Disponible en ligne sur www.sciencedirect.com
ScienceDirect
C. R. Palevol 7 (2008) 81–90
COMPTES RENDUS PALEVOL
http://france.elsevier.com/direct/PALEVO/

La paléogénétique en paléontologie, archéologie et paléoanthropologie : apports et limites

Palaeogenetics in palaeontology, archaeology and palaeoanthropology: Contributions and limits

Avant-propos

1. Contexte, objectifs et composition du dossier

Parmi les molécules organiques susceptibles d'être conservées dans les restes botaniques, zoologiques et humains issus des fouilles archéologiques ou paléontologiques, les acides nucléiques (notamment l'ADN ancien, ADNa) offrent la perspective de livrer des informations de nature génétique. Elles contribuent à la phylogénie et à l'évolution moléculaire de taxons récemment éteints, à la dynamique des populations animales, végétales (phylogéographie, translocation d'espèces, domestication, commensalisme et parasitisme), humaines (migration, sélection, dérive, maladies génétiques) ou microbiennes (grandes épidémies) [7]. En l'état actuel des connaissances, elles concernent les derniers siècles ou millénaires, c'est-à-dire les 150 000 à 500 000 dernières années. L'outil moléculaire peut également être appliqué avec profit à des collections d'histoire naturelle (végétaux, os, poils, plumes, peaux...). En complément des approches morphologiques et de morphométrie géométrique habituellement utilisées en paléontologie, paléoanthropologie, archéobotanique et archéozoologie, la paléogénétique constitue, sur le long terme, un nouvel outil puissant et particulièrement prometteur.

Cependant, la réussite de telles recherches est largement conditionnée par l'obligation d'obtenir, au cas par cas, une validation chronologique et biomoléculaire des données obtenues. Or, cette validation est encore loin de relever de la routine.

Comme le décrit M. Hofreiter dans ce numéro thématique [5], les développements techniques relatifs à la paléogénétique n'en sont qu'à leurs débuts. Ils requièrent une forte interaction interdisciplinaire entre sciences de la vie, sciences de la terre et sciences de l'homme (notam-

Foreword

1. Context, objectives and composition of the dossier

Among the organic molecules capable of being preserved in botanical, zoological and human remains from archaeological or palaeontological excavations, nucleic acids (in particular ancient DNA, aDNA) offer the prospect to deliver information of a genetic nature. Information pertains to the phylogeny and the molecular evolution of recently extinct taxa, and to the dynamics of animal populations, plants (phylogeography, translocation of species, domestication, commensalism, and parasitism), humans (migration, selection, drift, genetic diseases) or microbial populations (great epidemics) [7]. According to the current knowledge, they concern only recent centuries or millennia, that is to say the last 150 000 to 500 000 years. The molecular tool can also be profitably applied to natural history collections (bone, hairs, feathers, skins...). Palaeogenetics constitutes, in the long term, a powerful and particularly promising new tool, which will complement the morphological and morphometric geometrics approaches usually used in palaeontology, palaeoanthropology, archaeobotany, and archaeozoology. The success of such research, however, is largely conditioned by the obligation to obtain, case by case, a chronological and biomolecular validation of the data obtained, a validation that is still far from being routine.

As described by M. Hofreiter in this issue [5], technical developments relative to palaeogenetics are only at their beginning. They require a strong, interdisciplinary interaction between Life Sciences, Earth Sciences and Social Sciences (in particular anthropology and archaeology), focussed around projects where the contribution

ment l'anthropologie et l'archéologie), groupées autour de projets où la part d'expérimentation est nécessairement importante. Cette collaboration entre disciplines s'exerce de la même manière autour des fouilles ou des collections de musées, ainsi que des plateaux techniques ou des plates-formes de biologie moléculaire spécialisées en paléogénétique.

La communauté française, très dynamique sur le plan international dès le début des années 1990, a récemment fourni un gros effort de structuration et de concertation, validé et encouragé par les départements « Environnement et développement durable », « sciences humaines et sociales » et « sciences de la vie » du CNRS, ainsi que par le Muséum national d'histoire naturelle et plusieurs universités. Ce mouvement a été concrétisé en 2005 par la création d'un réseau thématique pluridisciplinaire du CNRS (RTP « Paléogénétique de l'Homme et son environnement », animé par les signataires de cette introduction et P. Taberlet), ainsi que par le financement d'une plate-forme méthodologique (École normale supérieure de Lyon) et de plusieurs plateaux techniques. Un « livre blanc » sur la situation de la paléogénétique en France a été élaboré par le RTP à la fin 2007, à l'attention des directions scientifiques du CNRS. Il présente un état des lieux de la communauté, de ses forces et de ses faiblesses, et débouche sur plusieurs recommandations à l'adresse des départements scientifiques du CNRS concernés, mais aussi, de façon plus générale, de toutes les tutelles susceptibles de soutenir cette communauté éminemment pluridisciplinaire.

C'est dans ce contexte que l'Académie des sciences a sollicité l'un de nous (J.-D. V.) pour rassembler les éléments d'un dossier scientifique sur la paléogénétique. Ce dossier vise à établir un état des lieux principalement méthodologique de la paléogénétique, à l'attention des scientifiques qui ne seraient pas directement impliqués dans sa pratique ou n'auraient pas suivi ses évolutions récentes. Il le fait à travers sept articles n'ayant pas vocation à décrire de façon exhaustive ce vaste champ technique, disciplinaire et thématique, mais plutôt à offrir au lecteur des éclairages complémentaires.

Les deux premiers articles, signés par R. Bollongino (CNRS, Muséum national d'histoire naturelle et université de Mayence, Allemagne) et al. [1], puis par E.-M. Geigl (Institut J. Monod, universités Paris-6 et Paris-7, CNRS, France) [3], offrent des points de vue complémentaires sur la question centrale de la conservation de l'ADN dans différents environnements, et sur les techniques à mettre en œuvre pour améliorer les taux de réussite des analyses paléogénétiques. Les auteurs des deux articles s'appuient sur leur expérience de l'analyse

of experimentation is necessarily important. In the same way, this interdisciplinary collaboration also applies to excavations or museum collections, organised around technical facilities or molecular biology platforms specialized in palaeogenetics.

The French community, very dynamic at the international level as early as the start of the 1990s, has recently made a large effort of organising itself and having a dialogue among its members, validated and encouraged by the departments 'Environnement et développement durable', 'Sciences humaines et sociales', and 'Sciences de la Vie' of the French CNRS, and also by the 'Muséum national d'histoire naturelle', Paris, and several universities. This has been rewarded by the creation of a multidisciplinary thematic network of the CNRS (RTP 'Paléogénétique de l'Homme et son environnement', led by the authors of this introduction plus P. Taberlet), and by the financing of a methodological platform ('École normale supérieure de Lyon') and of several technical facilities. A final report on the state of palaeogenetics in France was produced by this network at the end of 2007 for the attention of the scientific departments of the CNRS. It presents the current state of the community, its strengths and weaknesses, and proposes several recommendations that are specifically addressed to the CNRS' scientific departments concerned, but also, in a more general way, presents guidance likely to support this particularly multidisciplinary community.

It is in this context that the French Academy of Sciences requested one of us (J.-D. V.) to assemble the elements of a scientific file on palaeogenetics. This file primarily aims at providing a picture of the current state of palaeogenetic methodology, for scientists who are not directly involved in this practice or would not have followed its recent developments. This is undertaken via seven articles that are not intended to describe these vast technical, disciplinary and thematic fields in an exhaustive way, but rather to offer the reader complementary views.

The first two articles, written by R. Bollongino (CNRS, 'Muséum national d'histoire naturelle' and Mainz University, Germany) et al. [1] and by E.-M. Geigl ('Institut Jacques-Monod', Paris-6 and Paris-7 Universities, CNRS, France) [3], present complementary points of view on the central question of the conservation of DNA in different environments, and on the techniques that can be used to best improve the success of palaeogenetic analyses. These articles are based on research by the authors into archaeological bovid bones from Europe and the Near East, aimed at understanding the processes of domestication and diffusion of domestic

des ossements archéologiques de bovidés d'Europe et du Proche-Orient, dans le but de comprendre les processus de domestication et de diffusion des lignées domestiques. R. Bollongino et al. [1] s'attachent aux conditions de gisement, de fouille et de premier traitement des vestiges qui en sont issus, en prenant le parti du terrain et en cherchant à dégager des recommandations utiles pour les fouilleurs, qu'ils soient paléontologues ou archéologues. E.-M. Geigl [3] approfondit ce même débat de son point de vue de spécialiste de la biologie moléculaire, en proposant des pistes technologiques à même de surmonter les difficultés évoquées dans le premier article. Elle propose notamment des procédures pour un meilleur contrôle des contaminations modernes et des techniques permettant d'obtenir des séquences d'ADN ancien dans les contextes où il est particulièrement mal et rarement conservé.

L'article signé par M. Hofreiter (MPI for Evolutionary Anthropology, Leipzig, Allemagne) [5], coauteur du récent séquençage du génome de l'ours des cavernes, explore le passé, le présent et l'avenir de la paléogénétique. Il propose une histoire critique des plus importants succès (et échecs) de la paléogénétique depuis les années 1980. Il met à la portée des non-spécialistes un tableau très stimulant des récentes innovations technologiques qui permettront demain, peut-être, d'accéder à une « paléogénomique » des espèces ou des populations anciennes.

L'article signé par C. Tougard et E. Renvoisé (CNRS, université de Dijon, France) [10] illustre les espoirs et les difficultés de la paléogénétique à partir de l'étude du cas des rongeurs. Ces auteurs nous offrent un état des lieux original et très documenté sur l'application des méthodes de l'ADN ancien à ce vaste groupe de mammifères. Ce dernier article témoigne de la place que la paléogénétique est amenée à jouer en phylochronologie, comme dans les sciences de l'évolution.

Ces quatre articles sont suivis de deux autres, signés par B. Gomez (université de Lyon) et al. [4], et par C. N. Trueman (université de Southampton, Royaume-Uni) et al. [11]. Ils ne traitent pas directement de paléogénétique, mais offrent une illustration des possibilités de conservation de la matière organique sur le temps long. Le premier exploite la riche information paléobotanique contenue dans une litière végétale cénomanienne. Certes, il y a très peu de chances pour qu'un jour, on puisse extraire de l'ADN ancien de tels fossiles [7]. Mais il est bon de garder en tête que les capacités informatives des témoins fossiles sont sans cesse accrues par les progrès techniques, et que ce qui reste inaccessible aujourd'hui pourra peut-être ne plus l'être demain. C'est ce qu'illustre très positive-

lineages. R. Bollongino et al. underline the importance of the conditions of the deposit, the excavation and the initial treatment of the remains, from the perspective of the actual fieldwork. They also seek to outline useful recommendations for excavators, for palaeontologists as well as archaeologists. E.-M. Geigl explores further the same debate from her perspective of molecular biology, by proposing technological strategies to overcome the same difficulties evoked in the first article. In particular, she proposes protocols for better controlling modern contaminations and also new techniques aiming at obtaining ancient DNA sequences in contexts where it is particularly badly and rarely preserved.

The article authored by M. Hofreiter (MPI for Evolutionary Anthropology, Leipzig, Germany) [5], co-author of the recent sequencing of the cave bear genome, explores the past, present and future of palaeogenetics. He proposes a critical history of the most important successes (and failures) of palaeogenetics since the 1980s, and puts at the reach of non-specialists a very stimulating presentation of recent technological innovations, which will make it possible in the future, perhaps, to achieve a 'palaeogenomics' of past species or populations.

The article authored by C. Tougard and E. Renvoisé (CNRS, University of Dijon, France) [10] illustrates the hopes and difficulties of palaeogenetics through the case of the study of rodents. These authors offer a novel and detailed picture of the current state of the application of ancient DNA methods to this vast group of mammals. This last article testifies to the part that palaeogenetics is able to contribute to phylochronology as well as to the knowledge of evolution.

These four articles are followed by two other ones, authored by B. Gomez (University of Lyons, France) et al. [4], and by Clive N. Trueman (University of Southampton, UK) et al. [11]. They do not directly deal with palaeogenetics, but rather offer an illustration of the possibilities of the long-term preservation of organic matter. The first one draws on the rich palaeobotanical information from a Cenomanian plant litter. Of course, there is little chance of ever extracting any ancient DNA from such fossils [7], but it is necessary to keep in mind that the potential information from fossil remains is constantly increasing due to technical improvements, and that what is out of reach today may not be any more tomorrow. The article of C.N. Trueman et al. [11] illustrates this point in a very positive way, demonstrating that thorough analytical approach of diagenesis may yet bring nice surprise, including in the field of palaeogenetics.

ment l'article de C.N. Trueman et al. [11], en montrant qu'une approche analytique approfondie de la diagénèse pourrait bien, à l'avenir, nous apporter d'agréables surprises, y compris dans le domaine de la paléogénétique.

Enfin, l'article signé par Mary H. Schweitzer (université de l'État de Caroline du Nord, États-Unis) et al. [9] offre une revue critique et très documentée des techniques modernes d'évaluation de l'état diagénétique des ossements fossiles et de celui de la conservation de leur matière organique, ainsi qu'une série de voies de recherches technologiques nouvelles. Avec une tempérance très réaliste, il donne aussi l'espoir de repousser les limites des approches paléomoléculaires (y compris paléogénétiques) vers des périodes anciennes.

2. Champs d'application de la paléogénétique aux différentes échelles biologiques

Les domaines scientifiques concernés par la paléogénétique se déclinent selon différents niveaux d'intégration biologique, des communautés d'êtres vivants aux populations, et de la population à l'individu.

2.1. Au niveau des peuplements ou des communautés (relations interspécifiques)

L'analyse des séquences d'ADNa qui évoluent selon un rythme de mutation lent (gènes mitochondriaux tels que le cytochrome *b* ou l'ARNr 12S) contribue à situer des taxons éteints par rapport à ceux dont on connaît les caractéristiques génétiques. La paléogénétique constitue ainsi un outil efficace pour intégrer les taxons récemment éteints (par exemple, les faunes insulaires disparues à la suite de l'intervention humaine holocène) dans la phylogénie des autres organismes. Elle peut contribuer à comprendre comment se sont mises en place les vagues de peuplements quaternaires successives, y compris les plus récentes. C'est aussi un outil de détermination taxinomique pour les restes fossiles ou subfossiles fragmentés, notamment pour les taxons jumeaux, indissociables sur des critères morphologiques. Les recherches en paléogénétique à cette échelle d'intégration interspécifique peuvent se développer avec une relative facilité, car l'analyse des séquences d'ADN mitochondrial, plus abondantes et plus faciles à amplifier que l'ADN nucléaire, se révèlent souvent être suffisantes. Il n'est cependant pas toujours possible d'obtenir des arbres phylogéniques robustes sur la base des seules séquences mitochondriales. C'est pourquoi, de plus en plus, les techniques moléculaires s'orientent également vers l'étude de l'ADN nucléaire.

Lastly, the article co-authored by Mary H. Schweitzer (North Carolina State University, USA) and collaborators [9] offers a critical and very documented review of modern techniques used for evaluating both the diagenetic state of fossil bones and teeth and the preservation state of organic matter in them, together with a series of new technological researches paths. With a very realistic temperance, it also gives hopes for pushing back in times the limits of palaeomolecular approaches (including palaeogenetics).

2. Fields of application of palaeogenetics on different biological scales

The scientific fields concerned with palaeogenetics are organised according to different levels of biological integration, from living communities to the population, and from the population to the individual.

2.1. At the level of communities (relations between species)

The analysis of aDNA sequences that evolve at slow mutation rates (mitochondrial genes such as cytochrome *b* or rARN 12S) contributes to the position of extinct taxa by relating them to those for which we know the genetic characteristics. In this way, palaeogenetics constitutes an effective tool for integrating recently extinct taxa (e.g., the island faunas that disappeared following the Holocene human intervention) in relation to the phylogeny of other organisms. It can contribute to our understanding of the successive waves of Quaternary populations, including the most recent ones. It is also a tool for determining the taxonomic identification of fossil or sub-fossil fragmented remains, especially for twin species that cannot be separated on morphological criteria. Palaeogenetic research at this scale of interspecific integration can be easily developed because the analysis of mitochondrial DNA sequences often shows to be sufficient, as they are more abundant and easier to amplify than those of nuclear DNA. It is, however, not always possible to obtain robust phylogenetic trees on the basis of mitochondrial sequences alone. This is why, more and more, molecular techniques are also directed at the study of nuclear DNA.

2.2. At the level of taxa (relations between populations)

Other mitochondrial tracers mutating at a faster rate (e.g., D-loop), and indeed, more recently, nuclear tracers

2.2. Au niveau des taxons (relations interpopulationnelles)

D'autres traceurs mitochondriaux à plus fort taux de mutation (D-loop, par exemple), voire même, depuis peu, des traceurs nucléaires (microsatellites, SNPs) peuvent ou pourront être utilisés à l'échelle intraspécifique. Ils permettent de compléter les approches morphologiques ou de génétique des populations actuelles utilisées dans les études phylogéographiques, et de tester divers scénarios évolutifs. En particulier, à l'échelle intra-spécifique, où l'horloge moléculaire trouve ses limites, les données de la paléogénétique permettent d'accéder de façon fine et appropriée à la datation des divergences de clades. Ces approches trouvent des applications particulièrement pertinentes dans les études phylogéographiques de la reconquête post-glaciaire des aires septentrionales des continents de l'hémisphère nord, dont la dynamique a contribué à structurer les biodiversités actuelles. Elles peuvent aussi concerner la mise en place des peuplements anthropogènes (populations commensales, insulaires, urbaines ou périurbaines) ou l'origine biologique et la diversité des plantes et des animaux domestiques (identification des populations à l'origine des cultivars ou des animaux domestiques, introgressions génétiques de lignées domestiques déplacées dans les populations sauvages locales…). C'est à cette échelle aussi que la paléogénétique permet de déceler et de reconstituer les déplacements anciens, climatiques ou anthropogènes (transferts), de plantes ou d'animaux, sauvages, domestiques ou marronnés, que la plupart des outils morphologiques sont impuissants à documenter. Elle est donc appelée à jouer un rôle important dans la connaissance des processus invasifs anciens ou plus récents. Les migrations humaines anciennes peuvent être documentées de la même manière, avec toutefois des difficultés techniques accrues, inhérentes au contrôle et au traçage des contaminations par les ADN modernes. Des développements sont aussi en cours dans le domaine paléo-épidémiologique (notamment avec les pathogènes humains : tryponématomes, mycobactéries, Rickettsies, malaria, HIV), avec des retombées d'ordre fondamental (co-évolution entre pathogène et hôte potentiel) ou appliqué (histoire des pandémies).

2.3. À l'échelle des populations (relations interindividuelles)

L'application des méthodes de la paléogénétique aux grandes séries d'individus disponibles dans les collections des musées ou aux assemblages paléonto-

(microsatellites, SNPs), are increasingly being used on an intraspecific scale in order to supplement the current morphological or population genetics approaches that are used in phylogeographical studies that aim at testing various evolutionary scenarios. In particular, at the intraspecific scale, where we reach the analytical limits of the molecular clock, the palaeogenetic data allows the divergence of clades to be dated in a refined and appropriate way. These approaches find particularly appropriate applications in the study of phylogeography of the postglacial reconquest of northern areas of continents in the northern hemisphere, which contributes to the composition of existing biodiversity. They can also relate to the establishment of anthropogenic populations (commensal, island, urban or peri-urban populations) or of the biological origin and diversity of domestic plants and animals (identification of populations at the origin of cultivars or domestic animals, genetic introgressions of domestic lineages into local wild populations…). It is at this scale also that palaeogenetics makes it possible to detect and reconstitute ancient movements, climatic or anthropogenic (transfers), of plants or wild, domestic or feral animals, that the majority of morphological tools are powerless to document. It thus has an important contribution to make to our knowledge of ancient or more recent invasive processes. Ancient human migrations can be documented in the same way, however with increased technical difficulties due to the control and tracing of modern DNA contamination. Developments are also in hand in the field of palaeoepidemiology (in particular for human pathogens: treponemal diseases, mycobacteria, Rickettsial diseases, malaria, HIV), with repercussions of either a fundamental (co-evolution between pathogen and potential host) or applied (history of pandemics) nature.

2.3. At the level of populations (relations between individuals)

The application of palaeogenetic methods to the large series of individuals available in museum collections or palaeontological or archaeological assemblages of recent historical periods, which are better preserved, allows the analysis of the genetic diversity of extinct populations. It can therefore shed light on their demographic history (founder effects, bottlenecks…). This type of study can also utilise genetic markers that are relatively easy to deal with, which are those of mitochondrial DNA. Other interindividual approaches are possible only by using nuclear markers, and despite their unquestionable interest these techniques remained

logiques ou archéologiques des périodes historiques récentes, mieux conservées, permet d'approcher la diversité génétique de populations éteintes. Elle offre donc un éclairage sur leur histoire démographique (effet de fondation, goulots d'étranglement...). Ce type d'études peut aussi s'appuyer sur les marqueurs génétiques, relativement faciles à traiter, que sont ceux de l'ADN mitochondrial. D'autres approches interindividuelles ne sont envisageables qu'en utilisant des marqueurs nucléaires, et bien que d'un intérêt certain, elles sont, pour cette raison, longtemps restées d'ordre expérimental. Ce n'est que tout récemment, que le progrès des techniques (pyroséquençage, notamment ; voir l'article de M. Hofreiter [5], ce numéro) a permis leur plus large développement. C'est le cas de la détermination des *sex ratios*, des liens de parenté entre individus, des maladies génétiques, tant en ce qui concerne les humains que les plantes et les animaux.

3. Difficultés méthodologiques

Les espoirs que la communauté internationale avait fondés sur l'ADN ancien au début des années 1990 ont dû être considérablement revus à la baisse, dès le milieu de cette même décennie. L'état de fragmentation et de dégradation des molécules anciennes, la présence fréquente d'inhibiteurs et surtout les risques majeurs de contamination par des molécules modernes non dégradées et la difficulté qu'on éprouve pour authentifier sans ambiguïté les séquences anciennes, notamment (mais pas seulement) pour *Homo sapiens*, incitent désormais à une très grande prudence. L'extraction, l'amplification et l'analyse de séquences de l'ADN ancien impliquent de disposer de compétences, d'équipement et de locaux spécialisés, différents de ceux qui sont mis en jeu pour les autres travaux de biologie moléculaire.

De l'avis de tous les spécialistes, finalement peu nombreux de par le monde, la paléogénétique n'en est qu'à ses débuts. En particulier, on sait encore peu de choses sur les processus de dégradation de la molécule *post mortem*, sur son évolution dans différents contextes d'enfouissement ou de conservation en collection d'histoire naturelle, sur son état physicochimique dans les restes fossiles plus ou moins anciens (voir l'article d'E.-M. Geigl [3], ce numéro). Il est donc nécessaire d'encourager les recherches méthodologiques, en particulier celles qui s'appuient sur une démarche expérimentale construite autour de fouilles archéologiques ou paléontologiques (voir l'article de R. Bollongino et al. [1], ce numéro), de grandes collections d'histoire naturelle

experimental for some time. It is only very recently that technical progress (pyrosequencing, in particular; see the article by M. Hofreiter [5], this issue) allowed their broader development. These approaches involve the determination of sex-ratios, family ties between individuals, and genetic diseases, in regard to humans as well as plants and animals.

3. Methodological difficulties

The hopes that the international community cherished at the start of the 1990s for ancient DNA research had to be considerably re-examined by the middle of the same decade. The state of fragmentation and degradation of ancient molecules, the frequent presence of inhibitors, and above all the major risks of contamination by undegraded modern molecules and the difficulty of authenticating ancient sequences without any doubt have all encouraged considerable caution. This is particularly the case for analyses of *Homo sapiens*, but is also true for some other taxa. The extraction, amplification and analysis of ancient DNA sequences require skills, equipment and specialized buildings, different from those that are used for other molecular biology work.

It is the shared opinion of the small number of specialists working in this field throughout the world that palaeogenetics is still only in its infancy. In particular, we still know very little about the degradation processes of molecules after death, about the changes they undergo in different burial environments or of preservation in natural history collections, and on their physicochemical state in fossil remains of different ages (see the article by E.-M. Geigl [3], this issue). It is therefore necessary to encourage methodological research, in particular that which supports experimental processes built around archaeological or palaeontological excavations (see the article by R. Bollongino et al. [1], this issue), large natural history collections, and physicochemical or molecular biological equipment.

However, in spite of the hopes raised, palaeogenetics remains a very risky practice in terms of successful results. Results are rare and their validation is always difficult. This difficulty (like the costs that are involved) makes it necessary:

- to correctly address pertinent scientific problems,
- to use appropriate molecular techniques,
- to select very carefully appropriate samples for analysis, which requires a thorough and critical knowledge of chronostratigraphic and environmental contexts,

relle ou d'équipements d'analyse physicochimique ou de biologie moléculaire.

Malgré les espoirs quelle suscite, la paléogénétique reste d'une pratique très risquée. Les résultats sont rares et leur validation est toujours difficile. Cette difficulté (comme le coût qui en découle) rend plus impérieuse encore :

- la nécessité de poser correctement les problématiques,
- d'utiliser les bons outils moléculaires,
- de choisir les échantillons de travail avec un soin tout particulier, qui implique une connaissance approfondie et critique des contextes chronostratigraphiques et environnementaux,
- de traiter et modéliser les jeux de données à l'aide d'outils statistiques adaptés à leurs caractéristiques spécifiques, qui diffèrent de celles des données génétiques habituelles.

La pratique de la paléogénétique implique donc une étroite collaboration, à toutes les étapes de la recherche, entre les spécialistes de biologie moléculaire, les paléontologues, anthropologues, archéologues et bioarchéologues, et les scientifiques compétents dans le domaine de la génétique des populations. La paléogénétique est donc nécessairement pluridisciplinaire, et ne peut être valablement pratiquée que dans le cadre de collaborations réunissant toutes ces compétences.

4. Charte de qualité pour l'exercice de la paléogénétique

On l'aura compris, la paléogénétique est un domaine de recherche très nouveau et nécessairement pluridisciplinaire. Elle est donc en quête de standards de fonctionnement destinés à assurer sa stabilité et sa reconnaissance scientifiques. C'est en ce sens que, depuis les années 1990, plusieurs auteurs ont édicté des recommandations méthodologiques, recommandations qui connaissent des ajustements réguliers [2,6,8].

Les scientifiques de la communauté française réunis au sein du RTP « Paléogénétique de l'homme et de son environnement » viennent d'édicter onze recommandations, dont l'originalité principale est de mettre l'accent sur les pratiques interdisciplinaires, jusqu'à présent négligées par les tentatives du même genre :

1) admettre que l'état de fragmentation et de dégradation des molécules anciennes, la présence fréquente d'inhibiteurs et surtout les risques majeurs de contamination et l'absence de méthode infaillible, ne permettent que rarement d'authentifier sans ambiguïté les séquences anciennes, notamment (mais pas

- to treat and to model the data files using statistical tools adapted to their specific characteristics, which are different from those of the usual genetic data.

The practice of palaeogenetics therefore demands close collaborations, at all stages of the research, between specialists in molecular biology, palaeontology, anthropology, archaeology, and bioarcheology, as well as qualified scientists in the field of population genetics. Palaeogenetics is therefore necessarily multidisciplinary, and cannot be validly practised without collaborations that join together all these skills.

4. Quality charter for practice of palaeogenetics

As outlined above, palaeogenetics is a very new and necessarily multidisciplinary field of research. It is therefore in search of working standards required to ensure its stability and its scientific recognition. It is in this sense that, since the 1990s, many authors have called for methodological recommendations, which have been regularly updated [2,6,8].

The scientists of the French community assembled within the RTP 'Paléogénétique de l'Homme et de son environnement' made eleven recommendations, whose principal originality is to stress interdisciplinary practices, which until now have been neglected by similar endeavours:

1) to admit that the state of fragmentation and of degradation of ancient molecules, the presence of inhibitors, and above all the major risks of contamination and the absence of infallible method only rarely allow us to authenticate ancient sequences without ambiguity, in particular (but not just) for *Homo sapiens*. To accept that, this must encourage considerable prudence;
2) to develop research methodologies that allow us to control better (even to correct) the processes of degradation and contamination – this research also needs to be subject to the same requirements of authenticity as the others (which is often not the case) –, and also to develop technical ways different from amplifying by PCR DNA fragments of the soluble components of bone or tooth;
3) to develop research on animals, plants and parasites that is capable of documenting the history of man. Although such research is in its nature indirect, compared to the greater risks involved with research into *Homo sapiens* fossil sequences, it carries less technical difficulties and thus more reliability;

seulement) pour *Homo sapiens*, ce qui incite à une très grande prudence ;
2) développer des recherches méthodologiques permettant de mieux maîtriser (voire de corriger) les processus de dégradation et de contamination – ces recherches devant bien sûr être soumises aux mêmes exigences d'authenticité que les autres (ce qui n'est souvent pas le cas) –, et développer d'autres voies techniques que l'amplification par PCR des fragments d'ADN de la phase soluble de l'os ou de la dent ;
3) en parallèle aux recherches à haut risque qui portent sur les séquences fossiles d'*Homo sapiens*, développer des recherches sur les animaux, les végétaux et les parasites qui sont susceptibles de documenter l'histoire de l'homme, indirectement, mais avec moins de difficultés techniques, et donc davantage de fiabilité ;
4) instaurer l'application, par la communauté scientifique des domaines concernés, d'un certain nombre de précautions d'échantillonnage ;
5) mettre en œuvre tous les dispositifs à même d'accroître la validité des séquences publiées et de les livrer accompagnées d'un indice de qualité ; plusieurs listes non limitatives et évolutives de critères d'authenticité existent. Ces critères doivent impérativement être pris en compte ;
6) informer les utilisateurs, notamment les paléontologues, archéologues et paléoanthropologues, afin, entre autres, d'éviter que des séquences qui ne présentent pas les critères d'authenticité requis soient publiées dans des revues dont les comités de lecture et les lecteurs ne sont pas spécialistes de biologie moléculaire, telles que les revues d'archéologie ou de paléontologie ; il convient aussi d'informer largement les laboratoires de biologie moléculaire non spécialistes de l'ADN ancien, qui, parfois, se lancent dans cette recherche sans précautions ;
7) accepter le risque (et le coût) de traiter un grand nombre d'échantillons pour n'avoir qu'un faible taux de succès, lorsque les problématiques sont scientifiquement pertinentes (par exemple, les débuts de la domestication au Proche-Orient, où l'ADN en général est mal conservé) ;
8) raisonner en termes de collaboration égalitaire, et ce, tant au niveau des relations entre laboratoires qu'entre départements scientifiques. En effet, les contraintes techniques liées à l'ADN ancien interdisent d'envisager que les laboratoires producteurs de séquences soient de simples prestataires de ser-

4) to introduce the application, by the scientific community of the fields concerned, of a certain number of sampling precautions;
5) to implement all the devices to increase the validity of published sequences and to deliver them along with an index of quality. Several non-restrictive and developing (i.e. which can be completed and which can evolve) lists of criteria of authenticity already exist. It is imperative that these criteria be taken into account;
6) to inform the users, in particular palaeontologists, archaeologists and palaeoanthropologists, among others, that it is necessary to avoid publishing sequences that do not satisfy the criteria of authenticity in journals where reviewers and readers are not specialists in molecular biology (such as archaeology or palaeontology journals). It is thus also advisable to inform molecular biology laboratories that are not specialists in ancient DNA, which sometimes launch out in this research without precaution;
7) when addressing pertinent scientific problems, to accept the risk (and the cost) of treating a large number of samples that will only have a poor success rate (e.g., research into the beginnings of domestication in the Near East, where DNA is generally badly preserved);
8) to think in terms of equality in collaboration; in fact, the technical constraints related to ancient DNA prohibit the notion that the laboratories that produce sequences are simply service providers in relation to the laboratories users. In the same way, the search for reliability of sampling and quality of interpretation of the results excludes the latter as simply providers of samples or historical scenarios. This applies to the level of relationships between laboratories, as well as that of relationships between institutions or disciplines;
9) to make the molecular biologist conform to the practices of archaeology, from the point of view of his research contribution as well as of his behaviour in the scientific community. From the moment when the molecular biology specialist works on molecules originating from archaeological remains, he is involved in an archaeological approach, in the same way as any contributing specialist in archaeology, whether he is a sedimentologist, an archaeozoologist, or a radiocarbon dating specialist. The object he studies comes from an archaeological excavation and its conservation and its significance are controlled by the mechanisms of formation and pre-

vice vis-à-vis des laboratoires utilisateurs. De même, la recherche de fiabilité dans l'échantillonnage et de qualité dans l'interprétation des résultats exclut que ces derniers jouent un rôle de simples pourvoyeurs d'échantillons ou de scénarios ;

9) faire adopter au spécialiste en biologie moléculaire, à partir du moment où il travaille sur des molécules issues de restes archéologiques, une démarche d'archéologue, au même titre que n'importe quel spécialiste intervenant en archéologie, qu'il soit sédimentologue, archéozoologue ou « dateur ». En effet, l'objet qu'il étudie est issu d'une fouille archéologique, et sa conservation ainsi que sa signification sont régies par les mécanismes de la formation et de la conservation des sites et objets archéologiques ; son utilisation est soumise aux réglementations et lois relatives aux objets archéologiques, en vigueur dans le pays concerné. Il doit, de ce fait, se conformer aux pratiques de l'archéologie, tant du point de vue de sa démarche de recherche qu'en ce qui concerne son comportement dans la communauté scientifique. De même, lorsque le spécialiste en biologie moléculaire travaille sur des restes paléontologiques, ou sur des collections d'histoire naturelle, il doit impérativement se conformer aux pratiques et réglementations qui régissent ces objets ;
10) s'assurer que les analyses ne se fassent jamais en dehors d'un cadre collaboratif contractuel, dans lequel le laboratoire et l'archéologue ou le paléontologue (incluant le paléoanthropologue) définissent ensemble les problématiques visées, décident ensemble de la stratégie d'échantillonnage, et publient ensemble les résultats et leur interprétation. Cela nécessite impérativement la rédaction d'une charte de collaboration dans ce type de recherches éminemment pluridisciplinaires ;
11) mettre en garde contre une surexploitation des résultats de la génétique. Les difficultés d'interprétation des données en termes de scénario complexe d'évolution se trouvent exacerbées avec l'ADN ancien, en raison du petit nombre de séquences et de locus disponibles. Cependant, l'ADN ancien présente, en raison d'une répartition non homogène des jeux de données dans le temps, l'avantage potentiel d'autoriser des inférences sur des événements anciens, de permettre la calibration d'arbres avec une échelle de temps « absolue » et d'inférer séparément des taux de mutations et des tailles d'effectifs. Cela nécessite la modélisation de phénomènes évolutifs et la mise en place de tests statistiques d'hypothèses,

servation of the archaeological sites and finds. The use of the object is subject to the rules and laws relating to archaeological objects in force in the country concerned. In the same way, when the molecular biology specialist works on palaeontological remains, or on natural history collections, it is imperative that they must conform to the practices and regulations that govern these objects;

10) to ascertain that the analyses are never undertaken outside of the framework of a contractual collaboration, in which the laboratory and the archaeologist or the palaeontologist (including the palaeoanthropologist) define together the issues of the research, decide sampling strategy together, and publish together the results and their interpretation. Imperatively, this requires the drafting of a charter of collaboration for this type of particularly multidisciplinary research;
11) to build safeguards against the overexploitation of the results of genetic research. The difficulties of interpretation of data in terms of complex evolutionary scenarios are exacerbated with ancient DNA, because of the small number of sequences and loci available. However, because of a non-homogeneous distribution of the data in time, ancient DNA presents the potential to allow inferences on these ancient events, to allow the calibration of phylogenetic trees with an 'absolute' time scale, and to infer separately the rates of mutations and sizes of demographic abundance. This requires the modelling of evolutionary phenomena and the construction of hypotheses for statistical tests, but while recognizing the deleterious effects of blind or uncritical applications of certain recent models of population genetics.

Finally, these recommendations offer, alone, a summary of the hopes and technical difficulties posed by palaeogenetics. We formulate to vow that they can contribute to the development of this young, promising methodology.

Acknowledgements

A. de Riqlès (Collège de France) contributed to collect the papers of this issue. A preliminary version of this text as well as the quality charter were elaborated by several members of the Bureau of the RTP 'Paléogénétique de l'Homme et de son environnement', which is composed of Lounés Chikhi, Éric Crubézy, Marie-France Deguilloux, Eva-Maria Geigl, Catherine

mais tout en reconnaissant les effets pervers d'une application aveugle ou acritique de certains modèles récents de la génétique des populations.

Ces recommandations offrent finalement, à elles seules, un résumé des espoirs et des difficultés techniques que pose la paléogénétique. Nous formulons le vœu qu'elles puissent contribuer au développement de cette jeune méthodologie prometteuse.

Remerciements

A. de Riqlès (Collège de France) a participé à nos côtés à réunir les articles de ce dossier. Une version préliminaire de ce texte, ainsi que la charte de qualité, ont été relues et amendées par plusieurs membres du bureau du RTP « Paléogénétique de l'homme et de son environnement », composé de Lounés Chikhi, Éric Crubézy, Marie-France Deguilloux, Eva-Maria Geigl, Catherine Hänni, Evelyne Heyer, Pascal Murail, Éric Pasquet, Pierre Taberlet, Christelle Tougard et Anne Tresset. Le RTP a bénéficié des financements des départements « Sciences humaines et sociales » et « Écologie et développement durable » du CNRS. Robin Bendrey (CNRS) a réalisé la traduction de ce texte en anglais.

Hänni, Evelyne Heyer, Pascal Murail, Éric Pasquet, Pierre Taberlet, Christelle Tougard, and Anne Tresset. The RTP has benefited from a funding of the departments of Social and Human Sciences and of Ecology and Sustainable Development of the CNRS, France. Robin Bendrey (CNRS) translated the text into English.

Références

[1] R. Bollongino, A. Tresset, J.-D. Vigne, Environment and excavation: Pre-lab impacts on ancient DNA analyses, C. R. Palevol. 7 (2008).
[2] A. Cooper, H.N. Poinar, Do it well or don't do it at all, Science 289 (2000) 1139.
[3] E.-M. Geigl, Palaeogenetics of cattle domestication in Southwest Asia: Methodological challenges for fossil bones preserved in hot regions, C. R. Palevol. 7 (2008).
[4] B. Gomez, C. Coiffard, E. Dépré, V. Daviero-Gomez, D. Néraudeau, Diversity and histology of a plant litter bed from the Cenomanian of Archingeay–Les Nouillers (southwestern France), C. R. Palevol. 7. (2008).
[5] M. Hofreiter, Paleogenomics, C. R. Palevol. 7 (2008).
[6] M. Hofreiter, D. Serre, H.N. Poinar, M. Kuch, S. Pääbo, Ancient DNA, Nat. Rev. Genet. 2 (2001) 353–359.
[7] L. Orlando, L'anti-Jurassic Park, in: Faire parler l'ADN fossile, Belin – Pour la Science, Paris, 2007.
[8] S. Pääbo, H.N. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Despres, J. Hebler, N. Rohland, M. Kuch, J. Krause, L. Vigilant, M. Hofreiter, Genetic analyses from ancient DNA, Annu. Rev. Genet. 38 (2004) 645–679.
[9] M.H. Schweitzer, R. Avci, T. Collier, M. Goodwin, Microscopic, Chemical and Molecular Methods for Examining Fossil Preservation, C. R. Palevol. 7 (2008).
[10] C. Tougard, E. Renvoisé, Rodents and Palaeogenetics: New perspectives, C. R. Palevol 7 (2008).
[11] C.N. Trueman, M.R. Palmer, J. Field, K. Privat, N. Ludgate, V. Chavagnac, D.A. Eberth, R. Cifelli, R.R. Rogers, Comparing rates of recrystallisation and the potential for preservation of biomolecules from the distribution of trace elements in fossil bones, C. R. Palevol. 7 (2008).

Jean-Denis Vigne [a,*]
Pierre Darlu [b]
[a] *CNRS, UMR 5197, Muséum national d'histoire naturelle, « Archéozoologie, histoire des sociétés humaines et des peuplements animaux », département d'écologie et gestion de la biodiversité, CP 56, 57, rue Cuvier, 75231 Paris cedex 05, France*
[b] *CNRS, U535, Inserm, unité de génétique–épidémiologique et structure des populations humaines, hôpital Paul-Brousse, bâtiment Leriche, B.P. 1000, 94817 Villejuif, France*
* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : vigne@mnhn.fr (J.-D. Vigne)

1631-0683/$ – see front matter © 2008 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.crpv.2008.03.002