthropol* 1999 ; 108 : 401-7.
67. Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG. Initial genetic characterization of the 1918 « Spanish » Influenza virus. *Science* 1997 ; 275 : 1793-6.
68. Li HC, Fujiyoshi T, Lou H, et al. The presence of ancient human T-cell lymphotropic virus type I provirus DNA in an Andean mummy. *Nat Med* 1999 ; 5 : 1428-32.
69. Pusch CM, Giddings I, Scholz M. Repair of degraded duplex DNA from prehistoric samples using *Escherichia coli* DNA polymerase I and T4 DNA ligase. *Nucl Acids Res* 1998 ; 26 : 857-9.



RÉFÉRENCES

70. Jeffreys AJ, Allen MJ, Hagelberg E, Sonnberg A. Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. *Forensic Sci Int* 1992 ; 56 : 65-76.

71. Loreille O, Orlando L, Patou-Mathis M, Philippe M, Taberlet P, Hänni C. Ancient DNA and Pleistocene evolution of the cave bear (*Ursus Spelaeus*) 2000 (soumis pour publication).

TIRÉS À PART

L. Orlando et C. Hänni.

Summary

Fresh news for ancient DNA

The advent of the Polymerase Chain Reaction technology has led to the emergence of a totally new field of research, known as molecular paleontology. PCR is indeed well suited to amplify the rare molecules that have been scarcely preserved in fossils through time. Although the claim of the retrieval of several million-year-old DNA had brought

skepticism into the field of ancient DNA research, this new science has now rigorously determined its own limits. Paleogenetics provides an attractive approach to resolve questions as diverse as the phylogenetic position of recently extinct species, the genetic differentiation of past populations, the origin of human genetic pool, the occurrence of human colonization waves throughout the world, or the spreading of great historic diseases.