HAL open science

Genetic and radiocarbon dating analysis of deer, reindeer and steppe bison remains from a Mousterian burial site (La Ferrassie 8, Dordogne, France)

Jean-Marc Elalouf, José Utge, Matthieu Lebon, Olivier Tombret, Antoine Zazzo, Antoine Balzeau

To cite this version:

Jean-Marc Elalouf, José Utge, Matthieu Lebon, Olivier Tombret, Antoine Zazzo, et al.. Genetic and radiocarbon dating analysis of deer, reindeer and steppe bison remains from a Mousterian burial site (La Ferrassie 8, Dordogne, France). PALEO : Revue d'Archéologie Préhistorique, 2021, 31, pp.126-138. 10.4000/paleo.6119 . hal-03822357

HAL Id: hal-03822357

https://hal.science/hal-03822357v1

Submitted on 20 Oct 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

PALEO
Revue d'archéologie préhistorique

31 | 2021
Varia

Identification génétique et datation radiocarbone de restes osseux de cerf, de renne et de bison des steppes d'une sépulture moustérienne (La Ferrassie 8, Dordogne, France)

Genetic and radiocarbon dating analysis of deer, reindeer and steppe bison remains from a Mousterian burial site (La Ferrassie 8, Dordogne, France)

Jean-Marc Elalouf, Jose Utge, Matthieu Lebon, Olivier Tombret, Antoine Zazzo et Antoine Balzeau

Édition électronique
URL : https://journals.openedition.org/paleo/6119
DOI : 10.4000/paleo.6119
ISSN : 2101-0420

Éditeur
Musée national de Préhistoire

Édition imprimée
Date de publication : 30 décembre 2021
Pagination : 126-138
ISSN : 1145-3370

Ce document vous est offert par Muséum national d'histoire naturelle

Référence électronique
Jean-Marc Elalouf, Jose Utge, Matthieu Lebon, Olivier Tombret, Antoine Zazzo et Antoine Balzeau, « Identification génétique et datation radiocarbone de restes osseux de cerf, de renne et de bison des steppes d'une sépulture moustérienne (La Ferrassie 8, Dordogne, France) », *PALEO* [En ligne], 31 | 2021, mis en ligne le 19 juillet 2022, consulté le 20 octobre 2022. URL : http://journals.openedition.org/paleo/6119 ; DOI : https://doi.org/10.4000/paleo.6119

Creative Commons - Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International - CC BY-NC-ND 4.0
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/

IDENTIFICATION GÉNÉTIQUE ET DATATION RADIOCARBONE DE RESTES OSSEUX DE CERF, DE RENNE ET DE BISON DES STEPPES D'UNE SÉPULTURE MOUSTÉRIENNE (LA FERRASSIE 8, DORDOGNE, FRANCE)

Jean-Marc Elalouf[a, b], Jose Utge[b], Matthieu Lebon[c], Olivier Tombret[c, d], Antoine Zazzo[d], Antoine Balzeau[c, e]

a. *Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Institut des sciences du vivant Frédéric Joliot, CNRS UMR 9198, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France - jean-marc.elalouf@cea.fr. - jelalouf@wanadoo.fr*
b. *Unité Eco-anthropologie, Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS UMR 7206, Université de Paris, Musée de l'Homme, 17 place du Trocadéro 75016 Paris, France - jose.utge@mnhn.fr.*
c. *Unité Histoire Naturelle de l'Homme Préhistorique, Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS UMR 7194, Musée de l'Homme, 17 place du Trocadéro 75016 Paris, France - lebon@mnhn.fr, - olivier.tombret@mnhn.fr, antoine.balzeau@mnhn.fr.*
d. *Unité Archéozoologie, Archéobotanique : Sociétés, Pratiques et Environnements, Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS UMR 7209, 55 rue Buffon, 75231 Paris cedex 05, France - antoine.zazzo@mnhn.fr*
e. *Département de Zoologie africaine, Musée Royal de l'Afrique Centrale, Tervuren, Belgium.*

PALEO 31
DÉCEMBRE 2021
PAGES 126 À 138

MOTS-CLÉS Moustérien, archéozoologie, ADN ancien, paléogénétique, PCR en temps réel.

RÉSUMÉ

Afin d'obtenir de nouvelles informations sur le contexte d'enfouissement de l'enfant néandertalien nommé La Ferrassie 8, nous avons analysé des restes indéterminés du locus où le squelette humain partiel a été découvert. Notre étude porte sur 20 esquilles osseuses où la présence d'ADN de 10 espèces, dont Néandertal, a été recherchée au moyen de tests spécifiques d'amplification génique (PCR en temps réel) de fragments du génome mitochondrial. Nous montrons la préservation de l'ADN dans trois esquilles, identifiées respectivement comme des restes de cerf élaphe (*Cervus elaphus*), de renne (*Rangifer tarandus*) et de bison des steppes (*Bison priscus*). La datation radiocarbone de ces esquilles donne des âges compris entre 55 000 et 42 000 ans cal. BP. Ceci les situe dans le même horizon chronologique que d'autres restes animaux et un reste néandertalien du même secteur, alors que les sédiments du même niveau datés par OSL apparaissent plus anciens. Nos données confortent la notion que l'enfant a été déposé dans une fosse creusée au sein d'une couche stérile dans laquelle des ossements provenant de couches supérieures sont tombés au moment de la préparation de la fosse ou de son remplissage.

ABSTRACT

Genetic and radiocarbon dating analysis of deer, reindeer and steppe bison remains from a Mousterian burial site (La Ferrassie 8, Dordogne, France)

To gain new information on the burial context of the La Ferrassie 8 Néandertal child, we studied uncharacterized bone remains originating from the locus where the partial human skeleton was found. We report here on the analysis of 20 bone splinters. Searching for mitochondrial DNA for 10 mammalian species, including Néandertal, we performed real-time PCR analyses and demonstrated the presence of red deer (*Cervus elaphus*), reindeer (*Rangifer tarandus*), or steppe bison (*Bison priscus*) DNA in three bone samples. Radiocarbon dating analysis of the samples that contained DNA yielded ages of about 55,000 to 42,000 years cal. BP. These values are in line with those previously obtained from a néandertal bone fragment and other animal remains from the same sector, whereas older ages have been reported for OSL-dated sediments from the same level. This study therefore supports the contention that the Néandertal child was laid in a pit dug into an archaeological sterile layer where faunal remains from upper layers fell when the pit was prepared or filled.

KEY-WORDS Mousterian, archaeozoology, ancient DNA, paleogenetics, Real-time PCR.

INTRODUCTION

L'abri sous roche de La Ferrassie se situe au pied d'une colline calcaire sur la commune de Savignac-de-Miremont (Dordogne, France). Il a livré six squelettes néandertaliens au début du 20e siècle (Capitan et Peyrony 1909, 1911, 1912 ; Heim 1984 ; Maureille 2002), puis un dernier, celui d'un enfant dénommé La Ferrassie 8 en 1970 et 1973 (Delporte 1984). La Ferrassie est ainsi un des gisements de référence pour notre connaissance de la biologie et des comportements des néandertaliens. Depuis 2011, un travail de révision a été entrepris pour analyser plus finement les collections, les archives et toutes les données entreposées dans diverses institutions et compléter ces données par des observations de terrain (Turq *et al.* 2012 ; Gómez-Olivencia *et al.* 2015 ; Guérin *et al.* 2015 ; Becam *et al.* 2019). Un intérêt particulier a été porté sur le squelette humain La Ferrassie 8 (LF8), découvert dans le carré 1 des fouilles effectuées de 1968 à 1973 sous la direction de Henri Delporte (Delporte 1984). La majeure partie du carré 1 a livré du sédiment stérile, seule une poche du niveau M2 contenait des matériaux archéologiques, dont les restes humains. Nous nommons cette poche archéologique « locus LF8 » par la suite car elle ne correspond qu'à une petite partie du carré 1.

Les nouvelles recherches sur LF8 et le locus dont il est issu ont été conduites dans les collections du musée d'Archéologie nationale et du Muséum national d'Histoire naturelle, ainsi que dans les archives du musée de l'Homme et de l'Institut de paléontologie humaine, et directement sur le gisement. La révision des collections issues des fouilles Delporte a livré 47 nouveaux restes osseux ou dentaires pour l'enfant LF8 (Gómez-Olivencia *et al.* 2015). Concernant le locus lui-même, les carnets de fouilles révèlent pour la couche M2 du carré 1 un pendage particulier dans la zone où ont été trouvés les restes humains (LF8), fauniques et lithiques. L'âge ^{14}C des restes osseux de la couche M2 étudiés à ce jour est compris entre 38,6 et 49,1 ka cal.BP, et un fragment osseux néanderthalien caractérisé par ZooMS et analyses génétiques (cf. *infra*) a livré un âge de 41,7-40,8 ka cal. BP. Les sédiments provenant du même horizon stratigraphique d'un carré adjacent sont plus anciens ; leur dation par luminescence optiquement stimulée (OSL) indique un âge minimum de 60 ± 7 ka (Balzeau *et al.* 2020). Un faisceau cohérent d'argument basés sur la stratigraphie, la taphonomie et les datations a ainsi permis de proposer qu'une fosse a été creusée pour l'enfouissement de LF8 (Balzeau *et al.* 2020). Les restes animaux situés à proximité de LF8 seraient tombés accidentellement au moment du creusement ou du remplissage de la fosse et seraient intrusifs dans une couche par ailleurs archéologiquement stérile.

Les restes humains et animaux recensés pour le locus LF8 sont au nombre de 4 609 (Balzeau *et al.* 2020). Seule une minorité bénéficie d'une identification taxonomique (humains : 191 ; animaux : 22), car l'essentiel du matériel se présente sous forme d'esquilles impropres à la détermination par anatomie comparée. Afin de combler ce déficit d'information, des analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées sur 17 restes (Balzeau *et al.* 2020) au moyen de la méthode ZooMS (Buckley *et al.* 2009). L'avantage de cette méthode, basée sur l'analyse de

peptides du collagène I, est qu'elle est rapide et peu onéreuse. La limitation est qu'elle permet une identification au niveau du genre mais pas de l'espèce. Ainsi, parmi les 17 restes du locus LF8 analysés par ZooMS, l'un a été identifié comme humain mais des analyses génétiques ont été nécessaires pour montrer qu'il s'agit d'un fragment osseux néandertalien (Balzeau *et al.* 2020). Pour les autres restes analysés par ZooMS avec succès, il n'y a pas non plus de détermination au niveau de l'espèce ; ils ont été attribués à *Bos/Bison* (13 restes) ou *Ursus* sp. (1 reste). Cet inventaire faunique ne recoupe pas celui établi par l'analyse archéozoologique qui, outre les grands bovinés (*Bos/Bison*, 9 restes) indique la présence d'*Equus ferus* (7 restes) et de cervidés (6 restes) dans le locus. Des analyses complémentaires des restes indéterminés apparaissaient donc nécessaires.

Les analyses paléogénétiques, autrefois réalisées sur des prélèvements de plusieurs grammes (Krings *et al.* 1997), sont maintenant effectuées sur des échantillons de quelques dizaines de milligrammes. La méthode la plus informative, livrant la séquence de génomes complets, est le séquençage massif (Mafessoni *et al.* 2020), mais les coûts et l'infrastructure associés la rendent peu envisageable pour l'analyse systématique d'esquilles. Des méthodes d'enrichissement ciblé (capture d'ADN) ont été utilisés avec succès pour réduire le cout du séquençage (Slon *et al.* 2017). Dans cette étude nous avons mis en œuvre une approche alternative, rapide et peu onéreuse, basée sur l'utilisation de tests TaqMan de PCR en temps réel (Kutyavin *et al.* 2000). Cette approche, basée sur l'utilisation d'amorces et d'une sonde spécifique, est appropriée pour l'identification de l'ADN d'espèces dont le génome est connu. Surtout, l'utilisation de la technologie TaqMan-MGB augmente la spécificité de l'analyse par PCR et permet de détecter avec une sensibilité élevée des fragments d'une soixantaine de nucléotides. Ceci est particulièrement appréciable pour l'ADN ancien, qui se présente sous forme de courts fragments. Nous avons précédemment utilisé avec succès la PCR-TaqMan sur des échantillons de différentes périodes, du MIS2 au MIS5 (Utge *et al.* 2020). Pour la présente étude, nous avons sélectionné 20 esquilles du locus LF8 et les avons analysées au moyen de tests TaqMan pour 10 espèces de mammifères, dont Néandertal. En complément des informations apportées sur l'identification des espèces, nous avons daté les échantillons dont nous avons pu caractériser l'ADN.

1 | MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1 | Échantillons

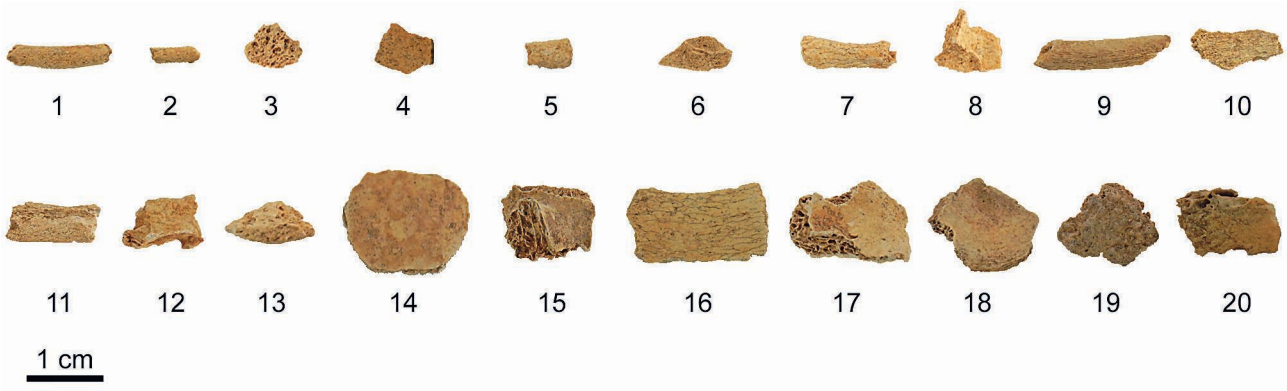
LF8 a été découvert dans les années 1970, si bien que nous ne pouvons faire aucun prélèvement dans son contexte archéologique d'origine. Pour des raisons de conservation, nous avons choisi de ne pas utiliser d'os identifié comme humain pour une datation directe. En effet, les os conservés sont très petits et fragiles. En conséquence, nous avons dû élaborer une stratégie avec différentes méthodologies afin de collecter autant d'informations que possible et contextualiser chronologiquement ce spécimen et l'environnement archéologique qui l'entourait.

Des échantillons (**fig. 1**) ont été sélectionnés parmi les matériaux, collectés au cours des campagnes 1970 et 1973, pour lesquels nous disposons d'informations sur le contexte spatial (**fig. 2**). Tout le matériel collecté en 1970 a été directement mis en sachet au moment des fouilles, puis a été transporté au Musée d'Archéologie nationale (Saint-Germain-en-Laye). Ce matériel n'a pas été révisé avant 2013 (Gómez-Olivencia *et al.* 2015). Le matériel identifié en 1973 n'a été qu'en partie révisé par la suite avant nos propres travaux. Aucun des échantillons analysés dans la présente étude n'a subi de traitement.
Sept spécimens des fouilles de 1970 ont été sélectionnés (numérotés 14 à 20, **tabl. 1**). Ils proviennent d'un même sachet, stocké au Musée d'Archéologie nationale, rempli d'objets recueillis dans la couche M2 en partie est du carré 1 (**fig. 2**). Le sachet a été rempli du 20 au 21 août 1970. Ces jours-là, les restes humains n'avaient pas encore été reconnus. Seuls certains objets archéologiques, principalement lithiques, étaient alors étiquetés et leurs coordonnées enregistrées. Par conséquent, nous n'avons pas la localisation précise des échantillons mais nous savons qu'ils proviennent d'une surface très limitée (30 cm × 30 cm), et qu'ils étaient associés spatialement et archéologiquement à LF8. Neuf restes fauniques (numérotés de 5 à 13, **tabl. 1**), trouvés en 1973 près du squelette LF8 ont également été sélectionnés pour fournir les informations les plus précises sur le contexte archéozoologique. Ces restes de faune se trouvaient dans une boîte stockée à Paris au Muséum national d'Histoire naturelle (Balzeau *et al.* 2020). Nous avons des informations détaillées sur ces spécimens dans le cahier trouvé au Musée d'Archéologie nationale. En 1973, les fouilles ont été faites avec beaucoup plus d'attention qu'en 1970, et la majorité des objets ont été coordonnés et étiquetés. Enfin, quatre échantillons ont été sélectionnés dans un sac de sédiments résultant d'un tamisage effectué dans le carré 1, couche M2 en 1973, donc à proximité de l'enfant.

1.2 | Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée dans la salle blanche du Musée de l'Homme à Paris (Utge *et al.* 2020) en suivant les précautions d'usage pour l'ADN ancien, notamment le port d'un masque et d'une combinaison intégrale, de gants changés fréquemment, l'utilisation de matériel stérile à usage unique ou d'outils soigneusement lavés et stérilisés après chaque manipulation.

Les débris adhérents aux échantillons ont été éliminés par grattage au moyen d'un scalpel à usage unique. Un prélèvement a été effectué à partir du cortex au moyen d'un second scalpel lorsque cela était possible, tandis que la totalité du matériel était utilisé pour les os les plus petits. L'échantillon récupéré pour l'extraction d'ADN a ensuite été réduit en poudre au moyen du broyeur à billes Retsch MM200 (Haan, Allemagne) réglé à une vitesse de 25 oscillations par seconde pendant 30 secondes. Selon la quantité traitée, la poudre a ensuite été transférée dans 0,5 à 1 ml de tampon (EDTA 250 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8), N-lauryl sarkosine 0,2 %, protéinase K 200 µg/ml (Walthman, Massachusetts, États-Unis)), et incubée une nuit à 42° C dans un Thermomixer Eppendorf (Hambourg, Allemagne) sous agitation constante (1 200 oscillations par minute). L'extraction d'ADN a ensuite été réalisée selon



— FIGURE 1 —

Photographie des échantillons analysés.

Photographs of the samples analysed.

Échantillon	Fouilles/ localisation	Masse (mg)	Masse extraction ADN (mg)	Masse datation ^{14}C (mg)
1	F73.1.M2 tamisage	130	54	-
2	F73.1.M2 tamisage	29	29	-
3	F73.1.M2 tamisage	68	68	-
4	F73.1.M2 tamisage	30	30	-
5	F73.1.M2.388§	25	25	-
6	F73.1.M2.387§	58	58	-
7	F73.1.M2.387§	121	54	-
8	F73.1.M2.387§	114	64	-
9	F73.1.M2.387§	213	61	-
10	F73.1.M2.537¶	153	45	-
11	F73.1.M2.537¶	180	71	106
12	F73.1.M2.366§	121	47	-
13	F73.1.M2.366§	126	47	-
14	F70.1.M2	302	26	-
15	F70.1.M2	485	54	-
16	F70.1.M2	442	31	-
17	F70.1.M2	342	33	-
18	F70.1.M2	428	56	150
19	F70.1.M2	240	51	182
20	F70.1.M2	338	50	-

— TABLEAU 1 —

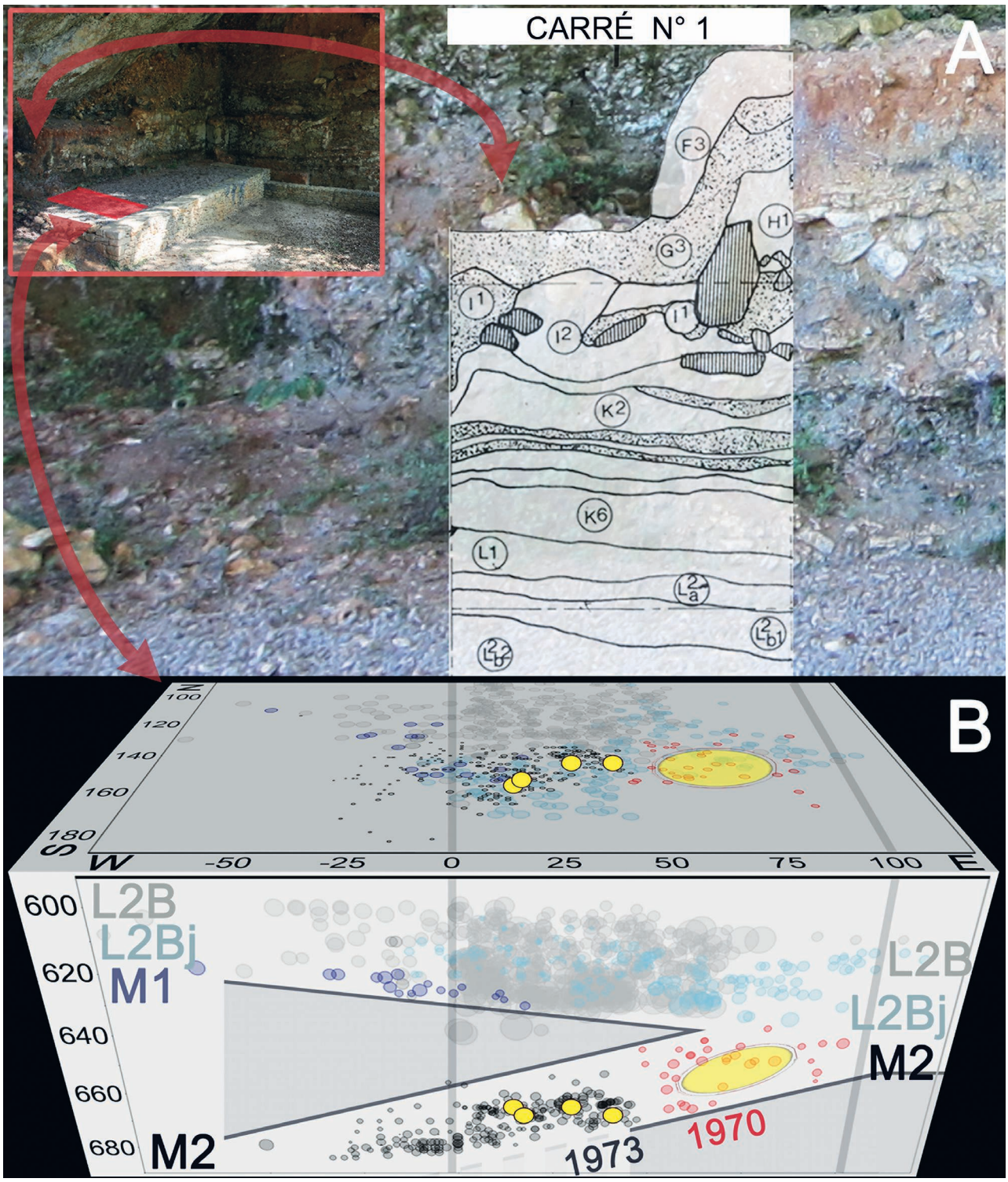
Informations archéologiques, masse des échantillons et quantité utilisées pour l'extraction d'ADN et la datation radiocarbone. La colonne 2 donne les informations sur l'origine des échantillons : le site (La Ferrassie, F), l'année des fouilles (1970 (70) ou 1973 (73)), le carré de fouilles (1), le niveau (M2), suivis de l'indication relative au tamisage ou au numéro de sachet (366 à 537). § Pour ces échantillons, la fiche de fouilles mentionne « amas de petits os ». ¶ Pour ces échantillons, la fiche de fouilles mentionne « ensemble tamisé ».

Archaeological data and amount of material used for DNA extraction and radiocarbon dating. Column 2 provides the information relative to the origin of the samples : the site (La Ferrassie, F), the excavation year (1970 (70) or 1973 (73)), the excavated square (1), the archaeological layer (M2), the recovery through a sieving process (tamisage) and, when available, the bag number (366 to 537). § The excavation notebook indicates « pack of small bones ». The excavation notebook indicates « sieved material ».

la méthode décrite par Utge *et al.* (2020). Brièvement, après incubation dans le tampon d'extraction, une centrifugation (5 minutes, 5 000 *g*) a été réalisée, le surnageant a été prélevé et concentré sur une membrane de dialyse Amicon de 0,5 ml présentant un seuil de sélection de 30 kD (Millipore ; Burlington, Massachusetts, États-Unis), la colonne a été rincée quatre fois avec 0,5 ml d'eau distillée ultra pure (Thermo Fisher Scientific) et l'échantillon récupéré dans un volume de 50 µl. Une purification supplémentaire a été réalisée au moyen d'une colonne de silice (MinElute PCR purification kit; Qiagen ; Venlo, Pays-Bas) et l'échantillon a été élué de la colonne avec 50 µl de Tris-HCl 10 mM (pH 8).

1.3 | Analyse de l'ADN par PCR en temps réel

La recherche d'ADN dans les échantillons a été réalisée par PCR en temps réel en utilisant des sondes TaqMan MGB (Kutyavin *et al.* 2000) pour la détection de l'ADN amplifié. Par rapport à une PCR conventionnelle, la méthode TaqMan présente une spécificité accrue car le signal d'amplification est fourni par une sonde qui s'hybride sur le fragment d'ADN amplifié. Ainsi, si les amorces de PCR permettent l'amplification de fragments autres que celui recherché, ces fragments indésirables ne permettent pas l'hybridation de la sonde et il n'y a pas de signal parasite. Les tests TaqMan que nous avons utilisé



— FIGURE 2 —

Localisation dans le site de La Ferrassie du carré de fouilles qui a livré LF8 (carré 1 de Delporte) et disposition des objets archéologiques répertoriés au cours des fouilles réalisées de 1968 à 1973. A – Localisation du carré 1 et stratigraphie (d'après Laville et Tuffreau 1984) des couches supérieures du carré en projection frontale sur une vue actuelle du site. B – Distribution des objets archéologiques issus du carré 1. Les points rouges indiquent la localisation des objets collectés en 1970, les points noirs celle des objets collectés en 1973, et le jaune indique la position des objets trouvés en 1970 et 1973 qui ont été analysés dans la présente étude. Les objets collectés dans les niveaux archéologiques situés au-dessus de LF8 (couche M2) sont indiqués en violet (M1), en bleu clair (L2Bj) et en gris (L2B). La partie supérieure de la figure 2B correspond aux axes XY (ouest-est et nord-sud) et la partie inférieure aux axes XZ (ouest-est et profondeur d'enfouissement).

Location in the La Ferrassie site of the excavation square (Delporte square 1) that yielded LF8 and distribution of archaeological objects recovered during the 1968-1973 excavations. A – Location of square 1 and stratigraphy (from Laville and Tuffreau 1984) of the frontal profile above the square as displayed on an actual view of the site. B- Distribution of the archaeological objects in square 1. Red points indicate location of objects found in 1970, black points indicate location of objects found in 1973, and yellow areas show the location of objects from the 1970 and 1973 excavation campaigns that were analysed in the present study. Objects originating from layers located above LF8 (layer M2) are in indicated in purple (M1 layer), blue (L2BJ), and grey (L2B). Upper panel: XY projection (west-east and north-south; lower panel: XZ projection (west-east and depth).

permettent l'analyse de fragments du génome mitochondrial de 10 espèces (**tabl. 2**). Ils ont été conçus avec l'aide du logiciel Primer express 3.0.1 (Thermo Fisher Scientific). Les tests pour les espèces animales ont été validées sur des extraits d'ADN ancien (Palacio *et al*. 2017 ; Utge *et al.* 2020 ; Le Guillou *et al*. 2021). Les performances du test TaqMan pour Néandertal ont été évaluées sur un oligonucléotide de 78 bases synthétisé d'après la séquence de référence du génome mitochondrial de Néandertal (Green *et al*. 2008). Le test permet la détection de 10 copies du fragment de génome néandertalien au bout de 37 cycles de PCR (**fig. 3**).

Les PCR en temps réel ont été réalisées dans un volume final de 20 µl contenant 10 µl de 2X TaqMan fast advanced master mix (Thermo Fisher Scientific), les amorces sens et anti-sens (900 nM), la sonde TaqMan (250 nM), et de l'eau (blanc de PCR), un blanc d'extraction ou des quantités variables (0,1 à 0,9 µl) de l'extrait d'ADN. L'amplification a été effectuée dans l'appareil de PCR en temps réel *CFX96 Touch* (BioRad, Hercules, Californie, États-Unis), selon le protocole suivant : 50°C, 2 minutes ; 95°C, 20 secondes ; puis 40 cycles de PCR (95°C, 3 secondes ; 60°C, 30 secondes). Les données ont été analysées au moyen du logiciel CFX Maestro de la société Biorad pour calculer le cycle seuil (*Cycle Threshold*, ou C_T), qui correspond au nombre de cycles de PCR à partir duquel le signal fluorescent devient significativement différent de la ligne de base.

1.4 | Séquençage de l'ADN

Pour s'assurer de l'identification correcte des espèces au moyen des tests TaqMan, les échantillons positifs ont été analysés au moyen d'amorces ciblant un autre fragment du génome mitochondrial (**tabl. 2**) et l'ADN amplifié a été analysé par séquençage. L'amplification a été réalisée dans un volume final de 50 µl contenant le tampon d'amplification (amorces 300 nM, dNTP 200 µM, $MgCl_2$ 2.5 mM, 5 µl de GeneAmp 10X PCR buffer II, et 2,5 U d'*AmpliTaq Gold DNA polymerase* (Thermo Fisher Scientific)), de l'eau (blanc de PCR), un blanc d'extraction ou 0,3 µl de l'extrait d'ADN. Après une étape d'activation de l'enzyme (95°C, 10 minutes), 45 cycles de PCR (95°C, 15 secondes ; 53°C, 20 secondes ; 70°C, 1 minute) ont été réalisés sur un appareil Veriti (Thermo Fisher Scientific). La totalité du volume de chaque réaction de PCR a été déposée sur un gel de polyacrylamide coloré au *Sybr Green I* (Thermo Fisher Scientific). Aucune amplification n'a été notée pour les témoins négatifs (blanc de PCR, blanc d'extraction). Les ADN amplifiés à partir des échantillons archéologiques ont été ligaturés à des adaptateurs Illumina (San Diego, Californie, États-Unis). Des banques de fragments ont été générées en utilisant le kit Illumina TruSeq Nano DNA en suivant les recommandations du fournisseur, à l'exception de l'étape d'amplification qui était limitée à 5 cycles de PCR. Une banque générée à partir du génome du bactériophage PhiX aété utilisée comme témoin pour s'assurer de la bonne qualité du séquençage. Le séquençage a été réalisé sur un séquenceur Illumina MiSeq de la plateforme iGenSeq (Institut du cerveau-ICM, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France). Les lectures des brins d'ADN ont été analysées au moyen des logiciels Fastx-Toolkit 0.0.13

TABLEAU 2

Application	Espèce	Oligonucléotides	Cible, taille (pb)
TaqMan	*Bison priscus*	S, CGCTCGTCATCGTAGCTATCCT AS, ATGAGAGCGGTTGCTCCTATG Sonde, ATCCAAACACCTTGAAGTT	ND4, 64
TaqMan	*Bison schoetensacki*	S, CTACTAGTACTATTCGCACCCGA AS, AGGCGTGTTAAGTGGATTTGCT Sonde, CCTCCTCGGAGACCCAG	CYTB, 75
TaqMan	*Cervus elaphus*	S, CATGTAGGGCGAGGCCTGTA AS, AACTACTCCGATGTTTCACGTCTCT Sonde, ACGGATCATATACTTTTC	CYTB, 66
TaqMan	*Crocuta crocuta*	S, TGGCGAGACATTATCCGAGAA AS, CGCAGCCCCTTTTGTACAGT Sonde, CACATTCCAGGGACACC	COX3, 68
TaqMan	*Homo neanderthalensis*	S, TGTCATACATCAACTACAACTCCAAAGA AS, CAAGGGTGGGTAGGTTTGTTGATA Sonde, CCCTTACACCCACTAGG	Région de contrôle, 72
TaqMan	*Mammuthus primigenius*	S, CCAATCCACGATCCACAGAAG AS, GGATGCTGTGGCTTGGGTTA Sonde, CGCCACGAAATAC	ND2, 59
TaqMan	*Rangifer tarandus*	S, TCACATCTGTCGAGACGTCAATT AS, TGCTCCGTTGGCATGTATGTA Sonde, TGGCTGAATCATCCG	CYTB, 61
TaqMan	*Ursus arctos*	S, AAACGAGAGGTGGCAGTGGTA AS, GGGCATCCGTGTAGTCATTCA Sonde, AACTCACCTCAACCAAC	COX1, 62
TaqMan	*Ursus spelaeus*	S, CCGTGCGATTAACCGCTAATA AS, GTAGCTCCCCCAATTAGATGGA Sonde, TACTGCAGGTCATTTAC	ATP6, 64
TaqMan	*Vulpes vulpes*	S, AACTATACCTGGCATCTGGTTCTTAC AS, GAGATGTCCCATTTGAGAGGATTAGT Sonde, CTCAGGGCCATTCTAC	Région de contrôle, 85
PCR-séquence	*Bison priscus*	S, CCAAACCCTTAAACTATCCCTC AS, CGAATAGTGCTACTGGGACA	ND5, 74
PCR-séquence	*Rangifer tarandus* *Cervus elaphus*	S, ATCCGATACAATAACAGCAT§ AS, TTCAGCCATAATTGACGTCT§	CYTB, 65

Amorces et sondes utilisées pour l'analyse des fragments d'ADN mitochondrial. Les séquences des amorces sens (S), anti-sens (AS) et des sondes sont données dans l'orientation 5'-3'. Les sondes TaqMan sont marquées à la 6-carboxyfluoresceine (FAM). La colonne de droite indique la région du génome mitochondrial amplifiée avec les différents couples d'amorces et la taille en paires de bases (pb) du fragment de PCR. § Cette amorce présente un alignement parfait sur le génome mitochondrial de référence de *Rangifer tarandus*, et une substitution par rapport à celui de *Cervus elaphus*.

Oligonucleotide primers and probes used for mitochondrial DNA analysis. The sequences of the forward primers (S), reverse primers (AS) and DNA probes (Sonde) are indicated in the 5' to 3' orientation. TaqMan DNA probes were labelled with 6-carboxyfluorescein (FAM). The right column indicates the mitochondrial genome portion analysed and the size in (base-pair) of the PCR fragment. § This primer displays a perfect match with the Rangifer tarandus *mitochondrial genome reference sequence and a single substitution with the* Cervus elaphus *genome sequence.*

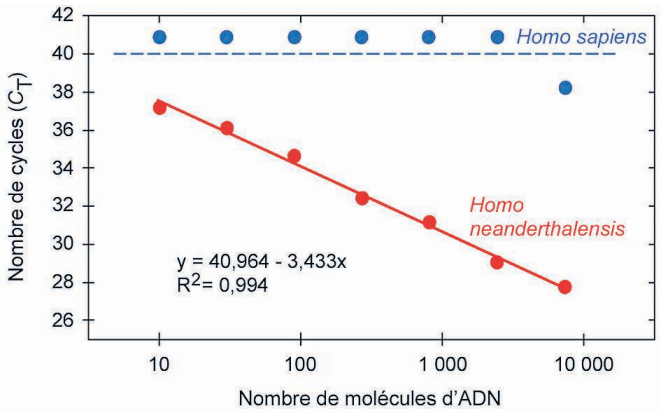


FIGURE 3

Détermination de la sensibilité et de la spécificité du test TaqMan conçu pour détecter l'ADN de Néandertal. Des quantités croissantes d'oligonucléotides synthétiques correspondant à un fragment de 78 nucléotides de la séquence de référence du génome mitochondrial de Néandertal ou de la séquence orthologue du génome d'*Homo sapiens* ont été analysées au moyen du test TaqMan pour Néandertal. Noter que le test permet la détection de 10 molécules d'ADN de Néandertal avec une linéarité de réponse sur tout le domaine exploré (10 à 7 290 molécules). L'absence de signal d'amplification (C_T > 40 cycles) pour la plupart des quantités d'ADN d'*Homo sapiens* introduites démontre la spécificité de l'essai.

Evaluation of the sensitivity and of the specificity of the Néandertal TaqMan PCR assay. Known amounts of synthetic oligonucleotides corresponding to a 78 nucleotide-long-fragment of the Néandertal reference mitochondrial genome sequence or the orthologous portion of the reference Homo sapiens *genome were analysed using the TaqMan Néandertal PCR assay. Note that the assay allows the detection of 10 copies of the néandertal sequence and the linear response of the assay throughout the range explored (from 10 to 7,290 DNA molecules). The lack of amplification signal (C_T > 40 cycles) for almost all tests carried out using Homo sapiens DNA demonstrates the specificity of the assay.*

(http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/download.html) et Cutadapt (version 2.7) (Martin 2011) pour éliminer les adaptateurs ainsi que les lectures dont le score de qualité était inférieur à 25 ou la longueur inférieure à 50 nucléotides. Les lectures issues d'un même échantillon ont été alignées en utilisant le logiciel CodonCode Aligner v.8.0 (http://www.codoncode.com/aligner), et la représentation graphique des séquences a été réalisée au moyen de seqLogo (Bembom 2019).

1.5 | Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier en mode ATR (ATR-FTIR)

Afin de tester la faisabilité des datations radiocarbone, le contenu en collagène des échantillons osseux a été évalué par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier en mode ATR (Attenuated Total Reflexion) selon le protocole établi par Lebon *et al.* (2016). Environ 0,5 mg de poudre a été prélevée en utilisant une fraise diamantée, puis analysée sur le plateau de spectrométrie infrarouge du Musée de l'Homme sur un spectromètre Vertex-70 (Bruker ; Billerica, Massachusetts, États-Unis) équipé d'un accessoire ATR diamant Golden Gate (Specac ; Orpington, Royaume Uni). Les spectres ATR ont été obtenus par accumulation de 64 scans à la résolution de 4 cm^{-1} sur la gamme spectrale 4000-400 cm^{-1}. Le rapport des bandes amide I (1710-1590 cm^{-1}) et v_3 (PO_4) (1110-940 cm^{-1}) a été calculé à l'aide du logiciel OPUS (Bruker) et utilisé pour estimer la quantité de collagène préservé selon les étalonnages reportés dans Lebon *et al.* (2016).

1.6 | Datation radiocarbone

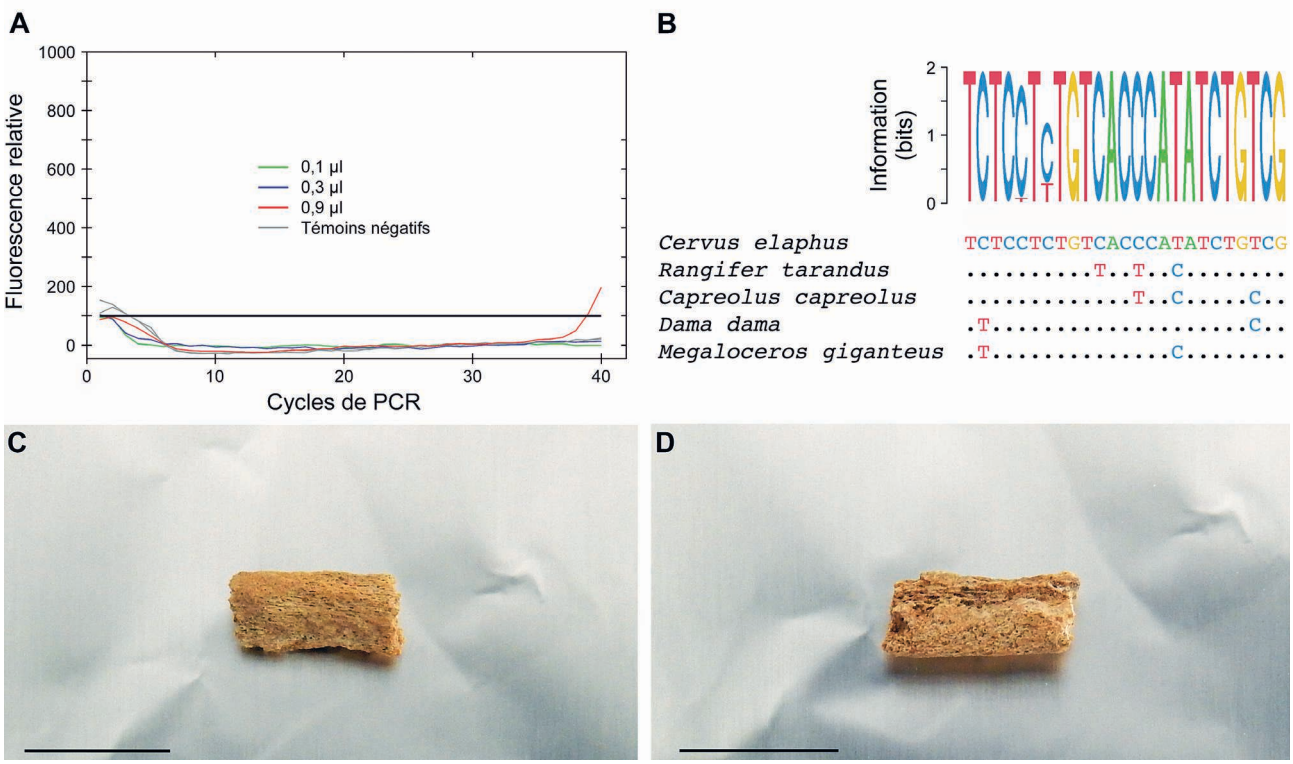
Les échantillons ont été broyés avec un pilon dans un mortier d'agate, tamisés, et la fraction de 0,3-0,7 mm de dimension a été conservée pour l'analyse. L'extraction du collagène a été réalisée sur le plateau technique de datation radiocarbone du MNHN en utilisant de la vaisselle de laboratoire préalablement brûlée à 450 °C pendant 5 h. La poudre d'os (106-182 mg) a tout d'abord été placée dans un bécher et immergée dans l'acide (HCl 1 N) pendant 20 min sous agitation continue. La solution a été filtrée sur une membrane d'ester de cellulose mixte à pores de 5 µm, puis rincée avec de l'eau MilliQ. Ensuite, le résidu insoluble dans l'acide a été immergé dans une solution alcaline (NaOH 0,1 N) pendant 20 h. La solution a été filtrée à nouveau sur la membrane en cellulose, rincée à l'eau MilliQ, et le résidu insoluble en milieu alcalin a été immergé dans l'acide (HCl 0,01 N) et gélatinisé à 100 °C pendant 17 h. La solution a ensuite été filtrée sur membrane de cellulose et le collagène gélatinisé lyophilisé. La quantité de collagène extrait a été pesée pour déduire le rendement d'extraction. Environ 2,5 mg de collagène a été pesé dans une capsule d'étain ultra-légère, et brûlé dans l'analyseur élémentaire (AE) d'un système de graphitisation compact automatisé AGE 3 ainsi que des standards (acide oxalique II) et des blancs (anhydride phtalique et blanc collagène maison, PC14) (Wacker *et al.* 2010). Les paramètres de contrôle de qualité (%C, %N et rapports C/N) ont été mesurés dans l'AE avant la graphitisation. Le CO_2 a ensuite été transféré dans l'unité de graphitisation où la réduction a été effectuée dans des réacteurs en quartz, chacun contenant 5 mg de catalyseur de fer. Afin de réduire le risque d'effets de mémoire dans les réacteurs en graphite, un échantillon d'âge similaire, ou une aliquote du même échantillon est brûlé avant chaque échantillon à dater. Les échantillons de graphite ont ensuite été pressés. Les cibles de graphite ont été datées à Saclay (France) à l'aide de l'AMS compact ECHoMICADAS (Synal *et al.* 2007 ; Cersoy *et al.* 2017). La réduction des données a été effectuée à l'aide du logiciel BATS version 4.07 (Wacker *et al.* 2010). Les deux premières séries de mesures ont été écartées pour tenir compte d'une éventuelle contamination de la surface de la cible par contact avec l'air ambiant entre la graphitisation et la mesure AMS. Les paramètres de mesure tels que le courant ^{12}C et le courant ^{13}CH ont été vérifiés. Des corrections de temps et d'isobare ont été effectuées avant la validation. La normalisation, la correction du fractionnement et les corrections du bruit de fond ont été appliquées pour chaque cycle individuel en mesurant l'étalon NIST d'acide oxalique II et les blancs d'anhydride phtalique. Les âges calibrés (cal. BP) ont été déterminés en utilisant le logiciel Oxcal v4.4 (Bronk Ramsey 2009) et la courbe de calibration IntCal20 pour l'hémisphère nord (Reimer *et al.* 2020).

2 | RÉSULTATS

Les échantillons analysés (**tabl. 1**), issus des fouilles de 1970 et 1973, proviennent du niveau M2 du carré 1, où les os de l'enfant néandertalien ont été trouvés. Pour les fouilles de 1973, le premier sachet comportant des os néandertaliens portait le numéro 295. Les sachets sélectionnés font donc partie de la série comportant de tels restes. Un autre élément notable trouvé lors de ces fouilles est une corne identifiée au niveau du genre (*Bison*) mais non de l'espèce qui, selon Delporte (1984) aurait pu être le bison des steppes (*Bison priscus*) ou le bison des forêts (*Bison schoetensacki*).

Chacun des 10 tests TaqMan de PCR en temps réel a été appliqué aux 20 échantillons de l'étude. Pour 17 échantillons, aucun signal d'amplification n'a été obtenu. Pour trois échantillons en revanche, les tests PCR étaient positifs. Dans chaque cas, une seule espèce était détectée, ce qui plaide en faveur de la spécificité des signaux d'amplification.

La figure 4A montre les résultats de l'analyse de l'échantillon n°11 au moyen du test de PCR-TaqMan pour le cerf élaphe. Un signal d'amplification est détecté pour la plus grande quantité d'extrait testée. Compte tenu de la faible amplitude du signal, l'échantillon a été testé dans deux autres expériences qui ont permis de confirmer par PCR-TaqMan la présence d'ADN de cerf dans 6 réplicas d'analyse. Une validation supplémentaire des résultats a été effectuée en analysant l'échantillon n° 11 au moyen d'amorces suffisamment conservées pour amplifier l'ADN de différents cervidés. L'analyse des séquences de l'ADN obtenu au moyen de ces amorces (**fig. 4B**) montre qu'il s'agit d'ADN de cerf élaphe, avec les endommagements typiques (transitions C/T) attendus pour l'ADN ancien (Hofreiter *et al.* 2001 ; Stiller *et al.* 2006).



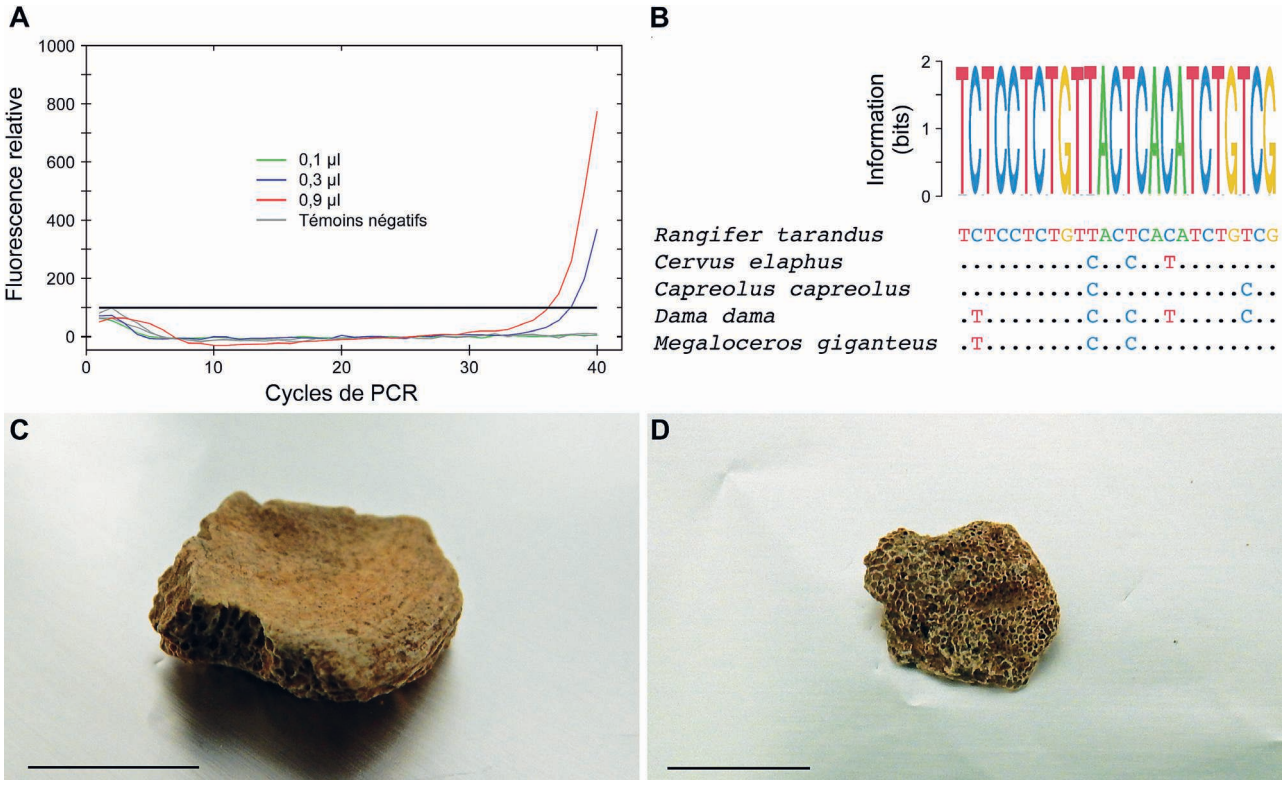
— FIGURE 4 —

Détection d'ADN de cerf élaphe (*Cervus elaphus*) dans l'échantillon LF8-11. A - Analyse par PCR en temps réel au moyen du test TaqMan conçu pour la recherche d'ADN mitochondrial de cerf élaphe. La ligne noire horizontale indique la valeur prise en compte pour déterminer le nombre de cycles (CT) permettant une amplification. Un signal d'amplification est obtenu pour la plus forte quantité d'extrait introduite (0,9 µl). Témoins négatifs : blanc d'extraction et blanc de PCR. B - Confirmation de l'espèce identifiée par analyse des séquences d'ADN (16 275 fragments). Sur le panneau du haut, la hauteur de chaque lettre indique la fréquence relative du nucléotide correspondant, et le nucléotide prédominant est placé en position supérieure. Seule la séquence située entre les amorces de PCR est présentée. Le panneau du bas montre que la séquence consensus est identique à la séquence de référence du génome mitochondrial de *Cervus elaphus* (GenBank : NC_007704) et présente 2 à 3 substitutions par rapport aux fragments orthologues de *Rangifer tarandus* (NC_007703), *Capreolus capreolus* (NC_020684) *Dama dama* (NC_020700) et *Megaloceros giganteus* (AM182645). C et D - Photographies de l'échantillon LF8-11. Échelle : 1 cm.

Detection of red deer (Cervus elaphus*) DNA in LF8-11 sample. A - Real-time PCR analysis carried out using the TaqMan assay for red deer mitochondrial DNA. The horizontal black line indicates the threshold used for calculating CT values. Note that a PCR signal is obtained using 0,9 µl of the DNA extract. Negative controls: PCR blank and mock extract. B- DNA sequencing (16,275 DNA reads) confirms the presence of red deer DNA in the sample. The upper panel displays the sequence logo derived from DNA reads. At each position, the upper letter corresponds to the predominant nucleotide. Only the sequence located between the PCR primers is shown. The lower part of the figure shows that the DNA sequence derived from LF8-11 is identical to the mitochondrial genome reference sequence of* Cervus elaphus *(GenBank : NC_007704) and displays 2-3 substitutions with the orthologous fragments of* Rangifer tarandus *(NC_007703),* Capreolus capreolus *(NC_020684),* Dama dama *(NC_020700,) and* Megaloceros giganteus *(AM182645) mitochondrial sequences. C and D - Photographs of the LF8-11 sample. Scale bar: 1 cm.*

Les figures 5A et 6A montrent les résultats des analyses réalisées sur les échantillons n° 18 et 19 au moyen des tests TaqMan pour le renne et le bison des steppes respectivement. Un signal d'amplification est obtenu pour les deux plus grandes (renne) ou la plus grande (bison des steppes) des quantités d'extraits utilisés. Là encore, l'amplification a été confirmée dans d'autres expériences sur plusieurs réplicas d'analyse (4 pour chacune des deux espèces). Enfin, l'amplification au moyen d'autres amorces permet de vérifier par séquençage la présence d'ADN de renne dans l'échantillon n° 18 (**fig. 5B**) et de bison des steppes dans l'échantillon n° 19 (**fig. 6B**).

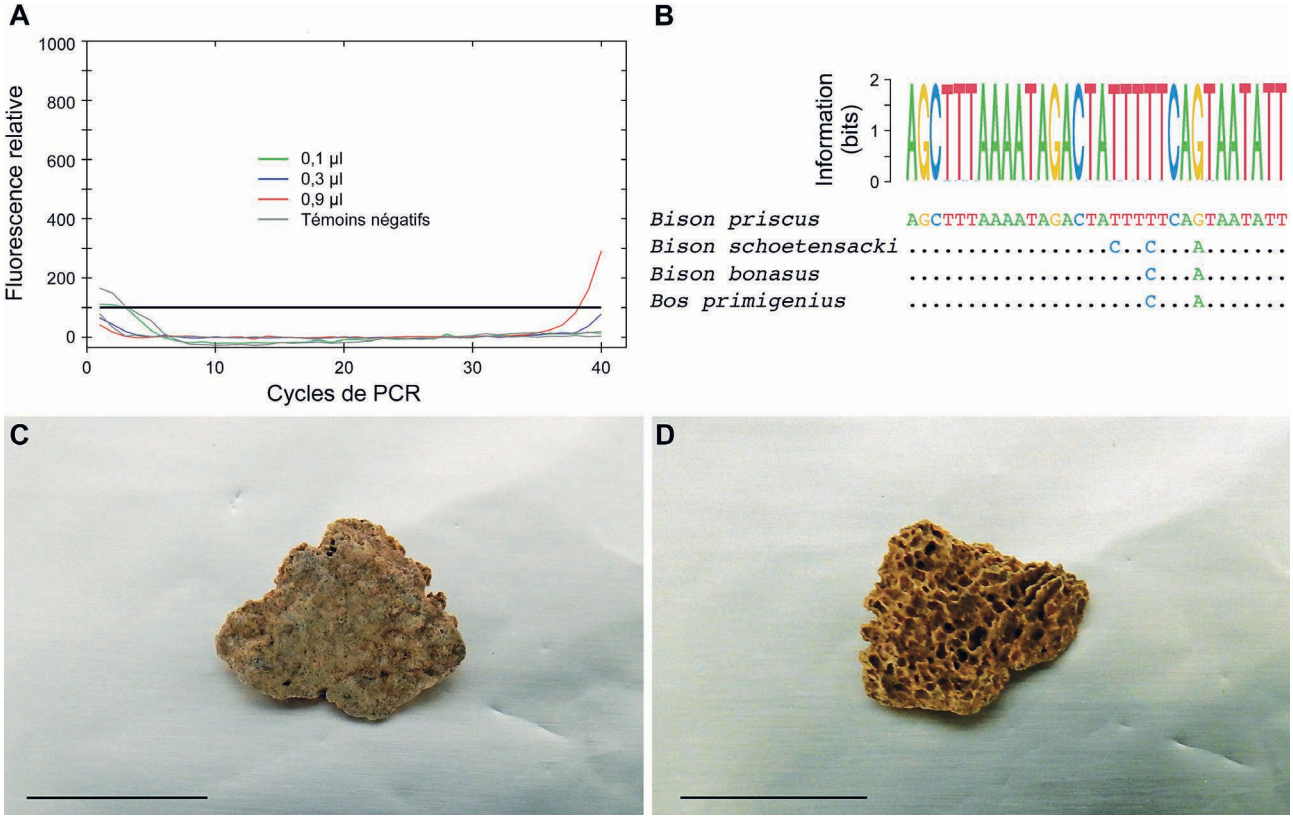
Considérant que les analyses génétiques témoignent de la préservation de la matière organique dans les échantillons n° 11, 18 et 19, ceux-ci ont été sélectionnés pour des datations radiocarbone. Préalablement aux datations, des analyses ATR-FTIR ont été effectuées pour obtenir une information quantitative sur le collagène présent dans les trois échantillons. Les mesures ATR-FTIR indiquent une bonne préservation du collagène, avec des teneurs comprises entre 5,0 et 9,4 % (**tabl. 3**). Ces valeurs sont confirmées par la détermination du collagène extrait, compris entre 3,4 et 8,7 % de la masse osseuse. La pureté du collagène extrait est démontrée par le rapport C/N, compris entre 3,2 et 3,3. Ces données se situent dans le domaine des valeurs habituellement considérées (% de collagène > 1 %, C/N compris entre 2,9 et 3,6) pour entreprendre une datation radiocarbone (Van Klinken 1999 ; Brock *et al.* 2010 ; Zazzo *et al.* 2019). Le tabl. 3 montre les dates obtenues pour les trois échantillons. L'intervalle de confiance associé à chaque mesure est élevé du fait de l'ancienneté des échantillons, qui est proche de la limite d'application de la méthode de datation par le ^{14}C. Les trois fragments osseux ont en effet tous des âges supérieurs à 40 000 cal. BP, et l'échantillon de bison des steppes est particulièrement ancien.



— FIGURE 5 —

Détection d'ADN de renne *(Rangifer tarandus)* dans l'échantillon LF8-18. A - Analyse par PCR en temps réel au moyen du test TaqMan conçu pour la recherche d'ADN mitochondrial de renne. Un signal d'amplification est obtenu pour les plus fortes quantités d'extrait introduites (0,3 et 0,9 µl). Témoins négatifs : blanc d'extraction et blanc de PCR. B - Confirmation de l'espèce identifiée par analyse des séquences d'ADN (7 492 fragments). Sur le panneau du haut, la hauteur de chaque lettre indique la fréquence relative du nucléotide correspondant. Seule la séquence située entre les amorces de PCR est présentée. Le panneau du bas montre que la séquence consensus est identique à la séquence de référence du génome mitochondrial de *Rangifer tarandus* et présente 2 à 5 substitutions par rapport aux fragments orthologues de *Cervus elaphus*, *Capreolus capreolus*, *Dama dama* et *Megaloceros giganteus*. C et D - Photographies de l'échantillon LF8-18. Échelle : 1 cm.

Detection of reindeer (Rangifer tarandus) *DNA in LF8-18 sample. A - Real-time PCR analysis carried out using the TaqMan assay for reindeer mitochondrial DNA. Amplification signals are obtained using 0,3 µl and 0,9 µl of the DNA extract. Negative controls: PCR blank and mock extract. B- DNA sequencing (7,492 DNA reads) confirms the presence of reindeer DNA in the sample. The upper panel displays the sequence logo derived from DNA reads. Only the sequence located between the PCR primers is shown. The lower part of the figure shows that the DNA sequence derived from LF8-18 is identical to the mitochondrial genome reference sequence of* Rangifer tarandus, *and displays 2-5 substitutions with the orthologous fragments of* Cervus elaphus, Capreolus capreolus, Dama dama, *and* Megaloceros giganteus *mitochondrial sequences. C and D - Photographs of the LF8-18 sample. Scale bar: 1 cm.*



— FIGURE 6 —

Détection d'ADN de bison des steppes *(Bison priscus)* dans l'échantillon LF8-19. A - Analyse par PCR en temps réel au moyen du test TaqMan conçu pour la recherche d'ADN mitochondrial de bison des steppes. Un signal d'amplification significatif est obtenu pour la plus forte quantité d'extrait introduite (0,9 µl). Témoins négatifs : blanc d'extraction et blanc de PCR. B - Confirmation de l'espèce identifiée par analyse des séquences d'ADN (11 163 fragments). Sur le panneau du haut, la hauteur de chaque lettre indique la fréquence relative du nucléotide correspondant. Seule la séquence située entre les amorces de PCR est présentée. Le panneau du bas montre que la séquence consensus est identique à la séquence de référence du génome mitochondrial de *Bison priscus* (Genbank : NC_027233) et présente 2 à 3 substitutions par rapport aux fragments orthologues de *Bison schoetensacki* (NC_033873), *Bison bonasus* (NC_014044) et *Bos primigenius* (NC_013996). C et D - Photographies de l'échantillon LF8-19. Échelle : 1 cm.

Detection of steppe bison (Bison priscus) *DNA in LF8-19 sample. A - Real-time PCR analysis carried out using the TaqMan assay for steppe bison mitochondrial DNA. Note that a PCR signal is obtained using 0,9 µl of the DNA extract. Negative controls: PCR blank and mock extract. B- DNA sequencing (11,163 DNA reads) confirms the presence of steppe bison DNA in the sample. The upper panel displays the sequence logo derived from DNA reads. Only the sequence located between the PCR primers is shown. The lower part of the figure shows that the DNA sequence derived from LF8-19 is identical to the mitochondrial genome reference sequence of* Bison priscus *(Genbank : NC_027233), and displays 2-3 substitutions with the orthologous fragments of* Bison schoetensacki *(NC_033873),* Bison bonasus *(NC_014044), and* Bos primigenius *(NC_013996) mitochondrial sequences. C and D - Photographs of the LF8-19 sample. Scale bar: 1 cm.*

Échantillon	Espèce	Muséum ID	EchoMicadas ID	ATR-FTIR collagène (%)*	Extraction collagène (%)§	%C	%N	C/N	Âge ^{14}C (BP)	Âge calibré (cal. BP)
LF8-11	*Cervus elaphus*	20028	3497	5,0	3,4	35,4	12,8	3,24	40 300 ± 1 500	46 888 - 42 092
LF8-18	*Rangifer tarandus*	20029	3498	9,4	8,3	37,9	13,5	3,28	37 900 ± 1 100	44 059 - 40 935
LF8-19	*Bison priscus*	20030	3499	7,2	8,7	30,0	10,6	3,31	44 000 ± 2 400	54 991 - 43 475

— TABLEAU 3 —

Datation radiocarbone des échantillons dont l'ADN a été analysé avec succès. L'âge radiocarbone est indiqué en années avant le présent (BP). L'âge calibré (cal. BP) avec un intervalle de confiance de 95,4 % (2 σ) a été déterminé au moyen de la courbe de calibration IntCal20 et du logiciel Oxcal v4.4. * : % de collagène dans l'échantillon déterminé par les analyses ATR-FTIR ; § : collagène extrait, en % de la masse de l'échantillon.

AMS radiocarbon dates for samples successfully analysed for DNA content. The measured radiocarbon ages are indicated in years before present (BP). Calibrated dates (cal. BP) were calculated using the IntCal20 calibration curve and are displayed with a 95.4% (2σ) confidence interval. *: % collagen, as determined by ATR-FTIR analyses; §: collagen extracted (% of the mass of each sample).

3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Grâce à des recherches conduites d'abord dans les collections du musée d'Archéologie nationale et du Muséum national d'Histoire naturelle, puis dans les archives du musée de l'Homme et de l'Institut de paléontologie humaine, et directement sur le gisement, le contexte archéologique de La Ferrassie 8 a pu être mieux compris, éclairant la distribution spatiale des restes humains et des objets archéologiques issus des fouilles effectuées de 1968 à 1973, puis en 2014. Ces investigations ont conduit à des résultats inédits avec la découverte d'une part de quarante-sept nouveaux fossiles humains (Gómez-Olivencia *et al.* 2018) et l'obtention de données chronologiques (datations ^{14}C et OSL), protéomiques, génétiques, et taphonomiques sur les restes osseux humains et fauniques (Balzeau *et al.* 2020). Les résultats obtenus ici complètent et consolident ces informations.

Considérant le nombre limité de restes osseux du locus LF8 que les critères d'anatomie comparée ont permis d'identifier, des approches complémentaires apparaissaient nécessaires pour caractériser ces restes. Dans une précédente étude, l'analyse protéomique par ZooMS de 17 fragments osseux a fourni des informations sur 15 d'entre eux, identifiant un reste humain, 13 restes de bovinés (*Bos/Bison*) et un reste d'ours (*Ursus* sp.) (Balzeau *et al.* 2020). Le taux de succès est remarquablement élevé, mais comme la résolution de l'analyse est insuffisante pour identifier l'espèce, nous avons ici procédé directement à des analyses génétiques. Les résultats de nos études par PCR en temps réel et séquençage montrent la présence d'ADN de cerf, de renne et de bison des steppes dans des échantillons jusqu'à présent indéterminés.

Dans les échantillons anciens, l'ADN est sous forme de fragments courts portant des modifications, principalement des désaminations de cytosine, qui se traduisent par la présence de substitution (C vers T) dans les lectures lors du séquençage de l'ADN (Hofreiter *et al.* 2001 ; Stiller *et al.* 2006). Ces substitutions sont majoritairement localisées aux extrémités, comme le montre le séquençage réalisé sur des fragments d'ADN ligaturés à des adaptateurs pour la construction de banques (Briggs *et al.* 2007). Dans l'ADN directement issu d'une amplification par PCR (sans ligature préalable à des adaptateurs), les extrémités des fragments correspondent aux séquences des amorces et les substitutions C/T sont donc moins aisément décelables. On en repère néanmoins sur l'ADN amplifié à partir de l'échantillon n° 11, ce qui garantit la présence d'ADN ancien de cerf authentique dans cet échantillon. Dans les échantillons 18 et 19, nos analyses par séquençage ne mettent pas en évidence de substitutions de base, et la question d'une contamination par de l'ADN actuel peut se poser. De nombreux éléments montrent toutefois que des contaminations ne peuvent expliquer nos résultats : 1) l'ADN a été amplifié avec succès à partir d'une minorité d'échantillons (trois sur les vingt analysés) ; 2) pour chacun des échantillons positifs, une seule des dix espèces testées a été détectée ; 3) lorsque l'ADN d'une espèce a été détectée, deux paires d'amorces ciblant des fragments différents du génome mitochondrial ont été utilisées avec succès ; 4) l'ancienneté des échantillons a été confirmée par la datation radiocarbone directe. Il est donc légitime de conclure que les échantillons 11, 18 et 19 correspondent à des esquilles osseuses pléistocènes de cerf, de renne et de bison, respectivement.

Dans le registre fossile du locus LF8, le renne était connu par un reste identifié au moyen de l'anatomie comparée. Le bison des steppes était fortement suspecté du fait du nombre important d'échantillons dont la signature ZooMS était *Bos/Bison* et de la découverte de plusieurs fragments dont l'assemblage reconstitue une corne partielle de bison (Balzeau *et al.* 2020). La présence de cerf est ici formellement démontrée pour la première fois. Ces données fauniques vont pouvoir être intégrées aux autres archives du site sur le paléoenvironnement.

Les dates ^{14}C de cette étude sont comprises entre 44 000 ± 2 400 et 37 900 ± 1 100 BP, soit 55 000 à 41 000 ans cal. BP environ. Elles sont donc dans le même horizon chronologique que les 16 dates obtenues précédemment sur ossements animaux (Balzeau *et al.* 2020), dont les valeurs étaient comprises entre 44 380 ± 980 et 34 030 ± 180 BP (49 100 à 38 600 cal. BP). Il est surtout frappant de constater que les nouvelles dates, même la plus ancienne (LF8-19, *Bison priscus*), sont plus récentes que celles obtenues sur des sédiments (60 000 ± 7 000 ans) prélevés dans le même horizon stratigraphique que LF8 à partir d'une section adjacente. Bien qu'il convienne de rester prudent concernant des âges dont les valeurs sont proches de la limite d'application de la méthode de datation par le ^{14}C, ceci conforte la conclusion que l'enfant LF8 et les restes animaux avoisinants sont intrusifs dans une couche sédimentaire plus ancienne. Des études complémentaires sur les autres squelettes néandertaliens de La Ferrassie, si elles peuvent être entreprises, sont souhaitables pour obtenir la même quantité d'information que celle désormais disponible pour LF8. L'approche multidisciplinaire devra aussi être étendue à d'autres squelettes et sites néandertaliens, afin de livrer des données robustes pour mieux contextualiser les informations à la fois au niveau du site et à l'échelle régionale.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée grâce au financement accordé par le Muséum national d'Histoire naturelle de Paris au projet GENFER8, présenté dans le cadre de l'appel à projet fédérateur du département Homme et Environnement. Nous remercions Mme Catherine Louboutin (Musée d'Archéologie nationale, Saint-Germain-en-Laye, France) pour l'autorisation de réaliser l'analyse des échantillons du locus LF8 de La Ferrassie. Nous remercions également la Plateforme Analytique du MNHN, site du Musée de l'Homme (plateau technique de Paléogénomique et Génétique Moléculaire, et plateau de Spectrométrie Infrarouge) et l'équipe ECHoMicadas (F. Thil et N. Tisnérat-Laborde ; Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement, CEA Saclay) où les expériences ont été réalisées.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BALZEAU A., TURQ A., TALAMO S., DAUJEARD C., GUERIN G., WELKER F., CREVECOEUR I., FEWLASS H., HUBLIN J.-J., LAHAYE C., MAUREILLE B., MEYER M., SCHWAB C., GÓMEZ-OLIVENCIA A. 2020 - Pluridisciplinary evidence for burial for the La Ferrassie 8 Néandertal child. *Scientific Reports*, 10, 21230.

BECAM G., VERNA C., GÓMEZ-ROBLES A., GÓMEZ-OLIVENCIA A., ALBESSARD L., ARNAUD J., FRELAT M.A., MADELAINE S., SCHWAB C., SOUDAY C., TURQ A., BALZEAU A. 2019 - Isolated teeth from La Ferrassie: Reassessment of the old collections, new remains, and their implications. *American Journal of Physical Anthropology*, 169, 132-142.

BEMBOM O. 2019 - seqLogo: Sequence logos for DNA sequence alignments. R package version 1.52.0.

BRIGGS A.W., STENZEL U., JOHNSON P.L., GREEN R.E., KELSO J., PRÜFER K., MEYER M., KRAUSE J., RONAN M.T., LACHMANN M., PÄÄBO S. 2007 - Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Néandertal. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104, 14616-14621.

BROCK F., HIGHAM T., BRONK RAMSEY C. 2010 - Pre-screening techniques for identification of samples suitable for radiocarbon dating of poorly preserved bones. *Journal of Archaeological Science,* 37, 855–865.

BRONK RAMSEY C. 2009 - Bayesian analysis of radiocarbon dates. *Radiocarbon*, 51, 337-360.

BUCKLEY M., COLLINS M.J., THOMAS-OATES J., WILSON J.C. 2009 - Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* 23, 3843–3854.

CAPITAN L., PEYRONY D. 1909 - Deux squelettes humains au milieu de foyers de l'époque moustérienne. *Comptes rendus des séances de l'Académie des Inscriptions et Belles-Lettres*, 53, 797-806.

CAPITAN L., PEYRONY D. 1911 - Un nouveau squelette humain fossile. *Comptes rendus des séances de l'Académie des Inscriptions et Belles-Lettres*, 55, 224-227.

CAPITAN L., PEYRONY D. 1912 - Trois nouveaux squelettes humains fossiles. *Comptes rendus des séances de l'Académie des Inscriptions et Belles-Lettres*, 56, 449–454.

CERSOY S., ZAZZO A., ROFES J., TRESSET A., ZIRAH S., GAUTHIER C., KALTNECKER E., THIL F., TISNERAT-LABORDE N. 2017 - Radiocarbon dating minute amounts of bone (3-60 mg) with ECHoMICADAS. *Scientific Reports*, 7, 7141.

DELPORTE H. 1984 - Le grand abri de la Ferrassie : fouilles 1968-1973. Paris : Éditions du Laboratoire de Paléontologie Humaine et de Préhistoire, 277 p.

GÓMEZ-OLIVENCIA A., CREVECOEUR I., BALZEAU A. 2015 - La Ferrassie 8 Néandertal child reloaded: new remains and re-assesment of the original collection. *Journal of Human Evolution*, 82, 107-126.

GREEN R.E., MALASPINAS A.S., KRAUSE J., BRIGGS A.W., JOHNSON P.L., UHLER C., MEYER M., GOOD J.M., MARICIC T., STENZEL U., PRÜFER K., SIEBAUER M., BURBANO H.A., RONAN M., ROTHBERG J.M., EGHOLM M., RUDAN P., BRAJKOVIC D., KUCAN Z., GUSIC I., WIKSTRÖM M., LAAKKONEN L., KELSO J., SLATKIN M., PÄÄBO S. 2008 - A complete Néandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing. *Cell*, 134, 416-426

GUÉRIN G., FROUIN M., TALAMO S., ALDEIAS V., BRUXELLES L., CHIOTTI L., DIBBLE H.L., GOLDBERG P., HUBLIN J.-J., JAIN M., LAHAYE C., MADELAINE S., MAUREILLE B., McPHERRON S.J.P., MERCIER N., MURRAY A.S., SANDGATHE D., STEELE T.E., THOMSEN K.J., TURQ A. 2015 - A multi-method luminescence dating of the Palaeolithic sequence of La Ferrassie based on new excavations adjacent to the La Ferrassie 1 and 2 skeletons. *Journal of Archaeological Science*, 58, 147-166.

HEIM J.L. 1984 - *In*: Delporte H. (éd.), *Le grand abri de la Ferrassie : fouilles 1968-1973*. Paris : Éditions du Laboratoire de Paléontologie Humaine et de Préhistoire, p. 249–271.

HOFREITER M., JAENICKE V., SERRE D., VON HAESELER A., PÄÄBO S. 2001 - DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Research*, 29, 4793-4799.

KRINGS M., STONE A., SCHMITZ R.W., KRAINITZKI H., STONEKING M., PÄÄBO S. 1997 - Néandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, 90, 19-30.

KUTYAVIN I.V., AFONINA I.A., A. MILLS A., GORN V.V., LUKHTANOV E.A., BELOUSOV E.S., SINGER M.J., WALBURGER D.K., LOKHOV S.G., GALL A.A., DEMPCY R., REED M.W., MEYER R.B., HEDGPETH J. 2000 - 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research*, 28, 655-661.

LAVILLE H., TUFFREAU A. 1984 - *In*: Delporte H. (éd.), *Le grand abri de la Ferrassie : fouilles 1968-1973*. Paris : Éditions du Laboratoire de Paléontologie Humaine et de Préhistoire, p. 25-50.

LEBON M., REICHE I., GALLET X., BELLOT-GURLET L., ZAZZO A. 2016 - Rapid quantification of bone collagen content by ATR-FTIR spectroscopy. *Radiocarbon*, 58, 131-145.

LE GUILLOU Y., ELALOUF J.-M., FOURVEL J.-B, MAKSUD, F. 2021 - Les ours de la grotte de Niaux. *Préhistoire Art et Sociétés, Bulletin de la Société Préhistorique Ariège-Pyrénées*, 71, 29-60.

MAFESSONI F., GROTE S., DE FILIPPO C., SLON V., KOLOBOVA K.A., VIOLA B., MARKIN S.V., CHINTALAPATI M., PEYREGNE S., SKOV L., SKOGLUND P., KRIVOSHAPKIN A.I., DEREVIANKO A.P., MEYER M., KELSO J., PETER B., PRÜFER K., PÄÄBO S. 2020 - A high-coverage Néandertal genome from Chagyrskaya Cave. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 117, 15132-15136.

MARTIN M. 2011 - Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *European Molecular Biology Network journal*, 17, 10-12.

MAUREILLE B. 2002 - A lost Neanderthal neonate found. *Nature*, 419, 33–34.

PALACIO P., BERTHONAUD V., GUÉRIN C., LAMBOURDIÈRE J., MAKSUD F., PHILIPPE M., PLAIRE D., STAFFORD T., MARSOLIER-KERGOAT M.-C., ELALOUF J.-M. 2017 - Genome data on the extinct Bison schoetensacki establish it as a sister species of the extant European bison (Bison bonasus). *BioMed Central Evolutionary Biology*, 17, 48.

REIMER P.J., AUSTIN W.E.N., BARD E., BAYLISS A., BLACKWELL P.G., BRONK RAMSEY C., BUTZIN M., CHENG H., EDWARDS R.L., FRIEDRICH M., GROOTES P.M., GUILDERSON T.P., HAJDAS I., HEATON T.J., HOGG A.G., HUGHEN K.A., KROMER B., MANNING S.W., MUSCHELER R., PALMER J.G., PEARSON C., VAN DER PLICHT J., REIMER R.W., RICHARDS D.A., SCOTT E.M., SOUTHON J.R., TURNEY C.S.M., WACKER L., ADOLPHI F., BÜNTGEN U., CAPANO M., FAHRNI S.M., FOGTMANN-SCHULZ A., FRIEDRICH R., KÖHLER P., KUDSK S., MIYAKE F., OLSEN J., REINIG F., SAKAMOTO M., SOOKDEO A., TALAMO S. 2020 - The IntCal20 Northern hemisphere radiocarbon age calibration curve (0-55 cal kBP). *Radiocarbon*, 62, 725-757.

SLON V., HOPFE C., WEIß C.L., MAFESSONI F., DE LA RASILLA M., LALUEZA-FOX C., ROSAS A., SORESSI M., KNUL M.V., MILLER R., STEWART J.R., DEREVIANKO A.P., JACOBS Z., LI B., ROBERTS R.G., SHUNKOV M.V., DE LUMLEY H., PERRENOUD C., GUSIC I., KUCAN Ž., RUDAN P., AXIMU-PETRI A., ESSEL E., NAGEL S., NICKEL B., SCHMIDT A., PRÜFER K., KELSO J., BURBANO H.A., PÄÄBO S., MEYER M. 2017 - Néandertal and Denisovan DNA from Pleistocene sediments. *Science*, 356, 605-608.

STILLER M., GREEN R.E., RONAN M., SIMONS J.F., DU L., HE W., EGHOLM M., ROTHBERG J.M., KEATES S.G., OVODOV N.D., ANTIPINA E.E., BARYSHNIKOV G.F., KUZMIN Y.V., VASILEVSKI A.A., WUENSCHELL G.E., TERMINI J., HOFREITER M., JAENICKE-DESPRES V., PÄÄBO S. 2006 - Patterns of nucleotide misincorporations during enzymatic amplification and direct large-scale sequencing of ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 13578-13584

SYNAL H.-A., STOCKER M., SUTER, M. 2007 - MICADAS: A new compact radiocarbon AMS system. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 259, 7–13.

TURQ A., DIBBLE H., GOLDBERG P., MCPHERRON S.J.-P., SANDGATHE D., MERCIER N., BRUXELLES L., LAVILLE D., MADELAINE S. 2012 - Reprise des fouilles dans la partie ouest du gisement de la Ferrassie, Savignac-de-Miremont, Dordogne : problématique et premiers résultats. *In*: Bertran P. & Lenoble A. (Eds.), *Quaternaire continental d'Aquitaine : un point sur les travaux récents*. Association des Sédimentologistes Français, p. 78-87.

UTGE J., SEVEQUE N., LARTIGOT-CAMPIN A.-S., TESTU A., MOIGNE A.-M., VEZIAN R., MAKSUD F., BEGOUËN R., VERNA C., SORIANO S., ELALOUF J.-M. 2020 - A mobile laboratory for ancient DNA analysis. *Public Library of Science One*, 15 : e0230496.

VAN KLINKEN G.J. 1999 - Bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements. *Journal of Archaeological Science,* 26, 687–695.

WACKER L., BONANI G., FRIEDRICH M., HAJDAS I., BROMER K., NEMEC M., RUFF M., SUTER M., SYNAL H.A., VOCKENHUBER C. 2010 - MICHADAS: routine and high-precision radiocarbon dating. *Radiocarbon*, 52, 252-262.

ZAZZO A., LEPETZ S., MAGAIL J., GANTULGA J.-O. 2019 - High-precision dating of ceremonial activity around a large ritual complex in Late Bronze Age Mongolia. *Antiquity*, 93, 80-98.