Chapitre 32

Populations humaines anciennes : que nous révèle leur ADN ?

Christine Keyser[1, 3], Bertrand Ludes[2, 3], Eric Crubézy[3]
1 - Institut de Médecine Légale, CNRS, UMR 5288, Université de Strasbourg, France.
2 - Institut Médico-Légal, Université Paris Descartes, France.
3 - Laboratoire AMIS, CNRS, UMR 5288, Université de Toulouse, France.

32.1 Introduction

Il y a tout juste trente ans, la possibilité d'accéder à l'information génétique conservée dans le matériel archéologique était mise en évidence, donnant naissance à une nouvelle discipline, la paléogénétique ou étude de l'ADN ancien [1]. Dans le même temps, les scènes de crime bénéficiaient de nouvelles méthodes d'investigations : l'étude de l'ADN contenu dans les traces de sang, de sperme ou de salive permettait désormais d'identifier les coupables par comparaison aux empreintes génétiques établies sur des suspects [2].

Ces deux découvertes, totalement indépendantes, pouvaient elles servir à retracer l'histoire des populations humaines du passé ? La réponse est oui, et l'objectif du présent article est de décrire comment il est aujourd'hui possible d'établir l'empreinte ou le profil génétique de sujets inhumés au sein d'ensembles funéraires du passé, de déterminer l'appartenance d'ossements épars à un même individu (sépultures collectives), de rechercher les liens de parenté pouvant unir les individus d'un même ensemble sépulcral, de déterminer leurs caractéristiques physiques, de retracer les voies de migration qu'ils ont pu emprunter il y a plusieurs centaines ou milliers d'années ou encore de caractériser les pathologies infectieuses dont ils ont pu souffrir.

Toutes ces études ne peuvent néanmoins être réalisées sans précautions et moyens appropriés. En effet, les facteurs taphonomiques régissant la conservation de l'ADN dans les tissus anciens ainsi que ceux responsables d'inhibitions lors des réactions d'amplification étant encore mal appréhendés, les analyses d'ADN ancien nécessitent la mise au point de protocoles expérimentaux adaptés, ainsi qu'une collaboration étroite avec les anthropologues présents sur le site. La prise en compte des éléments au contact des vestiges étudiés (étoffes, bijoux,. . .) se révèle en effet fon-

damentale pour préciser, voire contourner les processus d'inhibition. Compte tenu du problème crucial des contaminations par l'ADN moderne exogène, ces analyses imposent d'autre part des locaux et des équipements particuliers ainsi que des règles de travail très strictes. Enfin, le choix des marqueurs à étudier ainsi que l'interprétation des résultats analytiques ne peuvent être réalisés que dans le cadre d'une équipe élargie (biologistes moléculaires, anthropologues, archéologues, bio-statisticiens, généticiens des populations. . .) possédant la totalité des éléments de réflexion.

32.2 Analyse de molécules d'ADN dégradées

32.2.1 Nécessité d'une méthodologie adaptée

L'ADN étant soumis à des processus de dégradation post-mortem, sa durée de vie est limitée et la quantité de matériel génétique exploitable dans les vestiges humains est en règle très faible. Les molécules d'ADN ancien sont en outre systématiquement fragmentées, chimiquement modifiées et possiblement complexées à d'autres molécules [3]. Comme l'amplification d'un ADN ancien est beaucoup moins efficace que l'amplification d'un ADN contemporain, la présence de quelques molécules d'ADN exogène est suffisante pour masquer l'amplification d'ADN ancien endogène. Il est donc fondamental d'empêcher toutes contaminations en utilisant des locaux adaptés et réservés à l'étude d'ADN dégradés (locaux en surpression équipés de lampes UV, de hottes à flux laminaire,. . .) ainsi que des méthodes rigoureuses de travail (port de blouses, gants, masques, charlottes et sur-chaussures ; sens de circulation des échantillons ; décontamination systématique des locaux et paillasses,. . .). L'analyse de l'ADN ancien nécessite donc un savoir-faire particulier et une méthodologie spécifique.

32.2.1.1 Choix des substrats d'analyse

Tous les vestiges humains ne sont pas source de matériel génétique et, s'il est possible d'extraire de l'ADN à partir de tissus mous momifiés, l'essentiel des analyses moléculaires porte sur des tissus durs tels que les os et les dents, fréquemment retrouvés en contexte archéologique. Ces restes représentent un microenvironnement particulièrement favorable à la conservation de l'ADN grâce à l'adsorption des acides nucléiques sur une matrice minérale, l'hydroxyapatite [4].

Une approche « multi-substrats » consistant à étudier l'ADN d'un sujet à partir de trois sources différentes d'ADN (eg. os, dents, cheveux) peut être utilisée dans le cas de sujets momifiés [5]. Cette approche présente un double intérêt : d'une part, pour un même individu, les chances d'obtenir de l'ADN susceptible de livrer des données génétiques exploitables sont multipliées ; d'autre part si les résultats obtenus sont reproduits pour chacun des substrats utilisés, cela atteste leur authenticité (il est en effet peu probable qu'une contamination affecte simultanément trois substrats différents).

32.2.1.2 Choix des marqueurs moléculaires ciblés

Parce que peu de molécules d'ADN parviennent à subsister dans les restes anciens, les paléogénéticiens ont longtemps privilégié l'ADN mitochondrial (ADNmt), repré-

senté dans les cellules à de multiples exemplaires à la différence de l'ADN nucléaire. Mais les régions de variabilité portées par l'ADNmt ne permettent pas toujours de répondre à la problématique posée car elles ne représentent qu'une partie de l'histoire du génome. Dans le souci de disposer pour chaque problématique abordée de marqueurs génétiques adaptés et complémentaires, il est important d'exploiter différents outils moléculaires, localisés aussi bien sur l'ADNmt que sur l'ADN nucléaire.

L'ADNmt présente des caractéristiques qui en font un matériel de choix pour les études d'ADN ancien. Outre un nombre élevé de copies par cytoplasme cellulaire (ce qui accroit la probabilité de trouver une copie intacte dans des prélèvements dégradés), le génome mitochondrial (non soumis à la recombinaison méiotique) est transmis inchangé de génération en génération, par la mère exclusivement, ce qui permet de retracer des lignées maternelles. L'ADN nucléaire, transmis sur un mode Mendélien à l'exception de la partie non recombinante du chromosome Y (transmise de manière uniparentale), se révèle quant à lui indispensable pour l'étude des liens de proches parenté et celle des lignées paternelles.

Afin d'exploiter pleinement l'ADN conservé dans les restes anciens, deux types de marqueurs moléculaires sont majoritairement ciblés depuis plusieurs années : les STR (*Short Tandem Repeats*) ou microsatellites et les SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) ou polymorphismes ponctuels de séquence. L'avènement des nouvelles générations de séquenceurs (NGS) permet depuis peu d'étendre les investigations à l'analyse de tous types de polymorphismes.

32.2.2 Techniques analytiques utilisées

32.2.2.1 Etude des STR (Short Tandem Repeats)

Les séquences génétiques utilisées pour identifier les individus sont des régions polymorphes appelées STR. Il s'agit de séquences formées d'unités de deux à sept nucléotides répétés de 50 à 100 fois à chaque locus. Les STR sont situés aussi bien sur les chromosomes homologues ou autosomes que sur les chromosomes sexuels. Le nombre d'unités répétées varie d'un individu à l'autre. Cette variation du nombre de répétitions à un même locus de l'ADN génère un polymorphisme de longueur de la séquence étudiée.

Les STR présents sur les autosomes permettent d'établir un profil génétique propre à chaque individu (à l'exception des jumeaux monozygotes). Les profils génétiques sont, le plus souvent, établis à l'aide de kits commerciaux qui permettent d'amplifier simultanément des régions STR localisées sur des chromosomes différents (en plus du locus de l'amélogénine permettant la détermination du sexe), générant ainsi un profil hautement variable d'un individu à l'autre. Les produits amplifiés sont marqués par des fluorochromes de couleurs différentes avant d'être séparés en fonction de leur taille et identifiés sur un séquenceur automatique sous forme d'un électrophorégramme (Figure 1).

Les STR localisés sur le chromosome Y permettent de retracer des filiations patrilinéaires. On ne parle plus de profil génétique mais d'haplotype Y car ce dernier ne caractérise pas un individu mais une lignée paternelle.

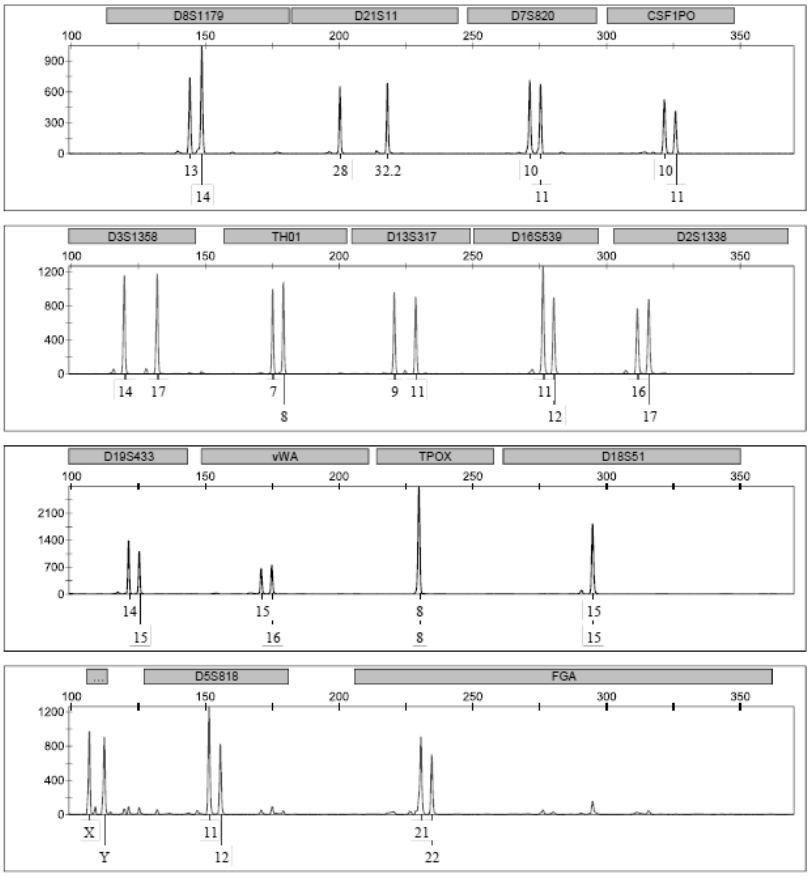


FIGURE 1 – Exemple de profil génétique établit au moyen du kit AMPFlSTR® Identifiler® (Applied Biosystems). Les allèles de l'amélogénine (notés X et Y en bas à gauche) indiquent que les restes osseux sont ceux d'un individu de sexe masculin.

32.2.2.2 Etude des SNP (Single Nucleotide Polymorphisms)

Contrairement aux STR, localisés au niveau de régions non codantes de l'ADN nucléaire, les SNP sont présents aussi bien sur les régions codantes que non codantes et ce sur l'ADN nucléaire comme sur l'ADNmt. Compte tenu de la taille réduite de leur région informative, ces marqueurs constituent des cibles d'analyse privilégiées pour les études d'ADN dégradé et fragmenté. Les SNP de l'ADN mitochondrial permettent de définir des haplotypes caractérisant des lignées maternelles ainsi que des haplogroupes qui rassemblent les haplotypes ayant une origine ancestrale commune.

Les SNP étudiés au niveau de l'ADN autosomal permettent de déterminer des caractéristiques phénotypiques telles que la couleur de la peau, des yeux ou des cheveux, tandis que ceux présent sur le chromosome Y permettent de caractériser des haplogroupes qui, comme les haplogroupes mitochondriaux, présentent une certaine

spécificité géographique et permettent une estimation de l'origine biogéographique des sujets anciens étudiés.

L'analyse des SNP peut se faire au moyen de nombreuses techniques parmi lesquelles le séquençage classique (technique de Sanger) ou le miniséquençage (kit SNaPshot®, Applied Biosystems), tous deux mis en œuvre sur séquenceur automatique. Elle peut également se faire par spectrométrie de masse, notamment au moyen de la technologie iPLEX™ Gold développée par la société Sequenom sur le système MassARRAY® [6] (Figure 2).

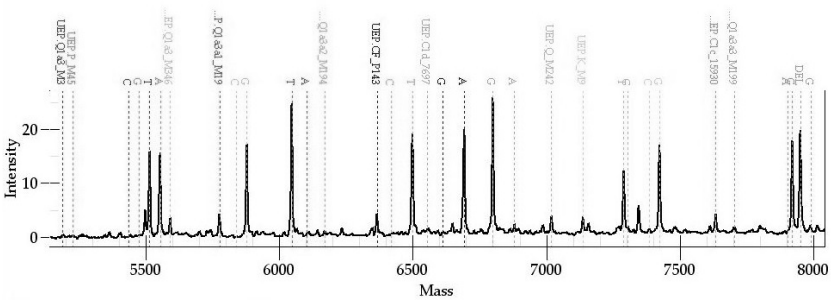


Figure 2 – Exemple d'un spectre établi au moyen du kit iPLEX™ Gold (Sequenom). Les pics correspondent aux allèles amplifiés pour chaque SNP ciblé. Ainsi, pour le locus du chromosome Y M45 (en vert), c'est l'allèle comprenant une adénine (A) qui a été amplifié. La technique utilisée permet une amplification simultanée de plusieurs SNP.

32.2.2.3 Etude des génomes complets

Les nouvelles générations de séquenceurs permettent désormais d'étudier des génomes mitochondriaux et nucléaires complets ou du moins d'accéder à des portions du génome bien plus importantes que celles ciblées par les techniques basées sur une amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) classique. Pour autant, même si les génomes complets de spécimens précieux ont été publiés [7-11], l'approche NGS ne semble pas encore appliquée à l'analyse de sépultures multiples ou de nécropoles anciennes pour en étudier l'organisation, l'histoire ou encore l'état sanitaire comme décrit ci-dessous.

32.3 Organisation et recrutement des ensembles sépulcraux

La caractérisation des individus au sein des sites funéraires est un préalable indispensable pour étudier les populations du passé. Elle permet, outre de définir si une population ancienne peut être assimilée à une population « naturelle», de s'affranchir de facteurs de confusion représentés notamment par des sujets apparentés. L'étude des liens de parenté a longtemps été abordée à partir des caractères discrets, néanmoins une détermination plus précise des liens biologiques unissant les individus d'un même ensemble funéraire est réalisée grâce aux marqueurs moléculaires [12].

32.3.1 Liens de parenté au sein de vastes ensembles funéraires : exemple de la nécropole d'Egyin Gol

32.3.1.1 Contexte de l'étude

Dans le cadre d'un projet international de recherche sur les origines du peuple mongol, la Mission Archéologique Française en Asie Centrale (MAFAC) a entrepris en 1994 la prospection et le sondage de différents sites funéraires de la vallée d'Egyin Gol, située dans le Nord de la Mongolie, près de la frontière sibérienne et du lac Baïkal (Figure 4). La fouille exhaustive de l'un de ces sites datant de la période Xiongnu (III^{e} siècle av. J.-C. - II^{e} siècle ap. J.-C.) a permis de mettre au jour 84 tombes abritant 99 squelettes en connexion, parfaitement bien conservés par le froid.

Les Xiongnu étaient des cavaliers nomades qui ont dominé la plus grande partie de la Mongolie du IV^{e} siècle avant notre ère au II^{e} siècle après notre ère. Ils ont fondé le premier Empire des Steppes et ont représenté pour la Chine une sérieuse menace comme en atteste la Grande Muraille, érigée à ses débuts pour contrer leurs nombreuses incursions.

32.3.1.2 Analyses paléogénétiques

L'étude génétique de la nécropole d'Egyin Gol a eu pour premier objectif d'établir les liens de parenté ayant pu exister entre les individus inhumés dans ce site funéraire. Compte tenu de l'excellent état de conservation des restes squelettiques, les analyses moléculaires ont porté dans un premier temps sur l'ADN nucléaire. L'étude simultanée de neuf marqueurs STR autosomaux a permis d'établir le profil génétique (plus ou moins complet) de plus de la moitié des sujets étudiés. L'analyse comparative de ces profils a mis en évidence des relations de proche parenté entre plusieurs sujets inhumés, pour la plupart, à proximité les uns des autres.

L'étude de cette nécropole s'est poursuivie par l'analyse de marqueurs moléculaires uniparentaux permettant de retracer des lignées paternelles et maternelles sur plusieurs générations. L'analyse de STR localisés sur le chromosome Y ainsi que celle de la région hypervariable HVI de l'ADNmt ont permis de valider les liens de proches parenté déduits de l'analyse des marqueurs nucléaires autosomaux et de mettre en évidence de nouvelles parentés.

Ces résultats, combinés aux données de datations au carbone 14, ont permis de formuler des hypothèses concernant l'organisation spatiale de la nécropole. Selon toute vraisemblance, le recrutement funéraire aurait obéi à plusieurs critères : la présence de parents proches, l'appartenance à un groupe familial mais aussi l'appartenance à une élite sociale. En effet, le nombre restreint d'inhumations (une centaine) qui se sont succédées sur plus de 400 ans (durée d'utilisation de la nécropole) ainsi que la relative homogénéité du groupe étudié suggèrent que les tribus Xiongnu devaient avoir d'autres cimetières où enterrer leurs morts [13].

32.3.1.3 Comparaison données anciennes et contemporaines

Les données génétiques obtenues lors de cette étude, la plus vaste publiée à ce jour sur une nécropole ancienne, ont été comparées dans un second temps à des données issues de populations mongoles contemporaines.

En effet, de nombreuses tribus nomades se sont succédées sur le territoire de la Mongolie avant la naissance, au 13e siècle, du vaste empire érigé par Genghis Khan. L'histoire « prémongole » est donc complexe puisque des populations, pour l'essentiel de langues turques et mongoles, n'ont cessé de s'affronter pour affirmer leur prédominance dans la steppe. Afin d'estimer dans quelle mesure des changements significatifs ont pu affecter la structure génétique du peuple mongole sur deux millénaires, les données moléculaires obtenues sur les échantillons anciens de la vallée d'Egyin Gol ont été comparées à celles de deux populations mongoles contemporaines. Cette analyse comparative a mis en évidence une continuité génétique du pool génétique mongol, prouvant que l'impact des différentes tribus (notamment turques) qui se sont succédées sur le territoire actuel de la Mongolie est plus un impact culturel que génétique [14].

32.3.2 Etude des liens de parenté au sein de tombes isolées : exemple de la tombe princière Scythe de Bérel

Guerriers nomades, les Scythes ont constitué la première grande civilisation des steppes durant le 1er millénaire av. J.-C. avec un territoire qui s'étendait des rives du Danube à l'Altaï. Leur histoire s'étend sur plus de 1000 ans (XIIIe-IIIe siècle av. J.-C.).

Les Scythes ont enseveli les témoignages de leur histoire dans des chambres funéraires profondes recouvertes d'imposants tumuli ou kourganes. Dans l'une de ces tombes, située près du village de Bérel au Kazakhstan oriental, une expédition archéologique conduite par la MAFAC a mis au jour une vaste fosse rectangulaire comprenant deux parties, l'une occupée par 13 chevaux harnachés sacrifiés, l'autre par une chambre funéraire. Dans cette dernière les archéologues ont découvert un sarcophage contenant les restes de 2 corps, celui d'un homme âgé d'une quarantaine d'années et celui d'une femme âgée de plus de 65 ans (Figure 3). Le rapport de fouille révèle que le corps de l'homme aurait été inhumé seul il y a environ 2400 ans. Quelques temps après, des pillards auraient creusé un étroit tunnel du sommet du tumulus à la chambre funéraire, éventré l'un des côtés du sarcophage et dépouillé le corps de ses atours. Après le pillage et près de 20 ans après le dépôt du premier corps, une seconde inhumation aurait eu lieu au même endroit, celle de la femme âgée. Afin d'expliquer cette pratique funéraire inhabituelle, plusieurs prélèvements ont été réalisés sur les restes des deux corps et nous ont été confiés pour des analyses génétiques dans le but de déterminer le lien de parenté ayant pu exister entre les deux individus.

Les analyses d'amplification pratiquées sur l'ADN nucléaire et l'ADNmt ont permis de démontrer que les deux sujets retrouvés dans le même sarcophage n'étaient pas en filiation directe ou maternelle, et qu'ils étaient soit d'une même lignée paternelle, soit sans lien de parenté et pouvaient être alors mari et femme [15]. La séquence HVI portée par le sujet de sexe masculin est une séquence fortement représentée en

Europe. Le sujet féminin présentait en revanche une séquence d'ADNmt retrouvée dans les populations d'Asie Centrale et de Mongolie. Ces résultats ont permis de mettre en évidence l'existence d'unions mixtes dès le IV^{e} siècle av. J.-C.

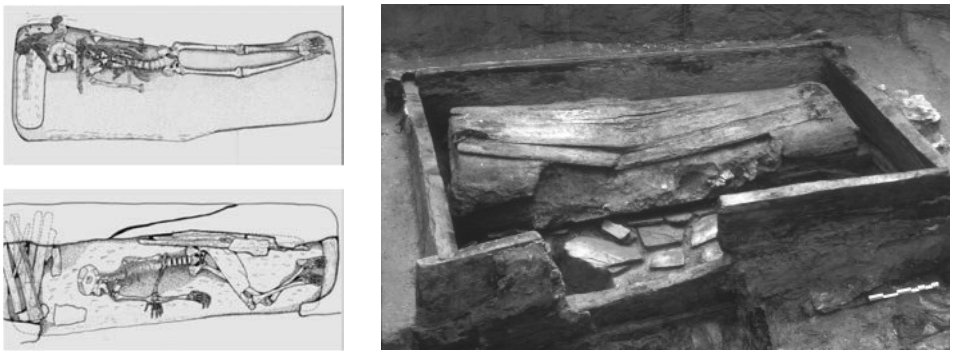


FIGURE 3 – Individus retrouvés dans le sarcophage présent dans la chambre funéraire : un homme (haut, gauche) et une femme (bas, gauche). Le sarcophage a été éventré (Photo et schémas, HP Francfort).

32.4 Origine des populations et histoire des peuplements

L'histoire détaillée des migrations reste à construire dans bien des régions du monde laissant à la paléogénétique un rôle considérable à jouer dans la recherche d'une vision claire des mouvements de populations qui ont eu lieu par le passé. La phylogéographie (étude de la distribution géographique des lignées génétiques) permet d'apporter des informations cruciales sur les dynamiques de peuplement comme nous allons tenter de le montrer au travers d'exemples puisés dans nos travaux.

32.4.1 Dynamique de peuplement de la Sibérie

Le peuplement de la Sibérie, bien qu'encore assez peu connu, est l'un des plus intéressants au monde compte tenu de la situation géographique de ce territoire, à la jonction des mondes européen, asiatique et américain. Les travaux menés par notre équipe en Sibérie intéressent principalement deux régions : la Iakoutie et la vallée de l'Ienisseï dans le sud sibérien.

32.4.1.1 Dynamique de peuplement de la Iakoutie

La Iakoutie est une république autonome de Russie, localisée en Sibérie orientale (Figure 4). Sa population actuelle se compose de 50% de Russes, 35% de Yakoutes et 15% de groupes ethniques minoritaires (Ioukaguirs, Evens, et Evenks principalement). La présence russe est attestée depuis 1629.

Les Yakoutes sont des pasteurs semi-nomades dont l'économie est basée sur l'élevage de bovidés et de chevaux. Ils parlent une langue appartenant à la famille des langues turques. Ils constituent donc une population relativement isolée, tant d'un point de vue linguistique que dans leur mode de vie, par rapport aux populations voisines (les Evenks et les Evens) qui parlent une langue Tongousse et sont traditionnellement des chasseurs/cueilleurs et des éleveurs de rennes. Ainsi, par leur langue et leur mode de



Figure 4 – Localisation de la Iakoutie.

vie, les Yakoutes semblent plus étroitement liés aux populations de la steppe qu'aux autres populations sibériennes.

Bien que l'ethnogenèse du peuple Yakoute soit peu connue, il semble néanmoins que la formation de ce groupe ethnique soit le résultat d'une migration vers le Nord de populations Mongoles et/ou Turques venues d'Asie Centrale ou du Sud de la Sibérie il y a 800 à 1200 ans environ. Si les analyses génétiques basées sur des données issues de populations actuelles confirment cette hypothèse, de nombreux points restent obscures. Ceci s'explique par la colonisation russe qui a modifié la composition des différentes ethnies de Sibérie. L'étude génétique du peuplement de la Iakoutie ne peut donc réellement s'envisager qu'à travers l'analyse des populations archéologiques antérieures au XVIII^{e} siècle. C'est dans cette perspective que nous avons travaillé sur des prélèvements osseux d'individus inhumés en Iakoutie entre le XV^{ième} et le XVIII^{e} siècle, prélèvements collectées lors de fouilles menées pendant 10 ans (de 2002 à 2012) en Iakoutie par l'équipe de la MAFSO (Mission Archéologique Française en Sibérie Orientale). Au cours de ces 10 années, plus de 130 individus yakoutes anciens ont été analysés au niveau de l'ADN nucléaire et de l'ADN mitochondrial.

La première étape de nos investigations a été de déterminer les liens de proches parentés pouvant exister entre les individus mis au jour. Ces analyses ont notamment révélé que les individus des sépultures multiples n'étaient pas toujours en proche parenté biologique.

De manière plus surprenante, l'analyse du chromosome Y a mis en exergue une très faible diversité haplotypique des lignées paternelles suggérant que ces dernières pourraient être issues d'un nombre réduit d'individus. Autre fait marquant : les lignées majoritaires sont propres aux populations Yakoutes (anciennes et actuelles).

De l'ensemble de ces données nous avons déduit que la colonisation de la Iakoutie est le résultat d'un effet fondateur : un petit nombre de sujets, originaires de la région péri-Baïkal, a migré vers le Nord, probablement en suivant le fleuve de la Lena. Ce groupe, constitué d'hommes et de femmes, s'est par la suite mélangé aux groupes autochtones et notamment aux Evenks, comme en atteste la structure génétique de l'échantillonnage que nous avons pu étudier. Cette structure génétique, relativement homogène en ce qui concerne les lignées paternelles et plus diversifiée en ce qui concerne les lignées maternelles, prouve néanmoins que l'impact génétique des colons russes est assez limité [16]. Reste à présent à déterminer de manière plus précise d'où sont partis les migrants. Ce travail implique l'analyse de nouveaux spécimens issus de régions voisines du lac Baïkal.

32.4.1.2 Dynamique de peuplement du sud sibérien

Dans le cadre d'une collaboration avec l'Université de Krasnoyarsk (Russie), nous avons eu l'opportunité d'étudier des sujets de l'âge du Bronze et de l'âge du Fer exhumés de kourganes localisés dans la région de Krasnoyarsk (Figure 4) et relevant de différentes cultures (dont certaines considérées comme indo-européennes). Ces sujets nous ont permis de tester une hypothèse déduite de données archéologiques, anthropologiques et de génétique contemporaine selon laquelle, à l'âge du Bronze les populations sud sibériennes présentaient essentiellement des traits europoïdes et ce n'est qu'à partir de l'âge du Fer que seraient apparus les traits mongoloïdes qui caractérisent les populations actuelles. Cette hypothèse pose évidemment la question de la provenance ou de l'origine de ces individus de type européen.

Les premières analyses menées sur les 26 individus à notre disposition ont porté sur l'ADN mitochondrial. Les résultats ont montré qu'à l'âge du Bronze les séquences mitochondriales retrouvées chez les sibériens anciens étaient essentiellement de type européen, validant ainsi l'hypothèse d'une prédominance de séquences européennes aux premier et deuxième millénaires avant J.C. A l'âge du Fer, cette prédominance semblait s'estomper au profit de séquences asiatiques.

Les analyses génétiques réalisées dans un second temps sur le chromosome Y ont montré que la quasi-totalité des individus masculins, bien que sans lien de proche parenté biologique, étaient porteurs de l'haplogroupe Y R1a1. Cet haplogroupe est largement représenté dans toute l'Eurasie avec une distribution qui, selon plusieurs auteurs, pourrait refléter l'expansion des Indo-Européens.

Afin d'établir la présence de traits morphologiques de type européen chez les sibériens anciens et dans le but de déterminer leur origine géographique, nous avons poursuivi nos investigations en analysant des marqueurs génétiques liés au phénotype. La méthode mise au point par notre équipe a reposé sur l'étude de SNP localisés au sein de gènes impliqués dans le mécanisme de la pigmentation. Ces mutations entraînent des variations inter-individuelles qui intéressent à la fois la couleur des yeux, des cheveux et de la peau et qui permettent de déterminer soit un phénotype, soit une origine bio-géographique. A partir des résultats obtenus pour les 26 sibériens anciens étudiés, nous avons pu établir que près de 60% d'entre eux avaient les yeux bleus ou verts (en tous les cas les yeux clairs) et que la plupart devaient avoir les

cheveux et la peau claire. Concernant leur origine biogéographique, il semble que 23 d'entre eux étaient d'origine européenne, deux d'origine asiatique et un d'origine mixte [17].

L'ensemble des données génétiques que nous avons obtenues sur ces individus nous ont conduit à conclure que l'histoire du peuplement du sud sibérien, ou de la région de Krasnoyarsk tout du moins, pourrait être liée à l'expansion des Indo-Européens telle qu'elle avait été pensée par M. Gimbutas. Cette dernière a associé la diffusion de l'indo-européen à toute une série de cultures steppiques réunies au sein d'une même tradition culturelle dite des « Kourganes ». Selon cette théorie, le berceau initial se situerait dans l'Ukraine méridionale et au sud de la Russie, tandis que pour J.P. Mallory, il serait plutôt à rechercher dans les steppes pontiques, entre la mer Noire et la mer Caspienne. A partir de l'une ou l'autre de ces régions, cette culture des 5ème ou 6ème millénaires avant notre ère aurait migré en plusieurs vagues vers l'Ouest mais aussi vers l'Est et, vraisemblablement, jusqu'au sud sibérien [18]. D'où venaient ces individus et quand sont-ils arrivés ? Ces sont des questions auxquelles nous tentons de répondre par l'analyse de nouveaux spécimens issus de régions avoisinantes.

32.4.2 Dynamique de peuplement de l'Europe

Le peuplement de l'Europe est très ancien (les premiers signes d'une occupation humaine datent du Pleistocène) et relativement complexe dans la mesure où plusieurs événements migratoires majeurs se sont produits sur ce continent au cours de la préhistoire. Le dernier a eu lieu il y a entre 11 000 et 7 000 ans et correspond à l'expansion Néolithique à partir du Croissant Fertile. Il se définit par le passage d'une économie basée sur la chasse, la cueillette et la pêche, à une économie agricole et pastorale.

32.4.2.1 La néolithisation, un processus de diffusion complexe

L'étude de la transition mésolithique - néolithique sur le continent européen est un sujet de controverses tant pour les préhistoriens que les anthropologues ou les généticiens. Deux hypothèses s'affrontent actuellement : la première, celle du remplacement, suggère que le développement de l'agriculture s'est accompagné d'importants flux géniques à partir du Proche-Orient ; la seconde privilégie un modèle basé essentiellement sur la diffusion de facteurs culturels, impliquant que les populations européennes actuelles seraient les descendants des populations de chasseurs-cueilleurs du mésolithique, voire du paléolithique. Les études basées sur la génétique contemporaines n'ont pas permis de trancher entre ces deux hypothèses.

Afin de s'affranchir des processus démographiques survenus lors des périodes historiques et/ou protohistoriques et de ne prendre en considération que les changements directement induits par la néolithisation, une approche moléculaire impliquant des squelettes datant de cette période semblait donc indispensable. Dans ce contexte, notre équipe a réalisé des analyses moléculaires sur des sujets datant du mésolithique jusqu'à la période protohistorique. Ces travaux, essentiellement axés sur le peuplement du sud de l'Europe, ont notamment porté sur deux sites : la Cova de

l'Avellaner, localisé en Catalogne espagnole et la grotte des Treilles, située en Aveyron.

32.4.2.2 La « Cova de l'Avellaner » (première moitié du V^{ème} millénaire av. J.-C.)

Les ossements retrouvés dans cette grotte du Néolithique ancien étaient fragmentés, ne permettant pas d'individualiser les sujets inhumés. Vingt sept échantillons ont été prélevés et analysés, principalement des dents isolées et des fragments d'os. Quatorze ont permis d'obtenir un profil génétique plus ou moins complet à partir desquels il a été possible de caractériser sept individus (six hommes et une femme) sans lien de proche parenté.

La détermination des haplogroupes mitochondriaux et du chromosome Y a permis d'avoir un aperçu des lignées génétiques présentes au début du Néolithique. Les lignées mitochondriales de ces sept individus sont des lignées très représentées aujourd'hui en Europe et au Proche-Orient ce qui suggère une origine maternelle ancienne. Au contraire, les haplogroupes Y portés par les six individus masculins (G2a et E1b1b1a1b) suggèrent une origine des lignées paternelles plus récente, probablement liées à l'expansion néolithique [19].

32.4.2.3 La « grotte I des Treilles » (III^{ème} millénaire av. J.-C.).

L'étude réalisée sur 53 prélèvements effectués sur la collection des Treilles (conservée au Muséum d'Histoire Naturelle de Toulouse) a permis d'obtenir des séquences mitochondriales pour 29 des 53 individus testés. Vingt quatre échantillons ont permis d'obtenir des profils génétiques plus ou moins complets à partir desquels le sexe et les liens de parenté existant entre ces spécimens de la fin de la période néolithique ont été établi : il s'agissait de 2 femmes et de 22 hommes, dont certains en proche parenté. La grotte des Treilles contenait donc essentiellement des sujets masculins porteurs, pour la majorité d'entre eux, de la même lignée paternelle. Alors que les lignées maternelles des 24 sujets étudiés sont retrouvées dans de nombreuses populations contemporaines, les lignées paternelles (rattachées aux haplogroupes Y G2a et I2a1) sont aujourd'hui peu fréquentes et sont majoritairement retrouvées au sein de populations méditerranéennes. Ces résultats portent à conclure à une structure patrilocale du groupe ancien étudié ainsi qu'à un peuplement Néolithique par la voie méditerranéenne plutôt que par l'Europe Centrale [20].

32.4.2.4 La néolithisation, un processus masculin ?

Nos travaux suggèrent que l'impact de la transition néolithique a pu être différent sur les lignées féminines et masculines. En effet, si les haplogroupes mitochondriaux retrouvés pour ces 2 sites sont assez variés et sous-entendent une origine maternelle diversifiée et majoritairement ancienne, la plupart des individus masculins portent des haplogroupes Y décrits comme étant associés à l'expansion néolithique. Néanmoins, de nouvelles investigations seront nécessaires pour confirmer ces premières constatations.

32.5 Paléomicrobiologie

La paléomicrobiologie moléculaire ou diagnostic des maladies infectieuses qui ont sévi par le passé, est une autre branche de la paléogénétique. Elle permet de détecter ou de confirmer la présence et l'identité de certains agents infectieux sur des séries de squelettes anciens. Parmi les pathologies les plus étudiées à l'heure actuelle figurent la tuberculose et la peste, mais d'autres maladies infectieuses d'origine virale et non plus bactérienne sont étudiées, telle la grippe ou la variole.

32.5.1 Etude d'une maladie d'origine bactérienne : la tuberculose

Les bactéries responsables de la tuberculose chez les Mammifères sont regroupées au sein du complexe Mycobacterium tuberculosis (CMTB). La tuberculose humaine est principalement due à *M. tuberculosis*, un pathogène strict de l'homme, mais *M. bovis*, l'agent principal de la tuberculose animale chez les bovins, est également capable de provoquer la maladie chez l'homme via le contact avec des animaux malades ou l'ingestion de produit laitiers contaminés. Les autres membres du CMTB comprennent des pathogènes strict de l'homme (*M.africanum, M. canettii*) et des espèces généralement retrouvées chez les animaux (*M.microti, M.caprae et M.pinnipedii*). Bien qu'ayant un spectre d'hôtes différent, ces espèces présentent 99,9% de similarité au niveau de leur séquence nucléotidique.

Même si les mycobactéries provoquent parfois des atteintes osseuses, notamment au niveau de la colonne vertébrale, aucun critère ostéologique ne permet de caractériser l'espèce ou la sous-espèce en cause. Cette distinction est possible au niveau moléculaire puisque des marqueurs spécifiques de chaque mycobactérie peuvent être amplifiés.

L'un des facteurs ayant pu impacter la dynamique de peuplement de la Iakoutie (cf 4.4.1) pourrait être lié aux épidémies qui ont sévit en Sibérie entre le 17ème et le 20^{e} siècle, et notamment à celles de tuberculose. Afin de déterminer dans quelle mesure cette pathologie a pu toucher les populations iakoutes anciennes et induire des changements démographiques importants, notre équipe a développé un test de typage destiné à établir la présence d'ADN mycobactérien chez les spécimens anciens. En effet, parmi la centaine de spécimens iakoutes exhumés au cours des 10 dernières années par la MAFSO, se trouvent des squelettes présentant des lésions osseuses évocatrices de la tuberculose.

Notre équipe s'est donc attachée à mettre au point un test moléculaire permettant de différencier les sept espèces du CMTB et les lignées phylogénétiques de *M. tuberculosis* [21]. Appliqué à l'étude de sept sujets anciens présentant des déformations osseuses suggérant une tuberculose, ce test de typage, espèce- et lignée-spécifique a permis de prouver que trois des sept spécimens étudiés avaient bien été infectés par l'agent pathogène de la tuberculose [22]. Ce test a également établi que cet agent pathogène était *M. tuberculosis* et non *M. bovis*, ce qui constitue un résultat fort intéressant dans la mesure où les Iakoutes étant des éleveurs de bétail, l'on aurait pu penser qu'ils avaient été infectés par l'agent de la tuberculose bovine.

32.5.2 Etude d'une maladie d'origine virale : la variole

De récents travaux nous laissent penser que des épidémies de variole ont également pu sévir en Iakoutie aux mêmes périodes, comme en atteste l'étude d'une tombe multiple exhumée en Iakoutie par l'équipe de la MAFSO et dans laquelle ont été retrouvés les restes de 5 corps, 3 adultes et 2 enfants.

L'examen de cette sépulture a révélé que les décès étaient certainement survenus dans des délais très proches et que les inhumations avaient suivi de près les décès. L'analyse des liens de parenté a révélé que 3 générations étaient représentées dans cette tombe puisque s'y trouvaient une femme (adulte), ses deux enfants (adultes) et ses deux petits-fils. L'analyse histologique d'un échantillon pulmonaire prélevé sur la mère des deux jeunes enfants a mis en évidence la présence de pigments ferriques suggestifs d'un épisode hémorragique. Suite à ces observations, l'hypothèse d'une infection létale a été proposée et notamment celle d'une infection par le virus de la variole. Des investigations moléculaires visant à amplifier trois régions du génome de la variole ont été menées. L'analyse phylogénétique réalisée à partir des fragments amplifiés a révélé des séquences apparentées à celle du génome de la variole suggérant la possibilité d'une épidémie ayant dévasté la petite famille [23].

32.6 Conclusion

Que nous révèle l'ADN des populations ou civilisations qui nous ont précédées ? Des détails fascinants sur leurs pratiques funéraires, souvent centrées sur l'existence de liens familiaux et sur l'appartenance à un groupe ou une élite sociale. Des éléments sur la transmission de leurs cultures qui ne s'accompagne pas toujours de flux de gènes. Des informations précieuses sur leurs systèmes matrimoniaux (existence de mariages mixtes, prépondérance de systèmes patrilocaux, . . .). Des données sur les pressions génétiques qu'elles ont pu subir dans leur histoire (effet fondateur, goulot d'étranglement, émigration, immigration,..). Des indices sur les voies de migration qu'elles ont pu emprunter, confirmant ou réfutant les modèles proposés. Enfin des informations sur les maladies qui les ont touchées et qui ont pu conduire à leur disparition.

Etudier les populations humaines du passé constitue donc un travail riche de découvertes passionnantes mais qui ne se mène pas sans difficultés. Produire des données authentiques nécessite d'apporter un soin considérable au choix des échantillons, à leur traitement, long et fastidieux, à leur analyse, qu'il faut reproduire à maintes reprises. L'interprétation des données produites est entravée par des biais d'échantillonnage, des données manquantes, des limites techniques et interprétatives. C'est une mission coûteuse tant sur le plan du temps que de l'argent investi.

Néanmoins, les progrès accomplis au cours des trois dernières décennies dans le domaine de l'ADN ancien ont été prodigieux et vont permettre de faire un bond énorme dans nos connaissances des populations anciennes. La paléogénétique va bien vite être remplacée par la paléogénomique. En quelques années, les données accumulées vont se multiplier et très vite nous pourrons accéder à une vision plus juste et plus précise de l'histoire de ces populations du passé.

Remerciements

Les auteurs remercient tous les étudiant(e)s qui ont préparé leur Master et/ou leur Doctorat à nos côtés et qui, grâce à leur travail et leur ténacité, ont grandement contribué au contenu de cet article. Ils remercient également tous les membres de l'équipe AMIS.

Bibliographie

[1] R. Higuchi, B. Bowman, M. Freiberger, O.A. Ryder, A.C. Wilson, DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. Nature. 312, 282-284, 1984.

[2] A.J. Jeffreys, V. Wilson, S.L. Thein, Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Nature. 314, 67-73, 1985.

[3] T. Lindahl, Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature. 362, 709-715, 1993.

[4] P.F. Campos, O.E. Craig, G. Turner-Walker, E. Peacock, E. Willerslev, M.T. Gilbert, DNA in ancient bone – Where is it located and how should we extract it ? Annals of Anatomy. 194, 7-16, 2012.

[5] S. Amory, C. Keyser, E. Crubézy, B. Ludes, STR typing of ancient DNA extracted from hair shafts of Siberian mummies. Forensic Sciences International. 166, 218-229, 2007.

[6] F. Mendisco, C. Keyser, C. Hollard, V. Seldes, A.E. Nielsen, E. Crubézy, B. Ludes B, Application of the iPLEX™ Gold SNP genotyping method for the analysis of Amerindian ancient DNA samples. Electrophoresis. 32, 386-393, 2011.

[7] R. E. Green, J. Krause, A. W. Briggs, T. Maricic, U. Stenzel, M. Kircher, N. Patterson, H. Li, W. Zhai, M. H. Fritz, N. F. Hansen, E. Y. Durand, A. S. Malaspinas, J. D. Jensen, T. Marques-Bonet, C. Alkan, K. Prufer, M. Meyer, H. A. Burbano, J. M. Good, R. Schultz, A. Aximu-Petri, A. Butthof, B. Hober, B. Hoffner, M. Siegemund, A. Weihmann, C. Nusbaum, E. S. Lander, C. Russ, N. Novod, J. Affourtit, M. Egholm, C. Verna, P. Rudan, D. Brajkovic, Z. Kucan, I. Gusic, V. B. Doronichev, L. V. Golovanova, C. Lalueza-Fox, M. de la Rasilla, J. Fortea, A. Rosas, R. W. Schmitz, P. L. Johnson, E. E. Eichler, D. Falush, E. Birney, J. C. Mullikin, M. Slatkin, R. Nielsen, J. Kelso, M. Lachmann, D. Reich, S. Paabo, A draft sequence of the Neandertal genome. Science. 328, 710-722, 2010.

[8] M. Rasmussen, Y. Li, S. Lindgreen, J. S. Pedersen, A. Albrechtsen, I. Moltke, M. Metspalu, E. Metspalu, T. Kivisild, R. Gupta, M. Bertalan, K. Nielsen, M. T. Gilbert, Y. Wang, M. Raghavan, P. F. Campos, H. M. Kamp, A. S. Wilson, A. Gledhill, S. Tridico, M. Bunce, E. D. Lorenzen, J. Binladen, X. Guo, J. Zhao, X. Zhang, H. Zhang, Z. Li, M. Chen, L. Orlando, K. Kristiansen, M. Bak, N. Tommerup, C. Bendixen, T. L. Pierre, B. Gronnow, M. Meldgaard, C. Andreasen, S. A. Fedorova, L. P. Osipova, T. F. Higham, C. B. Ramsey, T. V. Hansen, F. C. Nielsen, M. H. Crawford, S. Brunak, T. Sicheritz-Ponten, R. Villems, R. Nielsen, A. Krogh, J. Wang, E. Willerslev, Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. Nature. 463, 757-762, 2010.

[9] D. Reich, R. E. Green, M. Kircher, J. Krause, N. Patterson, E. Y. Durand, B. Viola, A. W. Briggs, U. Stenzel, P. L. Johnson, T. Maricic, J. M. Good, T. Marques-Bonet, C. Alkan, Q. Fu, S. Mallick, H. Li, M. Meyer, E. E. Eichler, M. Stoneking, M. Richards, S. Talamo, M. V. Shunkov, A. P. Derevianko, J. J. Hublin, J. Kelso, M. Slatkin, S. Paabo, Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. Nature. 468, 1053-1060, 2010.

[10] A. Keller, A. Graefen, M. Ball, M. Matzas, V. Boisguerin, F. Maixner, P. Leidinger, C. Backes, R. Khairat, M. Forster, B. Stade, A. Franke, J. Mayer, J. Spangler, S. McLaughlin, M. Shah, C. Lee, T.T. Harkins, A. Sartori, A. Moreno-Estrada, B. Henn, M. Sikora, O. Semino, J. Chiaroni, S. Rootsi, N.M. Myres, V.M. Cabrera, P.A. Underhill, C.D. Bustamante, E.E. Vigl, M. Samadelli, G. Cipollini, J. Haas, H. Katus, B.D. O'Connor, M.R. Carlson, B. Meder, N. Blin, E. Meese, C.M. Pusch, A. Zink, New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing. Nature Communications. 3, 698, 2012.

[11] P. Skoglund, H. Malmstrom, M. Raghavan, J. Stora, P. Hall, E. Willerslev, M. T. Gilbert, A. Gotherstrom, M. Jakobsson, Origins and genetic legacy of Neolithic farmers and hunter-gatherers in Europe. Science. 336, 466-469, 2012.

[12] F.X. Ricaut, V. Auriol, N. von Cramon-Taubadel, C. Keyser, P. Murail, B. Ludes, E. Crubézy, Comparison between morphological and genetic data to estimate biological relationship : the case of the Egyin Gol Necropolis (Mongolia). American Journal of Physical Anthropology. 143, 355-364, 2010.

[13] C. Keyser-Tracqui, E. Crubézy, B. Ludes, Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol valley of Mongolia. American Journal of Human Genetics. 73, 247-260, 2003.

[14] C. Keyser-Tracqui, E. Crubézy, H. Pamzsav, T. Varga, B. Ludes, Population origins in Mongolia : genetic structure analysis of ancient and modern DNA. American Journal of Physical Anthropology. 131, 272-81, 2006.

[15] I. Clisson, C. Keyser, H.P. Francfort, E. Crubézy, K. Samashev, B. Ludes, Genetic analysis of human remains from a frozen kurgan in Kazakhstan (Berel site, 200-300 B.C.). International Journal of Legal Medicine. 116, 304-308, 2002.

[16] E. Crubézy, S. Amory, C. Keyser, C. Bouakaze, M. Bodner, M. Gibert, A. Röck, W. Parson, A. Alexeev, B. Ludes, Human evolution in Siberia : from frozen bodies to ancient DNA. BMC Evolutionary Biology. 10-25, 2010.

[17] C. Bouakaze, C. Keyser, E. Crubézy, D. Montagnon, B. Ludes, Pigment phenotype and biogeographical ancestry from ancient skeletal remains : inferences from multiplexed autosomal SNP analysis. International Journal of Legal Medicine. 123, 315-325, 2009.

[18] C. Keyser, C. Bouakaze, E. Crubézy, V.G. Nikolaev, D. Montagnon, T. Reis, B. Ludes, Ancient DNA provides new insights into the history of south Siberian Kurgan people. Human Genetics. 126, 395-410, 2009.

[19] M. Lacan, C. Keyser, F.X. Ricaut, N. Brucato, J. Tarrús, A. Bosch, J. Guilaine, E. Crubézy, B. Ludes, Ancient DNA suggests the leading role played by men in the Neolithic dissemination. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 108, 18255-18259, 2011.

[20] M. Lacan, C. Keyser, F.X. Ricaut, N. Brucato, F. Duranthon, J. Guilaine, E. Crubézy, B. Ludes, Ancient DNA reveals male diffusion through the Neolithic Mediterranean route. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 108, 9788-9791, 2011.

[21] C. Bouakaze, C. Keyser, A. Gonzalez, W. Sougakoff, N. Veziris, H. Dabernat, B. Jaulhac, B. Ludes, Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based single nucleotide polymorphism genotyping assay using iPLEX gold technology for identification of Mycobacterium tuberculosis complex species and lineages. Journal of Clinical Microbiology. 49, 3292-3299, 2011.

[22] H. Dabernat, C. Thèves, C. Bouakaze, D. Nikolaeva, C. Keyser, I. Mokrousov, A. Géraut, S. Duchesne, P. Gérard, A.N. Alexeev, E. Crubézy, B. Ludes, Tuberculosis epidemiology and selection in an autochthonous Siberian population from the 16th-19th century. Plos One. 9(2) :e89877, 2014.

[23] P. Biagini, C. Thèves, P. Balaresque *et al.*, Variola virus in a 30-year-old Siberian mummy. The New England Journal of Medicine, 367, 2057-2059, 2012.