

À Denisova, tous les vestiges d'hominidés sont minuscules

effet d'autant plus importante que les outils pouvant être associés à des périodes précises manquent dans les sites préhistoriques. Nous avons donc recherché un moyen systématique d'obtenir des chronologies fiables pour Denisova et d'autres sites.

En 2014, lors d'une réunion de l'équipe de Denisova, nous avons eu l'idée d'une nouvelle approche à même de donner une vision nuancée des échanges entre *H. sapiens*, Néandertaliens et Denisoviens. À Denisova, tous les vestiges humains sont minuscules: ils ne mesurent généralement que de 3 à 5 centimètres. Le morceau de phalange de la femme X, par exemple, avait la taille d'une lentille et pesait moins de 40 milligrammes! Beaucoup des vestiges osseux du site ont en effet été réduits en petits morceaux par les prédateurs tels que les hyènes, qui aiment mâchouiller des os quand elles allaitent.

Depuis 2008, plus de 135 000 ossements divers ont été mis au jour à Denisova, mais 95% d'entre eux sont trop fragmentaires pour être identifiés visuellement. En revanche, dans ces fragments, des macromolécules biologiques, dont de l'ADN, sont remarquablement

préservées, grâce aux températures négatives qui règnent toute l'année. De fait, les deux génomes complets les plus anciens jamais retrouvés proviennent tous deux de fossiles de Denisova.

D'où un défi essentiel: construire un crible capable d'identifier des fragments humains perdus dans un amas de milliers de petits os, comme une aiguille l'est dans une botte de foin. Y parvenir signifie aussi obtenir plus de nouvelles données génétiques et chronologiques, voire, comme cela est déjà arrivé, identifier une nouvelle espèce. C'est en menant ces réflexions que nous avons compris que la ZooMS était la bonne technique pour atteindre nos objectifs.

UNE TECHNIQUE D'ANALYSE DU COLLAGÈNE DES OS

La zooarchéologie par spectroscopie de masse pourrait aussi être nommée «prise de l'empreinte peptidique du collagène». Grâce à cette technique, les chercheurs peuvent identifier à partir des protéines d'un os le groupe taxonomique (la famille d'espèces) auquel appartient l'individu dont l'os provient. La taxonomie consiste en effet à classer les organismes vivants en «taxons», c'est-à-dire en groupes définis par une série de traits communs. L'un de ces traits est la composition du collagène.

Rappelons que les collagènes sont des protéines particulières, c'est-à-dire des macromolécules polypeptidiques (les peptides sont des polymères d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques), qui jouent dans les organismes animaux un important rôle structural. Le collagène des os, plus particulièrement, est constitué de centaines de peptides, qui varient légèrement >

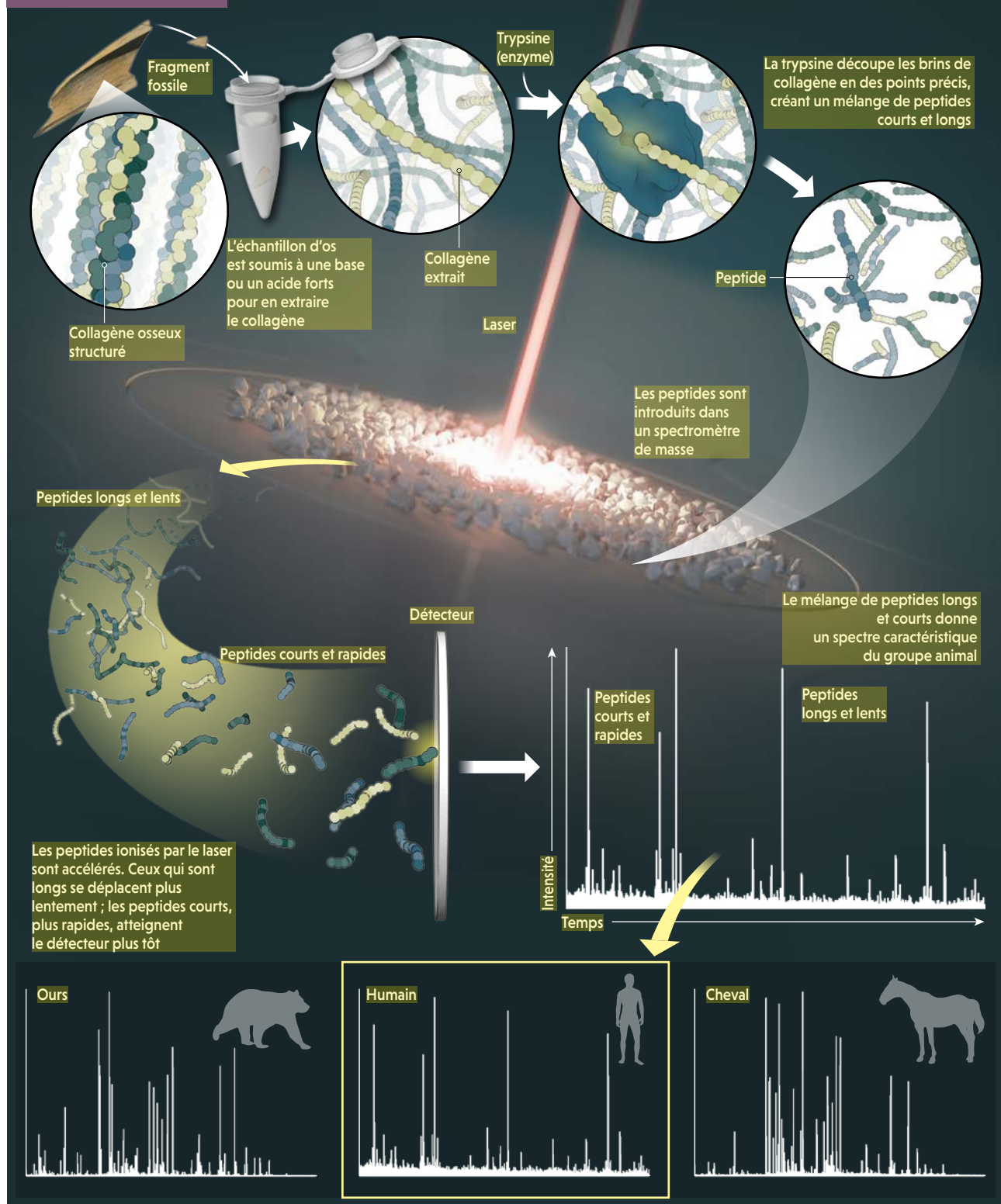


Les deux auteurs et des collègues étudient comment prélever au mieux des échantillons dans les strates de la grotte de Denisova, en vue de les analyser par ZooMS et de les dater par le radiocarbone.

MAIS À QUI APPARTIENT CET OS?

ZooMS assigne une famille zoologique ou un genre à un fragment osseux. La technique consiste à analyser le collagène osseux, un type de protéine qui, dans un os, se conserve longtemps. Une enzyme découpe le collagène en ses composants, les chaînes de peptides. Un laser

ionise ensuite les peptides, ce qui permet de les accélérer au sein d'un spectromètre de masse et de les détecter. La série constituée par les temps d'arrivée sur le détecteur des divers peptides, temps qui dépendent de leurs masses, caractérise le collagène et la famille animale dont il provient.



➤ d'une famille animale à l'autre. À chacune correspond donc une certaine signature peptidique du collagène osseux. En comparant la composition d'un collagène osseux à celles consignées dans une bibliothèque de compositions peptidiques associées à des animaux connus, il est donc possible d'assigner à un énigmatique fragment osseux une famille, un genre, voire une espèce.

La ZooMS a été mise au point par Michael Buckley, qui est aujourd'hui à l'université de Manchester, et par Matthew Collins, de l'université d'York. Au cours de la dernière décennie, cette technique a démontré son efficacité dans l'identification des os animaux trouvés dans les sites archéologiques. Elle est relativement bon marché, puisqu'elle coûte 5 à 10 dollars par échantillon. Elle a aussi l'avantage d'être peu destructive, puisque seulement de 10 à 20 milligrammes d'os par analyse sont nécessaires. Autre atout : sa rapidité – une seule personne peut traiter des centaines d'ossements par semaine.



Avec le fragment DC1227, les chercheurs ont enfin trouvé l'aiguille dans la botte de foin



En 2014, à notre connaissance, personne n'avait employé la ZooMS pour identifier des os humains. Étant donné que cette technique peut s'appliquer même à de tout petits fragments, nous pensions qu'il fallait essayer. À Denisova, comme nous l'avons indiqué, la préservation du collagène osseux et de l'ADN est sans égale. L'utilisation de la ZooMS sur ce site nous semblait donc prometteuse.

Nous savions toutefois que la méthode ne permet pas d'identifier l'espèce. En effet, les signatures peptidiques du collagène de l'espèce humaine actuelle et des grands singes se ressemblent trop. Toutefois, comme aucun grand singe ne vivait en Sibérie au Paléolithique, l'attribution d'un fragment osseux trouvé à Denisova à la famille des hominidés suffit à le déclarer humain.

Une fois le caractère humain d'un fragment établi, le séquençage et l'analyse de l'ADN qu'il contient devaient permettre d'identifier

l'espèce dont il provient. Lors de notre réunion de 2014 à Denisova, était présent Svante Pääbo, de l'institut Max-Planck d'anthropologie évolutionniste. Ce paléogénéticien est célèbre pour avoir lancé le projet *Génome de Néandertal*, qui a révélé non seulement le génome d'*Homo neanderthalensis*, mais aussi celui des Dénisoviens. Nous ne connaissions alors Svante Pääbo que de réputation, et nous voulions avoir son avis sur notre idée de trier des fragments osseux à l'aide de ZooMS, voire le convaincre de nous aider. Or il a décidé immédiatement de participer.

DES MILLIERS DE FRAGMENTS D'OS À ANALYSER

Nous avons aussi discuté de notre projet avec Anatoly Derevianko, de l'Académie russe des sciences, qui supervise le travail scientifique mené à Denisova, et avec Michael Shunkov, qui y dirige les fouilles. Tous deux se sont aussi déclarés intéressés. C'est ainsi que, dès 2014, nous avons pu commencer à échantillonner plusieurs milliers de petits fragments osseux fraîchement extraits d'une strate et censés être inexploitable (voir les photos page 56).

Le travail devait en principe pouvoir se faire vite. Dans la pratique, il était énorme, car il nous a fallu extraire soigneusement de chaque fragment une minuscule quantité de poudre d'os, sans rien toucher et en prenant d'énormes précautions afin de nous assurer que l'ADN ancien contenu dans l'échantillon ne serait pas contaminé par de l'ADN contemporain. Samantha Brown, l'une de nos étudiantes, s'est attelée à cette minutieuse tâche dans le cadre de son mémoire de master, en y consacrant d'innombrables heures au sein de notre laboratoire à l'université d'Oxford.

Le père de la ZooMS, Michael Buckley, nous a aussi aidés. Après avoir rassemblé 700 à 800 fragments osseux, Samantha Brown s'est rendue dans son laboratoire afin d'y préparer ces échantillons et de les analyser. Les résultats étaient intéressants : nous avions affaire à des os de mammouths, de hyènes, de chevaux, de rennes, de rhinocéros à poils laineux, bref à tout le bestiaire du film d'animation *L'Âge de glace* ; mais d'os d'hominidé, point !

Déçus, nous avons toutefois réessayé avec un deuxième lot de fragments. Un soir de l'été 2015, Michael Buckley nous écrivit : le fragment DC1227 portait la signature peptidique des hominidés. Nous avons enfin trouvé l'aiguille dans la botte de foin. Apparemment, notre idée folle s'était concrétisée !

Tôt le lendemain, nous allâmes rechercher DC1227 dans nos archives. Mauvaise surprise : sa taille de seulement 25 millimètres ne laissait pas beaucoup d'os à prélever pour la datation et le séquençage. Nous avons cependant gardé ➤

✓ espoir, l'ADN étant très bien conservé à Denisova. Avant que Samantha n'emporte le fragment DC1227 à Leipzig dans le laboratoire de Svante Pääbo pour extraction et analyse de l'ADN, nous avons photographié en haute résolution cet os, l'avons scanné aux rayons X et extrait des échantillons en vue de le dater et d'analyser sa composition isotopique.

Quelques semaines plus tard, les résultats de la datation sont arrivés : l'absence de tout carbone radioactif dans l'échantillon signifiait que ce petit bout d'os avait plus de 50000 ans. Puis nous avons appris de Svante Pääbo que son ADN mitochondrial – l'ADN contenu dans les mitochondries (des organites des cellules), qui est transmis par la mère – indiquait que la mère de l'individu était néandertalienne.

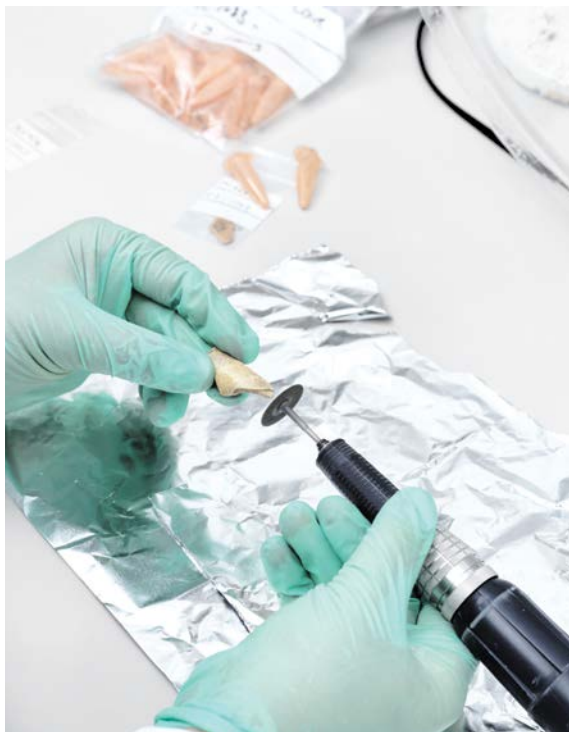
L'équipe de Svante Pääbo a aussitôt entrepris d'extraire de DC1227, appartenant à un individu que l'on a désormais dénommé « Denisova 11 » ou « Denny », de l'ADN nucléaire (ADN des noyaux des cellules). Pendant qu'elle se livrait à cette tentative hautement technique et délicate d'obtention de cet ADN tellement plus riche en informations que l'ADN mitochondrial, nous avons décidé de tester notre approche sur un autre site.

ZOO MS SUR LA GROTTÉ DE VINDIJA

La grotte de Vindija, en Croatie, est un site clé pour comprendre le sort des Néandertaliens tardifs en Europe. Les datations par le radiocarbone ont longtemps suggéré que certains d'entre eux étaient encore présents en Europe il y a quelque 30000 ans. Cela laissait donc ouverte la possibilité d'une très longue cohabitation entre *H. neanderthalensis* et *H. sapiens*, puisque ce dernier a pénétré en Europe il y a quelque 43000 ans. Une coexistence aussi longue suggérait que, plutôt que d'être acculés à l'extinction par les humains modernes, les Néandertaliens ont été assimilés au sein de leur population.

Pendant que nous réexaminions la chronologie de Vindija, nous avons pensé qu'il pourrait être intéressant d'étudier avec ZooMS les os non identifiés du site. Les recherches déjà menées sur les os les plus complets de Vindija avaient montré que 80 % d'entre eux provenaient d'ours des cavernes. Nous ne nous attendions donc pas à une faune aussi variée que celle de Denisova. C'est Cara Kubiak, une autre de nos étudiantes, qui a pris le projet en charge.

Le 28^e fragment des 383 que nous analysons nous fit la surprise de révéler une signature peptidique hominidée. L'étude paléogénétique que l'équipe de Svante Pääbo a ensuite menée a établi que le fragment correspondant appartenait à un Néandertalien. Curieusement, cet os d'environ 7 centimètres



À gauche : un échantillon de 20 milligrammes doit être prélevé dans chaque minuscule fragment, afin de pouvoir en établir la signature peptidique avec ZooMS. À droite : des échantillons sont en cours de préparation afin de les dater par le radiocarbone.

de long portait des entailles et d'autres traces d'intervention humaine. Les os néandertaliens présentent parfois ces marques, qui pourraient bien être des traces de boucherie, donc de cannibalisme.

Noté Vi-28, ce spécimen s'est révélé jouer un rôle majeur dans nos travaux chronologiques. Dans le passé, les archéologues et les préparateurs croates avaient traité les os de Vindija avec des produits conservateurs afin de les protéger. Malheureusement, cette pratique avait ajouté du carbone aux os, ce qui a rendu très difficile leur datation par le radiocarbone. Mais comme on le croyait non humain, Vi-28 n'avait pas été traité ainsi. Son âge exact pouvait donc être déterminé. La méthode du radiocarbone nous a ainsi indiqué que Vi-28 appartenait à un Néandertalien qui avait vécu il y a plus de 47000 ans.

Publiée en 2017 avec les dates obtenues pour d'autres Néandertaliens, cette découverte montre qu'*H. neanderthalensis* a disparu de Vindija il y a plus de 40000 ans, donc avant l'arrivée d'*H. sapiens* sur le site. Les précédentes datations, qui indiquaient 30000 ans, étaient donc fausses, à cause du carbone ajouté aux os par le traitement de conservation et qui n'avait pu être retiré correctement. ZooMS, une fois de plus, avait prouvé son utilité.

D'autres équipes ont aussi obtenu de très bons résultats avec ZooMS. En 2016, Frido Welker, aujourd'hui au Muséum d'histoire