

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

*ISOLAMENTO GENETICO NELLE ULTIME POPOLAZIONI
NEANDERTALIANE PRIMA DELLA LORO ESTINZIONE*

Relatore: Professor Luca Pagani
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Emma Maria Pilastro

Anno Accademico 2023/2024

Indice

Abstract.....	1
Stato dell'arte.....	2
Approccio sperimentale.....	4
a. Identificazione tassonomica e dating.....	4
b. Controllo qualità e contaminazione.....	6
c. Analisi filogenetica e demografica.....	7
d. Valutazione isolamento e inbreeding.....	10
Risultati.....	11
Bibliografia.....	15

Abstract

In questo articolo viene analizzato il genoma di Thorin, un individuo appartenente ad una delle ultime popolazioni neandertaliane che ha abitato la grotta Mandrin nella Francia mediterranea meno di 10,000 anni prima dell'estinzione della specie.

L'analisi dei genomi di Neanderthal, estratti da resti ossei ritrovati negli ultimi due secoli in numerosi siti in tutta Europa, stanno contribuendo a creare un'immagine sempre più dettagliata e complessa della struttura demografica delle loro popolazioni. Il genoma di Thorin ha rivelato una profonda divergenza rispetto ai genomi neandertaliani tardivi provenienti da altre aree geografiche, segnali relativamente meno forti di ibridazione con l'uomo moderno ed elevati livelli di omozigosi. Complessivamente questi risultati suggeriscono che Thorin sia appartenuto ad un piccolo gruppo rimasto isolato per circa 50,000 anni dalle altre popolazioni che abitavano territori relativamente vicini, in contrasto con la precedente teoria che gli ultimi neandertaliani formassero un'unica popolazione geneticamente omogenea.

L'analisi dei risultati ottenuti può essere fondamentale per valutare le ipotesi, ancora dibattute, di quali possano essere state le cause che hanno portato all'estinzione degli uomini di Neanderthal.

I. STATO DELL'ARTE

Gli uomini di Neanderthal hanno abitato l'Eurasia occidentale a partire da almeno 430 mila anni fa e le cause della loro estinzione, avvenuta circa 40 mila anni fa, sono tutt'oggi ancora dibattute.

La scoperta di numerosi individui appartenenti a questa popolazione ha permesso, negli ultimi decenni, di ricostruire una immagine sempre più complessa della loro distribuzione geografica e struttura sociale. Attualmente sono disponibili dati genomici relativi ad individui provenienti da numerosi siti archeologici diversi, che offrono una panoramica dettagliata della storia dei Neanderthal coprendo gran parte del vasto territorio occupato, che si estendeva dalla penisola di Gibilterra alle montagne dell'Altai nel sud della Siberia.

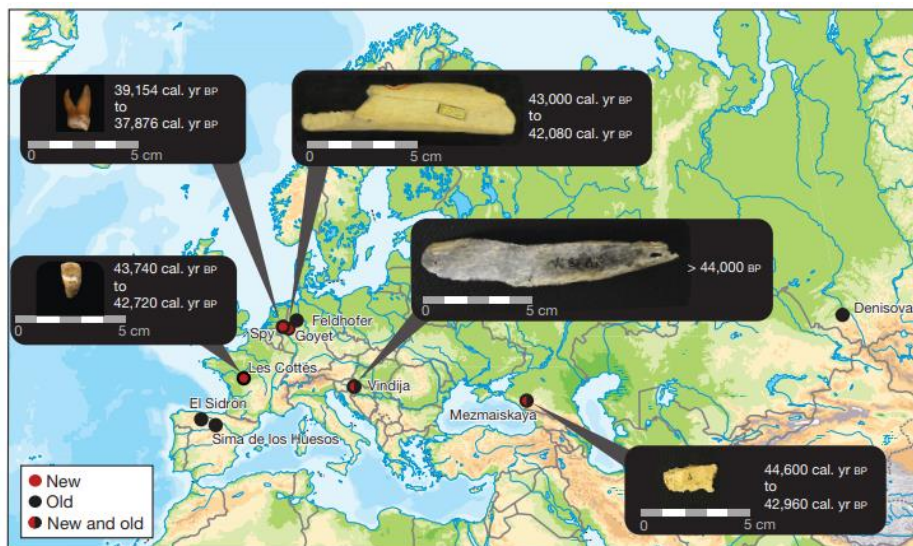


Figura 1 Localizzazione ed età dei reperti neandertaliani analizzati in questo studio e altri reperti per cui erano già stati precedentemente pubblicati dati genomici completi

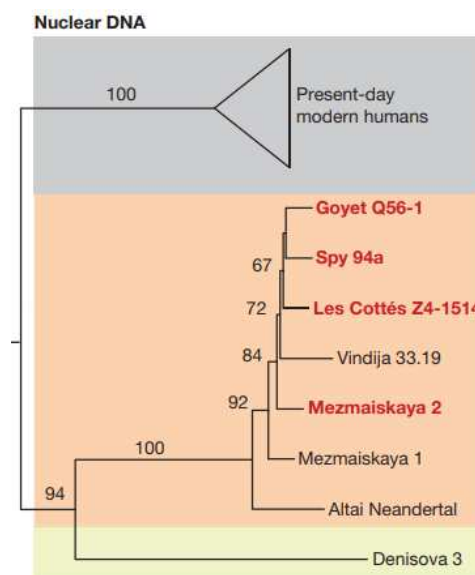
Dal punto di vista genetico, a linea più divergente ad ora conosciuta è quella del Neanderthal dell'Altai, uno dei campioni più orientali mai trovati, nonché uno dei genomi ad alta copertura di cui siamo in possesso insieme a Vindija 33.19, proveniente dall'omonima Grotta in Croazia. Tra questi due individui, risalenti rispettivamente a circa 120 e 44 mila anni fa, è stata evidenziata un'elevata divergenza genetica, legata probabilmente alla distanza geografica e temporale che li separa.

L'evoluzione di nuovi approcci statistici e computazionali, insieme allo sviluppo di nuove tecniche volte ad analizzare con efficacia anche campioni con elevati livelli di contaminazione microbica e da DNA umano moderno, ha consentito di analizzare e studiare anche i genomi a bassa copertura, permettendo di tracciare una sempre più completa valutazione delle relazioni tra i diversi individui e le loro discendenze.

Grazie a queste nuove analisi è stato possibile determinare che i Neanderthal provenienti dall'Europa dell'ovest (Goyet Q56-1, Spy 94a, e Les Cottés Z4-1514) e Mezmaiskaya 2, rinvenuto nell'omonima grotta nel Caucaso settentrionale, risultano maggiormente imparentati con Vindija 33.19 rispetto al Neanderthal dell'Altai, e formano quindi un clade (Figura 2). Interessante eccezione è il secondo individuo rinvenuto nella grotta del Caucaso (Mezmaiskaya 1), datato tra i 60 e i 70 mila anni fa, che mostra invece un minore livello di similarità con Vindija, suggerendo un evento di turnover di popolazione nella grotta russa. Questa analisi genetica suggerirebbe che i tardi Neanderthal appartenessero ad una singola metapopolazione, senza significative evidenze di una più profonda struttura di popolazione (Hajdinjak et al. 2018).

Figura 2 Albero filogenetico neighbour-joining costruito sul genoma nucleare di tardi Neanderthal.

Questo albero, basato sulla conta del numero totale di trasversioni autosomiche, mostra un'apparente divisione basata sull'età, con la separazione per primo del Neanderthal dell'Altai e poi di Mezmaiskaya 1, mentre i tardi Neanderthal vanno a formare un clade.



In questo articolo viene analizzato un nuovo reperto rinvenuto nella grotta Mandrin, nella Francia mediterranea. Diversi metodi di datazione dei reperti scheletrici e stratigrafici hanno permesso di attribuire un'età di circa 50 mila anni al Neanderthal, che rappresenta quindi un esemplare relativamente recente della specie in Europa. I risultati dell'analisi genomica presentati in questo studio suggeriscono che questo individuo, soprannominato Thorin, appartenga ad una piccola popolazione di tardi Neanderthal rimasta isolata dal resto delle popolazioni europee (per quanto ci è dato sapere sulla base dei campioni analizzati finora) per circa 50 mila anni, come suggerito dagli elevati livelli di omozigosi e dalla profonda divergenza con gli altri tardi Neanderthal europei, anche di età confrontabile. La scoperta di Thorin fornisce quindi un nuovo spunto di analisi che permette di valutare la presenza in Europa di una struttura di popolazione più complessa di quanto precedentemente ipotizzato, formata anche da piccole comunità isolate tra loro, e di come questa struttura di popolazione possa aver giocato un importante ruolo nell'estinzione della specie.

II. APPROCCIO SPERIMENTALE

a. Identificazione tassonomica e dating

Una delle prime valutazioni compiute sui nuovi frammenti scheletrici ottenuti è stata l'analisi tramite **Collagen peptide mass fingerprinting**, o ZooMS (Zooarcheology by Mass Spectrometry), utilizzata per l'identificazione tassonomica: questa metodica permette di associare uno specifico profilo di fingerprinting del peptide collagene ad uno specifico taxa, oltre a costituire un metodo alternativo di screening per la datazione tramite radiocarbonio, grazie alla sua abilità di fornire informazioni sulla presenza e la qualità del collagene.

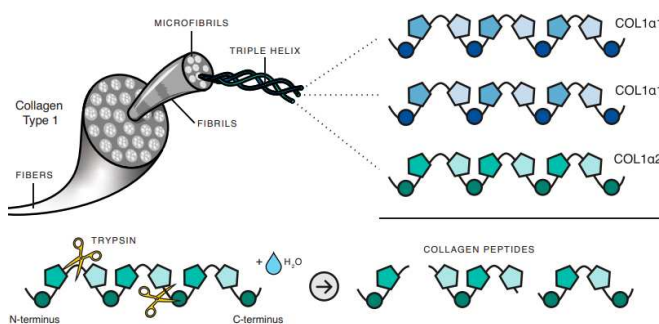


Figura 3 A livello molecolare, l'analisi viene fatta sulla fibrilla COL1, una tripla elica composta da 3 polipeptidi COLA, due identici COL1a1 e uno COL1a2. Ogni catena è costituita dalla ripetizione del motivo amminoacidico G-X-Y: la Glicina (G) si inserisce all'interno del core centrale dell'elica rotatoria, mentre in posizione X e Y si trovano solitamente prolina e idrossiprolina. Quest'ultima stabilizza la tripla elica del collagene tramite la formazione di legami a idrogeno.

L'analisi è stata fatta su 33 frammenti ossei scoperti in stretto contatto con Thorin e che in base a caratteristiche fisiche, come dimensione e spessore, potevano essere di origine umana. Nella fase iniziale della ZooMS, la struttura del collagene (Figura 3) viene denaturata permettendo all'enzima tripsina di tagliare la proteina nei diversi peptidi, a livello dei quali sarà possibile evidenziare le differenze in massa e sequenza. Per prima cosa è però necessario estrarre il collagene dissolvendo la matrice minerale usando acido cloridrico (HCl) 0.6 M, seguito da ultrafiltrazione in bicarbonato di ammonio 50mM con filtro di cut-off fissato a 10kDa. I prodotti digeriti sono poi acidificati, purificati e posizionati su una piastra MALDI in matrice acida per sottoporre i campioni ad analisi tramite spettrometria di massa: la matrice è prima eccitata tramite un laser che porta i peptidi a vaporizzare e ionizzare, e gli ioni sono poi indirizzati tramite elettromagneti in un tubo dove si separeranno in base alla massa (Figura 4).

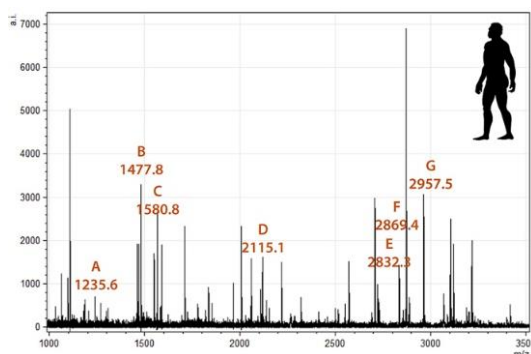


Figura 4 Spettro di massa del collagene umano. I marcatori specie specifici sono stati etichettati da A a G, e rappresentano peptidi confermati dal sequenziamento del collagene umano (Richter et al. 2022).

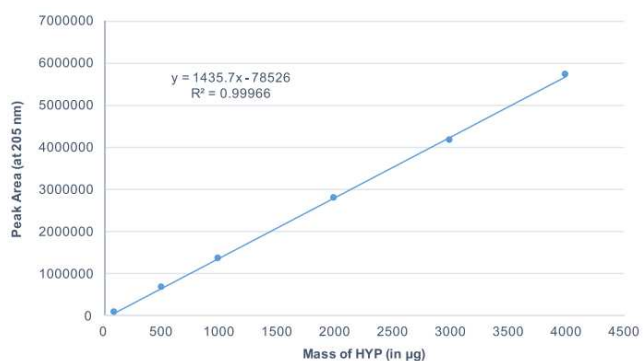
Lo spettro di massa prodotto dal detector è calibrato usando degli standard che convertono la massa in specifici rapporti massa-su-carica; in questo esperimento è stato usato un range m/z tra 700 e 3.700, e i picchi che ne risultano sono poi confrontati con i profili di riferimento.

Una delle tecniche di dating che si appoggia alla metodica sopra descritta è l'**AMS dating**, che utilizza uno spettrometro di massa con acceleratore per quantificare il contenuto di carbonio 14 nel campione. In questo caso l'analisi è stata però fatta estraendo dal collagene dell'osso l'idrossiprolina (Hyp), uno dei tre principali contribuenti della totalità del carbonio nel collagene dei mammiferi. Essa infatti costituisce circa il 13% della massa del collagene e, non essendo presente in quantità significative in altre proteine, può essere utilizzata come biomarcatore specifico dell'osso: poiché la datazione viene fatta a livello di una specifica frazione dell'osso precedentemente purificata, il suo isolamento costituisce una strategia per rendere i risultati dell'analisi più affidabili, limitando gli effetti delle contaminazioni.

I campioni di ossa sono stati prima demineralizzati attraverso trattamenti con acido cloridrico 0.5M e i componenti insolubili in acido, principalmente costituiti da collagene, sono stati poi risciacquati e trattati con idrossido di sodio 0.1M. Il collagene restante è stato poi gelatinizzato a 75°C per 20 ore in soluzione acquosa a pH=3, per poi essere liofilizzato per altre 20 ore. È stato poi aggiunto HCl 6M e il materiale è stato coperto con gas N₂, per creare un'atmosfera inerte, tappato e posizionato in un blocco riscaldante per 24 ore a 110°C, per favorire l'idrolisi. Durante questo processo vengono rotti i legami peptidici del collagene, con conseguente liberazione degli aminoacidi che lo compongono, tra cui l'idrossiprolina (Figura 5), che verrà poi isolata tramite separazione HPLC (High-Performance Liquid Chromatography).

Figura 5 Curva di calibrazione per il contenuto di HYP.

Per quantificare l'idrossiprolina estratta è stata creata una curva di calibrazione usando l'area dei picchi di sei campioni a concentrazione di HYP conosciuta. Se l'area del picco ottenuta da un campione si trova al di sotto della curva, il campione non potrà essere ulteriormente analizzato per AMS dating.



I campioni ottenuti sono stati ossidati e grafitizzati e durante questi processi sono stati misurati e registrati i contenuti di carbonio e azoto, i rapporti atomici C:N e quelli isotopici, dati fondamentali per il processo di dating. Generalmente, perché possano essere sottoposti a AMS dating, nei reperti selezionati il collagene deve avere un rapporto C:N compreso tra 2.9 e 3.6; infatti solo in questo caso le ossa sono considerate databili. Utilizzando questa tecnica, che si focalizza sull'isolamento e la datazione di specifiche molecole piuttosto che sulla rimozione di molecole estranee potenzialmente contaminanti, si è in grado di limitare in modo sostanziale le contaminazioni e quindi di ottenere una datazione più fedele e accurata, anche per campioni di bassa qualità.

Inoltre, poiché durante i processi di separazione cromatografica è possibile che i campioni accumulino carbonio estraneo, alterando potenzialmente i risultati della datazione, sono stati sottoposti ad analisi anche campioni di controllo, con un contenuto iniziale in ^{14}C nullo; la datazione di questi campioni permette di evidenziare eventuali eventi di contaminazione e quindi correggere di conseguenza i valori ottenuti per i campioni di interesse, migliorando ulteriormente la precisione e affidabilità del metodo (Marom et al. 2013).

b. Controllo qualità e contaminazione

Per sequenziare e analizzare il DNA è fondamentale valutare e quantificare la presenza di DNA esogeno o moderno. Per prima cosa sono state fatte, a partire da un frammento della radice del primo molare, tre estrazioni sequenziali di DNA (E1, E2 e E3).

Analisi di deaminazione citosinica

Una prima analisi, ristretta solo alle reads con una qualità di almeno 30 e collocate in regioni altamente mappabili del genoma, è stata fatta per quantificare gli eventi di deaminazione citosinica, ovvero sostituzioni C > T e G > A, soprattutto nelle regioni terminali dei frammenti, tipiche di autentico DNA antico. Da questa prima analisi è emersa una quantità significativamente minore di frammenti con pattern di deaminazione nell'estrazione E1, e quindi livelli minori di DNA antico.

Stima contaminazione cromosoma X

Questo tipo di analisi sfrutta il fatto che Thorin sia un individuo maschio, dotato di un unico cromosoma X: alleli diversi osservati ad un determinato sito di questo cromosoma identificano errori nel sequenziamento o contaminazione. È stato quindi generato un file relativo al cromosoma X includendo esclusivamente le reads con una qualità superiore a 20, che è stato usato come input in un estimatore di contaminazione ANGSD (Analysis of Next Generation Sequencing Data) insieme ad un file HapMap contenente informazioni su frequenza e posizione degli SNPs di individui europei. Anche da questa analisi è emerso che la prima estrazione è significativamente più contaminata della seconda e della terza.

Stima contaminazione mtDNA

Per analizzare i livelli di contaminazione è poi stato utilizzato il DNA mitocondriale, spesso utilizzato per valutare la purezza dei campioni antichi: oltre a essere presente in copie multiple nella cellula e quindi più facilmente estraibile in grandi quantità anche in campioni ridotti, rispetto al DNA nucleare, è a singolo filamento e ha una struttura molecolare più semplice.

Da ogni libreria creata a partire dalle tre estrazioni sono quindi generate sequenze consenso, anche in questo caso scartando prima le reads non mappate o che presentavano hit alternative, e quelle con punteggio inferiore a 30, indicatore di bassa qualità. Le sequenze ottenute sono allineate con 311 sequenze di mtDNA moderno: questo tipo di analisi permette di evidenziare regioni di allineamento con il DNA moderno, probabilmente dovute a eventi di contaminazione.

Anche questa analisi ha confermato che le librerie costruite sulla prima estrazione risultavano contaminate in modo significativo rispetto a E2 e E3; escludendo dalle analisi la prima estrazione, il livello di contaminazione diminuisce fino ad una proporzione di autenticità di 0.997 (Figura 6).

Library	MAP Authentic
Thorin_1600_E1L1P2	0.8699825
Thorin_1600_E1	0.6715181
Thorin_1600_E1UL2P1	0.8793971
Thorin_1600_E1UL2P2	0.8043669
Thorin_1600_E1UL3P1	0.8193249
Thorin_1600_E1UL3P2	0.4080949
Thorin_1600_E2L1P2	0.8146678
Thorin_1600_E2L2P1	0.9847101
Thorin_1600_E2L2P2	0.9941028
Thorin_1600_E2	0.9197618
Thorin_1600_E2UL2P1	0.9976515
Thorin_1600_E2UL2P2	0.9964896
Thorin_1600_E2UL3P1	0.997005
Thorin_1600_E2UL3P2	0.9979215
Thorin_1600_E3L1P2	0.9706157
Thorin_1600_E3L2P1	0.984421
Thorin_1600_E3L2P2	0.9655722
Thorin_1600_E3	0.9200757
Thorin_1600_E3UL2P1	0.9975715
Thorin_1600_E3UL2P2	0.9871111
Thorin_1600_E3UL3P1	0.9967619
Thorin_1600_E3UL3P2	0.9965358
Thorin_1600 (all libraries)	0.7703653
Thorin_E2_E3	0.9973021

Figura 6 Proporzione di DNA antico nei campioni ottenuti dalle diverse estrazioni

Questo tipo di valutazioni preliminari sono fondamentali: da tutte le analisi è infatti emerso che la prima estrazione del campione di Thorin contiene quantità relativamente alte di contaminazione da DNA moderno rispetto alle estrazioni 2 e 3. Proprio per questo tutte le analisi successive sono state fatte solo su mtDNA e DNA nucleare ottenuti dalla seconda e dalla terza estrazione, dove il livello di contaminazione è complessivamente inferiore all'1%.

c. Analisi filogenetica e demografica

Fondamentale per comprendere la storia evolutiva di Thorin è l'analisi filogenetica per stabilire le relazioni con i genomi, sia ad alta che bassa copertura, sequenziati fino ad ora. Per fare questo è stato utilizzato il software **BEAST2**, piattaforma di analisi di sequenze molecolari basata sull'analisi filogenetica Bayesiana, approccio statistico che si basa sul calcolo della probabilità a posteriori, ovvero la probabilità che un albero sia quello corretto sulla base dei dati disponibili e delle assunzioni a priori. In questo modo è possibile avere una stima della *likelihood* degli alberi filogenetici generati e permette quindi di testare diverse ipotesi evoluzionistiche senza essere legato ad una specifica topologia di albero, usando modelli con vincoli stretti (*strict*) o rilassati (*relaxed*) (Nascimento et al. 2017).

In questo studio, il software è stato utilizzato per effettuare la datazione molecolare della sequenza di Thorin mediante "tip-dating" e per stimarne i tempi di divergenza della sua clade, includendo nell'analisi le sequenze

mitocondriali di 24 Neanderthal, 1 Denisoviano, 9 genomi umani antichi e 53 genomi di umani moderni, considerando soltanto siti all'interno della regione codificante ed escludendo la regione del *D-loop*. I modelli bayesiani costruiti con BEAST si basano sull'ipotesi dell'*orologio molecolare*, secondo la quale i tassi di mutazione e di sostituzione rimangono costanti lungo le discendenze di un albero filogenetico. Proprio per questo, discendenze che si originano nello stesso periodo dovrebbero avere la medesima distanza genetica dalla radice. Questo implica anche che la distanza molecolare di una particolare sequenza rispetto alla radice dovrebbe essere proporzionale alla quantità di tempo accumulato dalla radice al momento in cui la sequenza è stata campionata, permettendo così la datazione dei rami terminali. Poiché in realtà il tasso di evoluzione costante lungo i diversi rami dell'albero non è sempre rispettato, sono stati fatti due set di analisi, il primo con una frequenza di sostituzione prefissata a $1,57 \times 10^{-8}$ sostituzioni/pb/anno e un secondo con un tasso di sostituzione variabile.

Per la costruzione dell'albero reperti già in precedenza datati sono stati utilizzati come punti di calibrazione, ovvero dati conosciuti a priori utilizzati per migliorare l'accuratezza dell'albero stesso, e i loro intervalli di confidenza al 95% sono stati impostati come distribuzione a priori uniforme. Per i Neanderthal non datati è stato invece usato un valore iniziale di 50,000 anni e un prior uniforme compreso tra 30 e 300 mila anni fa, per permettere al modello di esplorare qualsiasi valore all'interno di quell'intervallo, evitando di forzare il modello verso la specifica ipotesi iniziale. Un prior uniforme è stato anche stabilito per il TMRCA (Time to the Most Recent Common Ancestor) sia per i Neanderthal, da 100,000 all'infinito, che per gli uomini moderni, da 50,000 anni fa all'infinito.

È stata poi fatta una successiva analisi dal punto di vista demografico usando ***mom2*** (MOran Models for Interference), software di inferenza demografica in grado di computare l'SFS (Spettro di Frequenza dei Siti): questo approccio statistico, usato comunemente in genetica di popolazione, è in grado di descrivere la distribuzione delle frequenze di SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) all'interno di un campione di individui in una popolazione. Questo modello si basa sull'ipotesi che diverse storie evolutive di popolazioni lascino tracce diverse sull'SFS. L'obiettivo dell'analisi demografica è proprio quello di comprendere la storia evolutiva di diverse discendenze, o popolazioni, all'interno di una specie, stimando le dinamiche di marcatori neutrali che riflettono la storia demografica come tempo di divergenza, espansione o contrazione di popolazione, e gli effetti di deriva genetica (Kamm et al. 2020). Questo software non solo permette di ricostruire la storia evolutiva di un insieme di popolazioni, ma anche di elaborare e testare modelli validi per valutare nuove ipotesi, includendo nell'analisi anche campioni a bassa copertura, rappresentati da genotipi pseudoaploidi, usando un SFS con

accertamento limitato ai 4 genomi ad alta qualità con genotipi diploidi (Altai Neanderthal, Chagyrskaya 8, Vindija 33.19 e Denisoviano).

Per trovare il modello demografico più adatto, è stata prima creata una struttura demografica di base usando i genomi degli individui ad alta copertura e incorporando eventi demografici inferiti, tra cui:

- una discendenza arcaica comune ai Neanderthal e Denisoviani, che diverge da quella degli uomini moderni
- i primi Neanderthal siberiani, rappresentati dall'Altai Neanderthal, che si sono distaccati per primi dal clade neandertaliano
- introggressione di una ghost lineage "super arcaica" nel Denisoviano
- eventi di flusso genico dall'Altai al Denisoviano

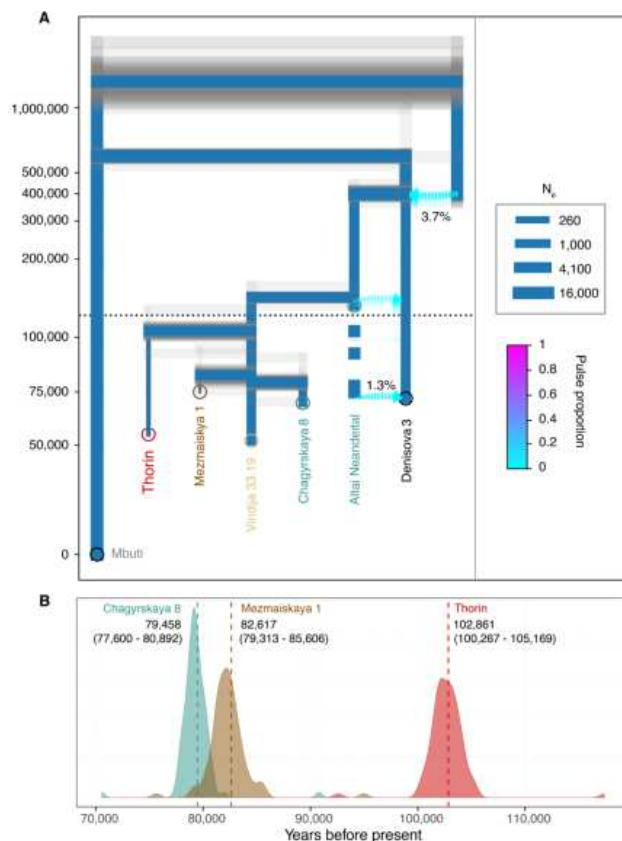
In oltre, le dimensioni delle popolazioni per ogni campione di Neanderthal a livello dei tip dell'albero sono state parametrizzate in decadimento esponenziale a partire dalla loro divergenza fino all'età effettiva del campione. Sono state fatte 10 repliche indipendenti, modificando i valori iniziali, in modo da trovare il modello migliore.

Sono poi stati aggiunti a questo schema di base i due campioni low coverage Thorin e Mezmaiskaya, definiti come divergenze indipendenti dal lineage di Vindija 33.19, permettendo alle due discendenze di divergere in un qualsiasi momento dopo la separazione di Vindija dall'Altai Neanderthal. Anche in questo caso sono state fatte 10 repliche, per testare diversi parametri e individuare il modello migliore (Figura 7).

Figura 7 Descrizione della storia demografica di Thorin:

(A) Migliore modello demografico che mette in relazione il genoma di Thorin con quello Denisoviano e degli altri Neanderthal. I rami blu rappresentano le stime puntuali della dimensione delle popolazioni. In grigio sono segnate invece le stime ottenute da 100 bootstrap.

(B) rappresentazione grafica dei tempi di divergenza delle diverse discendenze. Le linee verticali tratteggiate rappresentano una stima puntuale dei tempi di divergenza tra le popolazioni. Le curve colorate rappresentano invece la densità delle distribuzioni bootstrap.



d. Valutazione dell'isolamento e dell'inbreeding

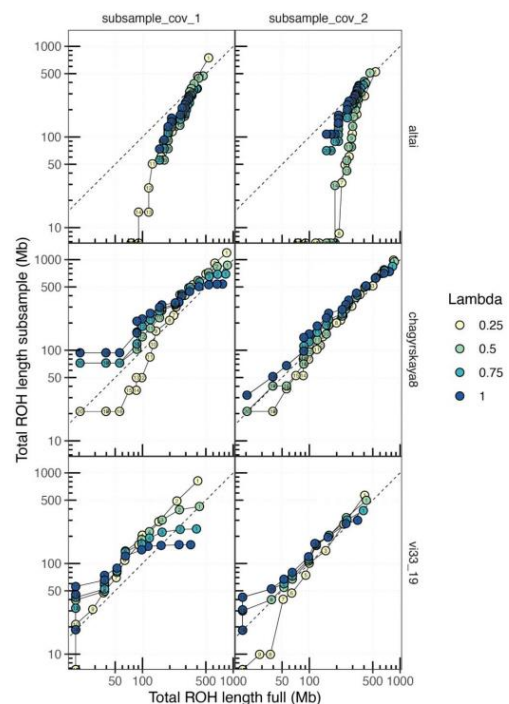
Per ottenere ulteriori informazioni sulla popolazione a cui Thorin apparteneva è stata infine condotta un'ultima analisi per esaminare in modo indiretto il grado di isolamento della popolazione confrontando il livello di inbreeding di Thorin rispetto a quello degli altri Neanderthal disponibili in letteratura. Per fare questo sono state quantificate le Runs Of Homozygosity (ROH), porzioni più o meno lunghe in cui il genoma risulta essere in omozigosi. A partire dagli anni '90, lo sviluppo nelle tecnologie di analisi di microsatelliti a livello genomico ha permesso di identificare queste lunghe regioni in omozigosi come indicatori distintivi della presenza di segmenti autozigoti ereditati da un recente progenitore comune, fornendo così un'evidenza diretta di recenti eventi di isolamento e inbreeding e offrendo informazioni preziose sulla struttura e sulla storia evolutiva di una popolazione (Ceballos et al. 2018).

In questo articolo sono state analizzate attraverso un nuovo approccio che usa una tecnica di *spatial smoothing* (levigazione/smussamento spaziale) delle sequenze alleliche all'interno del singolo genoma, necessario per eliminare il rumore di fondo e favorire l'analisi di pattern significativi, come appunto le ROH. Per prima cosa viene creato come riferimento un set di SNPs bi-allelici polimorfici tra un genoma umano (HGDP01029, San) e i quattro genomi arcaici ad alta copertura (Altai, Chagyrskaya 8, Vindija 33.19, Denisova). Per ognuno dei Neanderthal a bassa copertura sono poi tabulate le frequenze dei due alleli per ogni SNP con due o più reads nel genoma target. Si ottiene così un vettore, formato da frequenze alleliche di reads minori lungo ogni cromosoma, che viene poi smussato tramite *fused lasso* secondo uno specifico parametro λ (Figura 8): per evidenziare le ROH, le reads sono state legate insieme a formare segmenti unici.

Figura 8 Analisi delle ROH nei sottocampioni usando diversi valori di λ .

Il livello di smussamento è determinato tramite il parametro λ . Per trovare il valore di λ più adatto per l'analisi sono stati creati dei database contenenti tre genomi ad alta copertura (Altai Neanderthal, Chagyrskaya 8 e Vindija 33.19) precedentemente sottocampionati in modo casuale, per simulare una copertura media di 2X e 1X.

Valori di λ compresi tra 0.25 e 0.5 generano dei ROH molto simili a quelli rilevati nel campione completo, mentre valori tra 0.75 e 1 tendono a non rilevare segmenti brevi e quindi a sottostimare la lunghezza delle ROH. Entrambi questi effetti risultano particolarmente evidenti nei campioni a copertura 1X. Per questo per l'analisi delle ROH nel genoma di Thorin è stato usato un valore di λ pari a 0.5.



Un'altra possibile spiegazione genetica della discrepanza iniziale potrebbe essere legata al fatto che i Neanderthal in questo specifico clade abbiano un tasso di sostituzione leggermente minore (1.82×10^{-8}) rispetto ad altri tardi Neanderthal, nonostante il range di variazione lungo le diverse linee filogenetiche si sia mantenuto in un intervallo relativamente ristretto.

Particolarmente interessante è stata inoltre la valutazione del livello di omozigosi del genoma di Thorin (Figura 10): dall'analisi delle ROH è infatti emerso che il 7% del genoma analizzato è composto da sequenze di 5Mb, o maggiori, in omozigosi, inclusi 45Mb (~1,5%) in segmenti più lunghi di 20Mb, indicativi di inbreeding recente.

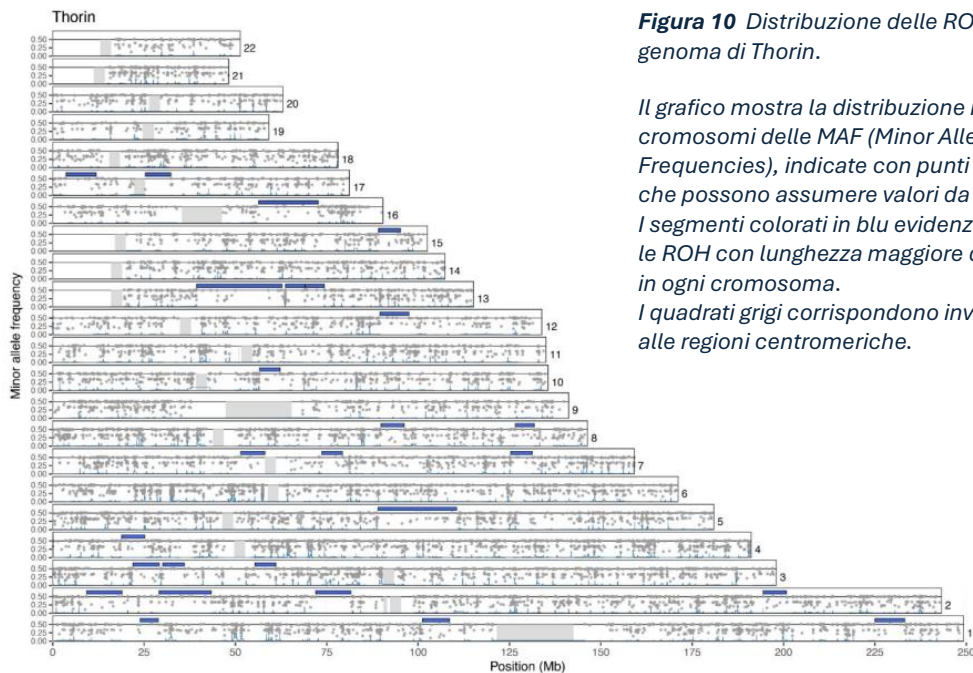


Figura 10 Distribuzione delle ROH nel genoma di Thorin.

Il grafico mostra la distribuzione nei cromosomi delle MAF (Minor Allele Frequencies), indicate con punti grigi, che possono assumere valori da 0 a 0.5. I segmenti colorati in blu evidenziano le ROH con lunghezza maggiore di 5Mb in ogni cromosoma. I quadrati grigi corrispondono invece alle regioni centromeriche.

Questi risultati suggeriscono piccole dimensioni dei gruppi di Neanderthal cui apparteneva Thorin ed elevato isolamento dalle altre popolazioni per le quali disponiamo di dati genomici. A questo proposito, è interessante notare che le dimensioni delle popolazioni di Neanderthal, generalmente inferiori a quelle delle popolazioni umane moderne e particolarmente basse per la linea evolutiva di Thorin, potrebbero essere sovrastimate di circa il 20%, come è stato suggerito da uno studio recentissimo pubblicato su *Science* (Li et al. 2024), per effetto delle dell'introggressione di sequenze umane moderne, generalmente più variabili, nel genoma di Neanderthal nel corso degli eventi di ibridazione. Gli alti livelli di omozigosi rilevati in tutti i genomi neandertaliani sono stati sfruttati in questo studio anche per stimare l'introggressione genica dagli uomini moderni ai Neanderthal, basandosi sull'ipotesi che sequenze ereditate nei genomi neandertaliani in seguito ad eventi di ibridazione siano caratterizzati da un maggiore livello di eterozigosi rispetto alle altre regioni genomiche neandertaliane, data la maggiore variabilità genetica che

caratterizza i genomi umani moderni. Questa analisi suggerirebbe che le popolazioni neandertaliane stessero progressivamente diminuendo di dimensione fino ad essere eventualmente assorbite nel pool genico umano moderno e che l'accumulo di mutazioni deleterie, associato con la ridotta dimensione di popolazione, potrebbe essere una delle cause della scomparsa dei neandertaliani.

Un'ulteriore conclusione che possiamo trarre dagli elevati livelli di omozigosi, dalla mancata evidenza di gene flow con altri Neanderthal conosciuti e dai modelli demografici che dimostrano che Thorin si allontana più di qualsiasi altro late Neanderthal da Vindija 33.19, è che la discendenza di Thorin possa costituire una popolazione rimasta isolata per 50 mila anni. Analisi statistiche hanno infatti confermato che i Neanderthal da Europa, Caucaso e Siberia risalenti a meno di 80 mila anni fa condividono una quantità molto più significativa di alleli con Vindija che con Thorin, la cui linea forma quindi un outgroup.

Interessante è però soffermarsi sull'analisi della relazione genetica, supportata dall'elevato livello di "allele sharing" tra i due individui, tra Thorin e il Neanderthal di Forbes' Quarry (Gibilterra), uno tra i primi reperti neandertaliani trovato ed identificato come tale soltanto anni dopo la scoperta dell'insieme più ampio di resti nella valle di Neander (Bokelmann et al. 2019). È stata quindi fatta un'analisi demografica tramite la funzione *mom2*, considerando due ipotesi differenti (Figura 11): nel primo modello era permesso alla discendenza di FQ di divergere da Vindija in un momento qualsiasi dopo la separazione di quest'ultima dall'Altai Neanderthal, mentre nel secondo modello di separarsi direttamente dalla lineage di Thorin. Il secondo modello è risultato più probabile rispetto al primo, suggerendo che FQ e Thorin potessero far parte di una popolazione distinta rispetto agli altri Neanderthal europei.

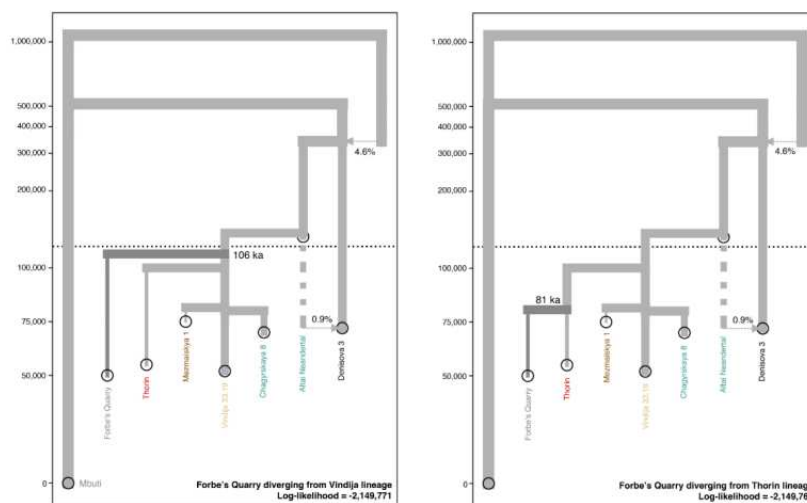


Figura 11 Modelli demografici creati per studiare la relazione di Thorin con l'individuo di Forbes' Quarry.

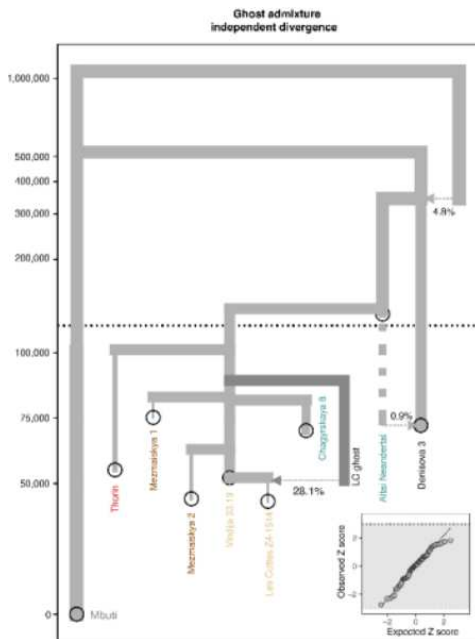


Figura 12 Modello demografico che stima la separazione indipendente di una “ghost lineage” con eventi di flusso genico con Les Cottés

In questo articolo viene anche ipotizzata la presenza di una “ghost lineage” profondamente divergente dalla discendenza ancestrale dei Neanderthal europei, ma distinta da quella di Thorin. Questa analisi è stata fatta evidenziando flusso genico nell’individuo Les Cottés Z4-1514, il cui mtDNA risulta maggiormente correlato con i Neanderthal siberiani dalle grotte di Okladnikov e Chagyrskaya 8, che si sono separati precedentemente al clade di Vindija: il migliore modello (Figura 12) ottenuto da questa analisi, che prevede eventi di flusso genico nell’individuo di Les Cottés, stima che la discendenza “fantasma” si sia separata circa 89 mila anni fa.

Questi risultati suggeriscono quindi la presenza di almeno due discendenze profondamente divergenti e isolate tra loro, seppure in prossimità geografica, che sono probabilmente poi state parzialmente sostituite dall’espansione demografica della discendenza di Vindija. Il prolungato isolamento genetico di Thorin dalle altre tarde popolazioni europee di Neanderthal (con l’eccezione forse di FQ) è anche supportato dallo sviluppo di una specifica cultura litica musteriana caratteristica della grotta di Mandrin e diversa da quella di altri siti neandertaliani contemporanei a Thorin.

In conclusione, questo studio, se supportato da analisi di ulteriori reperti appartenenti alle tarde popolazioni neandertaliane in altre aree geografiche, potrebbe dimostrare un’organizzazione demografica e un pattern evolutivo più complesso rispetto a quello finora ipotizzato per i tardi neandertaliani, con almeno due linee distinte differenziate in Europa e coesistenti in condizioni di forte isolamento almeno fino al periodo immediatamente precedente alla scomparsa dei Neanderthal, circa 40,000 anni fa.

Questo studio, reso disponibile come pre-print nell’aprile del 2023, è ad oggi ancora in revisione. Il ritardo nella pubblicazione potrebbe essere legato alla complessità dell’articolo, che approfondisce una vasta gamma di aspetti interdisciplinari come considerazioni archeologiche e tecniche di datazione, e sfrutta un’ampia varietà di metodi, tra cui analisi molecolari, studi statistici e demografici. È possibile quindi che durante il processo di pubblicazione l’articolo possa subire modifiche o aggiornamenti, che non dovrebbero però alterare le conclusioni principali emerse nel paper.

IV. BIBLIOGRAFIA

Bokelmann L, Hajdinjak M, Peyrégne S, Brace S, Essel E et al (2019). *A genetic analysis of the Gibraltar Neanderthals*. *PNAS* 116:15610–15

Ceballos FC, Joshi PK, Clark DW, Ramsay M, Wilson JF (2018). *Runs of homozygosity: windows into population history and trait architecture*. *Nat Rev Genet*. 19: 220-234. doi: 10.1038/nrg.2017.109.

Hajdinjak, M., Fu, Q., Hübner, A. et al (2018). *Reconstructing the genetic history of late Neanderthals*. *Nature* 555, 652–656 doi: 10.1038/nature26151

Kamm J, Terhorst J, Durbin R, Song YS. (2020). *Efficiently inferring the demographic history of many populations with allele count data*. *J Am Statist Assoc* 115:1472–87. doi: 10.1080/01621459.2019.1635482

Li L, Comi TJ, Bierman RF, Akey JM (2024). *Recurrent gene flow between Neanderthals and modern humans over the past 200,000 years*. *Science* 12;385(6705):eadi1768. doi: 10.1126/science.adi1768

Marom A, McCullagh JSO, Higham TFG, Hedges REM (2013). *Hydroxyproline dating: Experiments on the ¹⁴C analysis of contaminated and low-collagen bones*. *Radiocarbon*. 55:698-708. doi:10.1017/S0033822200057854

Nascimento FF, Reis MD, Yang Z (2017). *A biologist's guide to Bayesian phylogenetic analysis*. *Nat Ecol Evol* 10:1446-1454. doi:10.1038/s41559-017-0280-x

Richter KK, Codlin MC, Seabrook M, Warinner C (2022). *A primer for ZooMS applications in archaeology*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119:e2109323119. doi: 10.1073/pnas.2109323119.

A late Neanderthal reveals genetic isolation in their populations before extinction

Authors: Ludovic Slimak^{1,†,*}, Tharsika Vimala^{2,†}, Andaine Seguin-Orlando^{1,2,†}, Laure Metz^{3,4}, Clément Zanolli⁵, Renaud Joannes-Boyau⁶, Marine Frouin^{7,8,9}, Lee J. Arnold¹⁰, Martina Demuro¹⁰, Thibaut Devièse^{7,11}, Daniel Comeskey^{7,12}, Michael Buckley¹³, Hubert Camus¹⁴, Xavier Muth¹⁵, Jason E. Lewis^{10,16}, Hervé Bocherens¹⁷, Pascale Yvorra³, Christophe Tenailleau¹⁸, Benjamin Duployer¹⁸, Hélène Coqueugniot^{5,19}, Olivier Dutour^{5,19}, Thomas Higham^{7,20,21}, Martin Sikora^{2*}

Affiliations:

¹CNRS, UMR 5288, Centre for Anthropobiology and Genomics of Toulouse, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France.

²Lundbeck Foundation GeoGenetics Center, University of Copenhagen, 1350K Copenhagen, Denmark.

³Aix-Marseille Université, CNRS, Min. Culture, UMR 7269, LAMPEA, Maison Méditerranéenne des Sciences de l'Homme, BP 647, 5 rue du Château de l'Horloge, F-13094, Aix-en-Provence Cedex 2, France.

⁴University of Connecticut, College of Liberal Arts and Sciences, 215 Glenbrook Road, U-4098, Storrs, Connecticut 06269-4098, USA.

⁵Université de Bordeaux, CNRS, MCC, PACEA, UMR 5199, Allée Geoffroy Saint-Hilaire, F-33615 Pessac Cedex, France.

⁶Geoarchaeology & Archaeometry Research Group (GARG), Southern Cross University, Military Rd, Lismore, NSW, 2480, Australia.

⁷Oxford Radiocarbon Accelerator Unit, Research Laboratory for Archaeology & the History of Art, University of Oxford, Oxford, UK.

⁸Department of Geosciences, Stony Brook University, 255 Earth and Space Sciences Building, Stony Brook, New York 11794-2100, USA.

⁹Turkana Basin Institute, Stony Brook University, Stony Brook, New York 11794-4364, USA.

¹⁰School of Physical Sciences, Environment Institute, Institute for Photonics and Advanced Sensing (IPAS), University of Adelaide, North Terrace Campus, Adelaide, SA 5005, Australia.

¹¹CEREGE, Aix-Marseille University, CNRS, IRD, INRAE, Collège de France, Technopôle de l'Arbois, Aix-en-Provence, France

¹²Syft Technologies Ltd, 3 Craft Place, Middleton, PO Box 28 149, Christchurch 8242, New Zealand

¹³Department of Earth and Environmental Sciences, Manchester Institute of Biotechnology, University of Manchester, UK.

¹⁴PROTEE-EXPERT, 4 rue des Aspholdèles, 34750 Villeneuve-lès-Maguelone, France.

¹⁵Get in Situ, 1091 Bourg-en-Lavaux, Switzerland.

¹⁶Department of Anthropology and Turkana Basin Institute, Stony Brook University, Stony Brook, New York 11794-4364, USA.

¹⁷Fachbereich Geowissenschaften Forschungsbereich Paläobiologie - Biogeologie Senckenberg, Centre for Human Evolution and Palaeoenvironment (CHEP), Universität Tübingen, Hölderlinstr. 12, 72074 Tübingen, Germany.

¹⁸Centre Inter-Universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux, UMR 5085 CNRS- Université de Toulouse (Paul Sabatier), 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France.

¹⁹École Pratique des Hautes Études - Paris Sciences et Lettres University, 4-14 rue Ferrus, F-75014 Paris, France.

²⁰Department of Evolutionary Anthropology, Faculty of Life Sciences, University of Vienna, Schlachthausgasse 43, A-1030 Vienna, Austria.

²¹Human Evolution and Archaeological Sciences Forschungsverbund, University of Vienna, A-1090 Vienna, Austria.

†These authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: ludovic.slimak@cnrs.fr; martin.sikora@sund.ku.dk

Short Title: Isolated Late Neanderthals from Europe

Summary: Neanderthal genomes have been recovered from sites across Eurasia, painting an increasingly complex picture of their populations' structure, mostly indicating that late European Neanderthals belonged to a single metapopulation with no significant evidence of deep population structure. Here we report the discovery of a late Neanderthal individual, nicknamed "Thorin", from Grotte Mandrin in Mediterranean France, and his genome. These dentognathic fossils, including a rare example of distomolars, are associated with a rich archeological record of their final technological traditions in this region ~50-42 thousand years ago. Thorin's genome reveals a deep divergence with other late Neanderthals. Thorin belonged to a population with small group size that showed no genetic introgression with other known late European Neanderthals, revealing genetic isolation of his lineage despite them living in neighboring regions. These results have important implications for resolving competing hypotheses about causes of the Neanderthals' disappearance.

One Sentence Summary: A new French Neanderthal fossil and its genome reveal complex population dynamics during the past 100,000 years.

Keywords: Neanderthals, Europe, Fossils, Genomics, Population Structure, Proteomics

Main Text:

Introduction

The reasons behind the extinction of the Neanderthals ~40 thousand years ago (ka) are still widely debated. Multiple theories have been presented over the years, including competition or interbreeding with modern humans, but it remains unknown if the factors involved in this process were primarily ecological or social and then based on the historical inter-relationships between these populations^{1,2,3}. Some researchers suggest that social, technical, or ethological differences between Neanderthals and modern humans may have played a direct role in their demise but the precise cause(s) of such extinction remains uncertain¹⁻⁷. Paleogenomic and osteological studies have revealed low effective population sizes and signatures of inbreeding in Siberian and late European Neanderthals^{6,8}, suggesting social structure characterized by small group sizes and low intergroup mobility. This contrasts with recent results from early Eurasian modern humans, which showed low levels of inbreeding and higher intergroup mobility despite small group sizes^{9,10}. Whether these results are representative of wider Neanderthal social organization remains inconclusive.

Since the publication of the first draft of the Neanderthal genome in 2010¹¹, Neanderthal genomes have been recovered from sites across Eurasia, painting an increasingly complex picture of Neanderthal genetic structure. The deepest divergence among Neanderthal genomes sequenced to date is found between eastern and western Eurasian Neanderthal populations represented by the ~120 ka Altai Neanderthal from Denisova Cave⁷ and the >44 ka Vindija 33.19 individual from Croatia¹². Genomic data of all other available Neanderthal remains, the earliest in western Europe being ~120 ka (Scladina and Hohlenstein-Stadel (HST)), while the latest being ~40 ka, suggest genetic continuity in western Eurasia for ~80 ka¹³. Recent results obtained from sedimentary DNA suggest that the genetic landscape was significantly altered by expansions of Neanderthal populations ~105 ka¹⁴. This gave rise to lineages in western Europe represented by samples from Central Europe (Vindija), the Caucasus (Mezmaiskaya Cave), and Siberia (Chagyrskaya cave 8)¹⁵, the latter likely replacing the earlier Altai-like population. The

genomes of late (<50 ka) European Neanderthals, including an individual from the Caucasus (Mezmaiskaya 2), were all found to be more similar to Vindija than to other known lineages, indicating further population turnover towards the last stages of Neanderthal history in the Caucasus or western Europe¹⁶. The close correlation between genetic similarities and geographic location suggested an absence of major population structure among the sampled late Neanderthal populations. It remains unknown whether these patterns result from long-term *in situ* evolution of late European Neanderthal populations, or as a consequence of a recent expansion of Vindija-like lineages into Europe.

Here we report the discovery of a late Neanderthal individual, nicknamed “Thorin”, in 2015 and progressively excavated since then at Grotte Mandrin in Mediterranean France, a site which also was temporarily occupied by early modern humans at 54 ka¹. Thorin is one of the best represented Neanderthal individuals found in France since the discovery from Saint-Césaire in 1979¹⁷. Combining archaeological, chronostratigraphic, isotopic, and genomic analyses, we show that Thorin belonged to a late Neanderthal population which had stayed genetically isolated for some 50 ka. We further find evidence of gene flow from a deeply divergent lineage distinct from the Thorin lineage in the Neanderthal individual from Les Cottés¹⁶. Our results suggest the presence of multiple isolated late Neanderthal communities in Europe close to their time of extinction, and shed light on their social organization with limited, if any, level of interactions in between different Neanderthal populations in their last millennia.

Results

Thorin is a late European Neandertal

Grotte Mandrin is a rockshelter located in Mediterranean France directly overhanging the Rhône River Valley. The site records 12 main sedimentary layers dating from Marine Isotope Stages (MIS) 5 to 3. Geological and micromorphological analyses show that all archeological levels were well preserved by rapid wind deposition of sands and silts¹. The upper sequence is divided into 8 archeological levels chronologically placed between 65.6 to 31.0 ka at 95% CI, encompassing the last Neanderthal societies and the arrival of the first modern human groups. Each of these levels provide rich archeological records, totalling more than 60,000 lithics and 70,000 faunal remains. Fireplaces and hominin remains were also found in most of Mandrin’s

levels¹. These 8 archeological levels were divided in 5 cultural phases: Level F: Rhodanian Quina, Level E: Neronian, Level D: Post-Neronian I (PNI), Levels C2 to B2 Post-Neronian II (PNII), Level B1: Protoaurignacian. The cultural determinations of the Neronian, PNI, and PNII phases at Mandrin¹ show major technical and cultural divergences with the coeval Mousterian and Châtelperronian societies⁴ found in the neighboring regions of south-western France and Burgundy^{3,5,18,19}.

Thorin was discovered in 2015 at the entrance of the rockshelter in lateral contact between the upper layers and the bedrock in Level B2 (Fig. 1) associated with abundant fauna and artifacts attributed to the PNII, the last Mousterian phase from Grotte Mandrin^{1,3,5,18,19}. Thorin is represented by several fragments, including a portion of the left palatal process at the level of the molars, a fragmentary mandible, as well as 31 permanent maxillary and mandibular teeth (Fig. 2). While the upper right premolars and the upper left canine were lost post-mortem, it is noteworthy that two supernumerary lower molars are present (fourth molars). They are heteromorphic and exhibit a reduced and simplified (non-conical) crown with a single but large root from the cervix to the apex. The marked inclined wear facet affecting the occluso-mesial crown aspect of these two teeth fits with the distal interproximal facet of the lower third molars, indicating that the distomolars impacted the third molar crowns during the eruption process. Overall, the dental morphology of this individual is typical of Neanderthals, with shovel-shaped maxillary central incisors, marked labial convexity on the maxillary lateral incisors that also show a large tuberculum dentale on the lingual aspect of the crown, a well-developed hypocone projected lingually in the maxillary molars, and high root stem/branches ratio (i.e., taurodontism^{20,21}; Fig. S1). Most of the dentition shows advanced occlusal wear associated with hypercementosis at the root apex, notably on the anterior teeth, and the fully developed third fourth molars indicate that it is an adult individual. The advanced occlusal wear is also associated with hypercementosis and exostoses on the maxilla, indicating that the teeth and jaw were under heavy (para)masticatory stress during the life of this individual. Near these cranial elements, the remains of five adult phalanges of the left hand were found (Fig. S2). They showed typical Neanderthal features: ulnar deviation of the pollical distal phalanx and expansion of the distal phalangeal tuberosity^{22,23}. All of the human remains recovered so far are of adult age and the anatomical representation of the different elements is compatible with the presence of a single individual. While the teeth show typical Neanderthal features, the presence of two

supernumerary fourth molars is remarkable. Mandibular distomolars are extremely rare in extant humans (around 0.02%)²⁴ and, to the best of our knowledge, have not been reported in Pleistocene *Homo* so far, though other kinds of supernumerary teeth have been described in a few instances for Neanderthal and Paleolithic modern humans²⁵⁻²⁸. The aetiology of the presence of distomolars is still debated²⁴. Studies of odontoskeletal anomalies found in early-generation hybrids of living primates display a relatively high incidence of distomolars^{29,30}.

Recent analyses of Paleolithic sites in Western Europe suggest that Mousterian lithic industries, traditionally attributed exclusively to Neanderthals, ended 39-41 ka cal. BP⁴. Throughout Eurasia, ten sites have yielded Neanderthal remains directly dated between 50 and 40 ka cal. BP^{16,31-39}, while only the four French sites, Arcy, Les Cottés, La Ferrassie, and Saint-Césaire, underwent ultrafiltration and provided ages between 45 and 40 ka cal. BP^{16,36,38,39}. Neanderthal remains safely attributed to the final stage of their long existence are thus particularly rare and come essentially from sites excavated decades ago^{16,31-39}, often with little or disputable stratigraphic and archeological context.

In order to provide a wider range of less-precious specimens for the destructive process of radiocarbon dating, we screened 80 fragmentary bone remains suspected as deriving from Thorin by Zooarchaeology by Mass Spectrometry (ZooMS) collagen peptide mass fingerprinting^{40,41} following the methods outlined in ref. 42. Specimens that yielded spectra matching a Hominidae signature⁴³ were radiocarbon dated at the Oxford Radiocarbon Accelerator Unit. Hydroxyproline was extracted for AMS dating to ensure reliability and contamination removal⁴⁴. A selection of hominin remains were also further explored by paleoproteomic sequencing and its ability to distinguish archaic from modern hominin taxa³⁸, but comparison with known modern human remains from Holocene deposits proved this approach to be problematic (Supplementary Material 5).

Direct U-series dating and combined U-series – electron spin resonance (US-ESR) dating of Thorin was also undertaken on a fragment of the Neanderthal's lower left third premolar crown. Additional faunal remains from Level B2 were directly dated using the same approaches. Uranium diffusion and accumulation patterns in the dentine and enamel were obtained prior to the isotopic analysis. According to the diffusion model and the U-series age distribution in the fossils, a minimum age of 43.5±4.1 ka can be assigned to the Neanderthal remains from Level

B2. US-ESR modeling yields statistically indistinguishable finite ages of 48 \pm 5/-13 ka and 49 \pm 5/-10 ka for Thorin and the Level B2 fauna, respectively.

We undertook Bayesian modeling of the broader stratigraphic sequence at Mandrin to determine a robust age estimate for Thorin within the PNII levels (C2-B2). The model yielded an age range for Thorin of 51,300-48,900 cal. BP (at 68.2% prob.) and 52,900 - 48,050 cal. BP (95.4% prob.; Fig. 3; see Materials and Methods).

The carbon, nitrogen, oxygen and strontium isotopic ratios measured on one of the Thorin teeth are fully compatible with an individual living in an open landscape and cold climatic conditions, consistent with the sedimentary characteristics of the C2-B2 deposits and direct dating results, rather than forested and temperate conditions as would have been the case during MIS 5 (Fig. S3; Methods).

Thorin represents a distinct Neanderthal lineage

A first molar root fragment was used to generate a whole genome sequence from Thorin by performing three sequential DNA extractions (E1, E2 and E3), drastically reducing modern human contamination (Table S9, S10), as well as whole-genome in-solution capture to increase the fraction of endogenous human DNA. Libraries built on raw (non-USER treated) DNA extracts exhibited elevated terminal C>T / G>A substitution rates consistent with authentic ancient DNA data (Figs. S4-S9, Tables S8-S9). However, analyses of contamination rates using mitochondrial DNA and X-chromosome data and grade-of-membership models on the nuclear DNA revealed substantial levels of modern human DNA contamination in the data generated from the first extract E1 (mtDNA-based estimate 13-60%, Table S9; X-based estimate 13-29%, Table S10). We therefore restricted all subsequent analyses to data from extracts E2 and E3, which show re-estimated mtDNA and nuclear contamination rates of <1% and 0.01%, respectively, yielding a final average depth of coverage of 1.3X of the nuclear genome and 561X for the mtDNA.

We rule out the potential of reference and capture bias in our data with D statistics from which we in both cases obtain non-significant D-values (Figs. S17).

Molecular sex determination using reads mapped to the X and Y chromosome showed that the Thorin individual was male. Phylogenetic analyses of the mitochondrial (MT) genome revealed that the Thorin MT genome was most closely related to that of the FQ individual from Gibraltar. Both of them form part of a clade including other recently described European Neanderthal samples (Stajnia Cave, Poland; Galeria de las Estatuas, Spain) and the ~65 ka Mezmaiskaya 1 individual from the Caucasus, distinct from other late Western Eurasian Neanderthals sequenced to date (Figs. 4A & S10). Analyses of the Y chromosome showed a similar result, with the Thorin sequence diverging prior to the other two male late Neanderthals (Spy94a, Mezmaiskaya 2), albeit with limited bootstrap support (Figs. 4B & S11).

Using BEAST2⁴⁵ we obtained a molecular age estimate of ~100 ka (Table S12, Figs. S12-S13) for Thorin, some ~50 ka older than the ¹⁴C, U-series, and OSL ages obtained from the sediment layer from which Thorin was excavated. Similar discrepancies in ages have previously been observed for Chagyrskaya 8¹⁵ and Stajnia S5000⁴⁶. Notably, directly dated samples used for tip calibration are restricted to the clade of late Neanderthals (Fig. 4A, Table S11) and cover only a shallow part of the entire tree, possibly leading to inaccurate estimates if substitution rates vary across the phylogeny⁴⁷. In order to test this, we carried out an additional BEAST2 analysis including Thorin as an additional calibration point using an age of 50 ka (95% CI: 45–55 ka), allowing for variation in substitution rates along the tree. The resulting tip ages for Chagyrskaya 8 (70 ka; 95% CI: 48–94 ka) and Stajnia S5000 (77 ka; 95% CI: 53–103 ka), were found to be substantially closer to ages obtained from their respective archaeological contexts (~60 and ~50 ka). Similarly, the molecular age estimate of Mezmaiskaya 1 of ~74 ka also aligned with its previous estimate of 60–70 ka⁴⁸ (Table S12, Figs. S12-S13). The estimated substitution rates remained within a relatively narrow range, suggesting that the initial molecular ages for samples in the Thorin MT clade were likely overestimated. Under this model we estimate a divergence time of the Thorin clade of 123 ka, while we estimate the divergence between Hohlenstein-Stadel and the rest of the Neanderthals to 215 ka and the split between modern humans and all Neanderthals to ~330 ka (Figs. S12-S13).

We investigated broad population structure among the low coverage Neanderthals and Chagyrskaya 8 by projecting them onto a principal component analysis (PCA) of Vindija 33.19, Altai Neanderthal and Denisova 3, the three deepest diverged archaic lineages with high quality genomes currently available. The projected individuals formed a cline towards Vindija 33.19,

consistent with their previously reported sharing of a more recent common ancestor than with the Altai Neanderthal (Fig. S14). Interestingly, the placement of Thorin fell within the cline but further from Vindija 33.19 than any other late Neanderthal individual, suggesting a more distant relationship to Vindija 33.19. D-statistics confirmed that Neanderthals from Europe, the Caucasus, and Siberia younger than 80 ka shared significantly more alleles with Vindija 33.19 than with Thorin, and that the Thorin lineage forms an outgroup to those lineages (Figs. 5 & S15-S19). The exception was the Neanderthal sample FQ from Gibraltar⁴⁹, which showed a weak but significant signal of excess allele sharing with Thorin, consistent with their closely related MT sequences (Figs. 6 & S15-S19). Furthermore, Thorin does not show excess allele sharing with modern humans in comparison to all other west Eurasian Neanderthals, indicating that the lineage interbreeding with modern humans diverged prior to the Thorin lineage, and ruling out the possibility of recent interbreeding with early modern humans at Mandrin cave¹ (Fig. S17).

We carried out demographic modeling using the site-frequency-spectrum based approach implemented in *mom2*⁵⁰, which allows the placement of low coverage individuals onto a scaffold inferred from high quality genomes. We first fit a scaffold demography including the three high coverage Neanderthals (Altai Neanderthal, Chagyrskaya 8, Vindija 33.19) as well as the Denisovan, incorporating previously inferred demographic events⁸. The low coverage samples Thorin and Mezmaiskaya 1 were then added to this scaffold, allowing for a divergence from the Vindija 33.19 lineage at any point after the split from the Altai Neanderthal. The best-fit model indicates a divergence of the Thorin lineage from Vindija 33.19 at 102,861 years ago (95% CI 100,267 - 105,169), considerably earlier than those of Mezmaiskaya 1 (82,617 ya; 95% CI 79,313 - 85,606) or Chagyrskaya 8 (79,458 ya; 95% CI 77,600 - 80,892; Fig. 6), and consistent with results from D-statistics and mtDNA.

Using a novel approach to detect runs of homozygosity in low coverage Neanderthal genomes, we found evidence for increased homozygosity in the Thorin genome compared to other late European Neanderthals. Thorin harbors ~7% of its genome in homozygous segments of 5Mb or longer, including 45 Mb (~1.5%) in segments longer than 20Mb indicative of recent inbreeding (Figure 7). Taken together, our results suggest small group sizes and long-term genetic isolation of the Thorin population from other late Neanderthal populations with genomic data available.

Other isolated lineages present 50 ka?

We further investigated the possibility of population turnover in Europe during the late Neanderthal period. Using D-statistics testing whether the late Caucasus lineage of Mezmaiskaya 2 forms an outgroup to other late European Neanderthals, we find evidence of gene flow with a “deep” Neanderthal lineage in the ~43 ka Les Cottés Z4-1514 sample from France (Fig. S18). Interestingly, this individual carries a mtDNA lineage most closely related to the Siberian Neanderthals from Okladnikov and Chagyrskaya caves, diverging earlier than the clade of Vindija-like late Neanderthals sampled to date (Fig. 4). Demographic modeling of Les Cottés Z4-1514 and Mezmaiskaya 2 onto the previous best-fitting model revealed that a model with gene flow into Les Cottés Z4-1514 from an unsampled ghost lineage diverging ~89 ka provided a significantly better fit than one without gene flow (Fig. S24). An alternative model involving a ghost lineage constrained to diverging from the Thorin lineage also yielded a poorer fit, with a divergence time of the ghost lineage close to the diverging of the Thorin lineage (Fig. S24). Our results thus suggest the presence of at least two deeply divergent and isolated lineages in close geographic proximity during the late Neanderthal period, subsequently partially replaced by an expansion of Vindija-like lineages into western Europe within the last 10,000 years of their existence. Interestingly, the eastern European late Neanderthal from Mezmaiskaya cave (Mezmaiskaya 2) also shows high levels of homozygosity (Figure 7), suggesting small group sizes were likely also common among late Neanderthals outside the expanding Vindija-like population.

Discussion

Thorin is the most complete Neanderthal individual found in France since 1979¹⁷ and falls amongst a group of other Neanderthals dating to the last millennia of their existence in western Europe. So far population genetic analysis of other late Neanderthals has indicated they belonged to a single metapopulation with no significant evidence of deep population structure among them¹⁶. The genome of Thorin sheds new light on the population structure of late Neanderthals as our genomic analyses demonstrate that Thorin belongs to a deeply diverging European Neanderthal lineage, representing a remnant of earlier European Neanderthals. Interestingly, the divergence of this lineage began at ~100-105 ka, during the MIS 5 interglacial, a period that saw

fast climatic and environmental changes across Eurasia and repopulation by warm adapted fauna through the continent^{51,52}. The timing of this divergence also coincides with a period of population replacement detected in northern Spain among Neanderthal populations¹⁴.

Our analysis testing for gene flow between Thorin's lineage and other known Neanderthal and modern human lineages suggests the existence of an isolated group of late Neanderthals in western Europe 50 ka. This population is associated with a distinctive PNII lithic tradition¹, which is continuously attested in the last four Mousterian levels of Mandrin (Levels C2 to B2), from 52.9-43.0 ka at 95% CI, overlapping with the final disappearance of Neanderthal populations in Eurasia^{1,4}. Thorin therefore likely belonged to one of the last representative Neanderthal populations in this area of Mediterranean France, and poses the first direct genomic evidence of deep population structure among late European Neanderthals. The genetic relationship observed between Thorin and FQ (also indicated in demographic modeling, Supplementary Note 4) indicates that the Gibraltar Neanderthals might have been members of an extended southwest European metapopulation, and raises the possibility of a much later dating for those individuals than previously anticipated⁴⁹. However, due to sparsity of data from FQ, we are unable to draw further conclusions hereof.

The genetic differences between Thorin and the other Western European Neanderthals may signify a major process of population replacement following, or related to, the expansion of anatomically modern humans through Europe. Interestingly, Thorin corresponds to the phase of Neanderthal reoccupation of Grotte Mandrin after the earliest modern human incursions in Europe^{1,2}. The millennia-long genetic isolation of the Thorin-lineage raises new questions of relevance to the Neanderthal extinction debate and the types of interactions between the last Neanderthals and early *H. sapiens* in Europe. Additional DNA analyses and secure direct dating of late Neanderthal remains are now crucial to understand whether this population was only locally spread -in the middle Rhône Valley- or if the Thorin lineage was more widely distributed across Europe, as suggested by the Gibraltar connections. The sedimentary autosomal DNA data from the Galeria de las Estatuas population was unfortunately not of sufficient coverage to establish closer affinity with Thorin. However, the sampling locations of European Neanderthals within the mtDNA clade of Thorin, from Iberia (Gibraltar, Galeria de las Estatuas) and southern France to Poland (Stajnia) would support a broader distribution, and be consistent with a suggested radiation of Neanderthal populations ~105 ka. While it is commonly inferred that the

interactions between the first *H. sapiens* and the last Neanderthals may have played an important role in the latter's extinction in Europe, the unexpected identification of an hitherto unrecognized late Neanderthal population reveals a much more complex population structure among late Neanderthals and raises new lines of questions to further explore their social or ethological organization, which potentially could have played an important role in their later extinction.

Besides the lineage that is represented by Thorin, our demographic modeling provides indirect evidence of another deeply diverged “ghost” lineage present through the French Neanderthal Les Cottés. Our demographic modeling suggests that the introgressing lineage diverged some time after the Thorin lineage, closer to the divergence of Mezmaiskaya¹ and the Siberian individual Chagyrskaya⁸ from the Altai region, with which Les Cottés also shares a closely related MT lineage. Whether this ghost lineage forms part of an as yet unknown further radiation of lineages after 100 ka but before the classical late Neanderthals remains unknown without a denser sampling of genomic data from around that time period. Our results nevertheless suggest a minimum of two distinct Neanderthal lineages present in Europe during the late Neanderthal period. In the absence of any detectable gene flow between Thorin and other Neanderthal lineages after its divergence, we conclude that Thorin represents a lineage that has stayed isolated for ~50 ka. Deep cultural and technical specificities distinguishing Rhône Valley late Mousterian industries have been long proposed^{18,19,53}, underlining that from MIS 5 to 3 these French Mediterranean Neanderthal societies possessed a distinct technical background. These cultural traits distinguishing Neanderthal societies from neighboring regions can now be paralleled with deep genetic isolations among these societies. Our results thus also shed light onto the social organization of Neanderthals, suggesting that small isolated populations with limited, and potentially without, inter-group exchange as a possibly more general feature of Neanderthal social structure.

References and Notes

1. Slimak, L., et al. (2022). Modern human incursion into Neanderthal territories 54,000 years ago at Mandrin, France. *Sci. Adv.* 8,6. DOI: [10.1126/sciadv.abj9496](https://doi.org/10.1126/sciadv.abj9496)
2. Metz, L., Lewis, J.E., Slimak, L. (2023). Bow-and-arrow, technology of the first modern humans in Europe 54,000 years ago at Mandrin, France. *Sci. Adv.* 9, eadd4675.

3. Slimak, L. (2019). For a cultural anthropology of the last Neanderthals. *Quat. Sci. Rev.* 217, 330-339.
4. Higham, T.F.G., et al. (2014). The timing and spatiotemporal patterning of Neanderthal disappearance. *Nature* 512, 306-309.
5. Slimak, L. (2008). The Neronian and the historical structure of cultural shifts from Middle to Upper Palaeolithic in Mediterranean France. *J. Archaeol. Sci.* 35, 2204-2214.
6. Ríos, L., et al. (2019). Skeletal Anomalies in The Neandertal Family of El Sidrón (Spain) Support A Role of Inbreeding in Neandertal Extinction. *Sci. Rep.* 9, 1697.
7. Hublin, J.-J. (2017). The last Neanderthal. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 114, 10520-10522.
8. Prüfer, K., et al. (2014). The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature* 505, 43-49.
9. Sikora, M., et al. (2017). Ancient genomes show social and reproductive behavior of early Upper Paleolithic foragers. *Science* 358, 659-662.
10. Ringbauer, H., Novembre, J., and Steinrücken, M. (2021). Parental relatedness through time revealed by runs of homozygosity in ancient DNA. *Nat. Comm.* 12, 5425.
11. Green, R.E., et al. (2010). A draft sequence of the neandertal genome. *Science* 328, 710-722.
12. Prüfer, K., et al. (2017). A high-coverage Neandertal genome from Vindija Cave in Croatia. *Science* 358, 1-13.
13. Peyrégne, S., et al. (2019). Nuclear DNA from two early Neandertals reveals 80,000 years of genetic continuity in Europe. *Sci. Adv.* 5. doi:10.1126/sciadv.aaw5873.
14. Vernot, B., et al. (2021). Unearthing Neandertal population history using nuclear and mitochondrial DNA from cave sediments. *Science* 372, eabf1667. DOI: 10.1126/science.abf1667
15. Mafessoni, F., et al. (2020). A high-coverage Neandertal genome from Chagyrskaya Cave. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 15132-15136.
16. Hajdinjak, M., et al. (2018). Reconstructing the genetic history of late Neandertals. *Nature* 555, 652-656. DOI: [10.1038/nature26151](https://doi.org/10.1038/nature26151)
17. Lévêque, F., and Vandermeersch, B. (1980). Les découvertes de restes humains dans un horizon castelperronien de Saint-Césaire (Charente-Maritime). *Bull. Soc. Préhist. Fr.* 77, 187-189.
18. Slimak, L. Pour une individualisation des Moustériens de type Quina dans le quart sud-est de la France? La Baume Néron (Soyons, Ardèche) et le Champ Grand (Saint-Maurice-sur-Loire, Loire), premières données. *Bull. Soc. Préhist. Fr.* 96, 133-144 (1999).

19. Slimak, L. (2004). *Les Dernières Expressions du Moustérien entre Loire et Rhône*. Phd thesis, Université de Provence.
20. Bailey, S.E. (2002). A closer look at Neanderthal postcanine dental morphology: The mandibular dentition. *Anat. Rec.* 269, 148-156.
21. Bailey, S.E. (2004). Derived morphology in Neanderthal maxillary molars: Insights from above. *Am. J. Phys. Anthropol.* 123, 57.
22. Musgrave, J.H. (1973). The phalanges of Neanderthal and Upper Palaeolithic hands. In *Human Evolution*, M. H. Day, ed. (Taylor and Francis), pp. 59-85.
23. Trinkaus, E. (1982). The Shanidar 3 Neandertal. *Am. J. Phys. Anthropol.* 57, 37-60.
24. Vázquez Mosquerira, V.M., Espinosa Meléndez, M.T., and Hernández Flores, F. (2018). Presence of the fourth molar. Literature review. *Rev. Odont. Mex.* 22, 103-117.
25. Legoux, P. (1974). Étude odontologique des restes humains périgordiens et proto-magdaléniens de l'Abri-Pataud (Dordogne) (seconde partie). *Bull. Mem. Soc. Anthropol. Paris* 1(13), 45-84.
26. Smith, T.M., et al. (2011). Dental Development and Age at Death of a Middle Paleolithic Juvenile Hominin from Obi-Rakhmat Grotto, Uzbekistan. In *Continuity and Discontinuity in the Peopling of Europe*, S. Condemi, G. C. Weniger, Eds. (Springer, Dordrecht), pp. 155-163.
27. Trinkaus, E. (2018). An abundance of developmental anomalies and abnormalities in Pleistocene people. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 115, 11941-11946.
28. Trinkaus, E., Formicola, V., Svoboda, J., Hillson, S.W., and Holliday, T.W. (2001). Dolní Veštonice 15: Pathology and Persistence in the Pavlovian. *J. Archaeol. Sci.* 28, 1291-1308.
29. Ackermann, R.R., Schroeder, L. Rogers, J., and Cheverud, J.M. (2014). Further evidence for phenotypic signatures of hybridization in descendant baboon populations. *J. Hum. Evol.* 76, 54-62.
30. Ackermann, R.R., et al. (2019). Hybridization in human evolution: Insights from other organisms. *Evol. Anthropol.* 28, 189-209.
31. Schmitz, R.W., et al. (2002). The Neandertal type site revisited: interdisciplinary investigations of skeletal remains from the Neander Valley, Germany. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 99, 13342-13347.
32. Pinhasi, R. Higham, T.F.G., Golovanova, L.V., and Doronichev, V.B. (2011). Revised age of late Neanderthal occupation and the end of the Middle Paleolithic in the northern Caucasus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 108(21), 8611-8616.

33. Rougier, H., et al. (2016). Neandertal cannibalism and Neandertal bones used as tools in Northern Europe. *Sci. Rep.* 6, 29005.
34. Devièse, T., et al. (2017). Direct dating of Neanderthal remains from the site of Vindija Cave and implications for the Middle to Upper Paleolithic transition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 114(40) 10606-10611.
35. Jaouen, K., et al. (2019). Exceptionally high $\delta^{15}\text{N}$ values in collagen single amino acids confirm Neanderthals as high-trophic level carnivores. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 116(11), 4928-4933.
36. Balzeau, A., et al. (2020). Pluridisciplinary evidence for burial for the La Ferrassie 8 Neandertal child. *Sci. Rep.* 10, 21230.
37. Devièse, T., et al. (2021). Reevaluating the timing of Neanderthal disappearance in Northwest Europe. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 118(12), e2022466118.
38. Welker, F., et al. (2016). Palaeoproteomic evidence identifies archaic hominins associated with the Châtelperronian at the Grotte du Renne. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 113, 11162-11167.
39. Hublin, J.-J., et al. (2012). Radiocarbon dates from the Grotte du Renne and Saint-Césaire support a Neandertal origin for the Châtelperronian. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 109, 18743-18748.
40. Douka, K., et al. (2019). FINDER Project: Collagen fingerprinting (ZooMS) for the identification of new human fossils in Palaeolithic faunal assemblages. *Antiquity* 93, e1.
41. Buckley, M., Collins, M., Thomas-Oates, J., and Wilson, J.C. (2009). Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 3843–3854.
42. van der Sluis, L.G., et al. (2014). Combining histology, stable isotope analysis and ZooMS collagen fingerprinting to investigate the taphonomic history and dietary behaviour of extinct giant tortoises from the Mare aux Songes deposit on Mauritius. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 416(15), 80-91.
43. Brown, S., et al. (2016). Identification of a new hominin bone from Denisova Cave, Siberia using collagen fingerprinting and mitochondrial DNA analysis. *Sci. Rep.* 6, 23559.
44. Devièse, T., Comeskey, D., McCullagh, J., Ramsey, C.B., and Higham, T. (2018). New protocol for compound specific radiocarbon analysis of archaeological bones. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 32, 373-79.
45. Bouckaert, R., et al. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* 15, 1-28.

46. Picin, A., et al. (2020). New perspectives on Neanderthal dispersal and turnover from Stajnia Cave (Poland). *Sci. Rep.* 10, 14778.
47. Rieux, A., and Balloux, F. (2016). Inferences from tip-calibrated phylogenies: a review and a practical guide. *Mol. Ecol.* 25, 1911-1924. doi: 10.1111/mec.13586.
48. Skinner, A.R., et al. (2005). ESR dating at Mezmaiskaya Cave, Russia. *Appl. Radiat. Isot.* 62, 219-224.
49. Bokelmann, L., et al. (2019). A genetic analysis of the Gibraltar Neanderthals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 116, 15610-15615.
50. Kamm, J., Terhorst, J., Durbin, R., and Song, Y.S. (2020). Efficiently Inferring the Demographic History of Many Populations With Allele Count Data. *J. Am. Stat. Assoc.* 115, 1472-1487.
51. Slimak, L., et al. (2010). Le Grand Abri aux Puces, a Mousterian site from the Last Interglacial: paleogeography, paleoenvironment, and new excavation results. *J. Archaeol. Sci.* 37, 2747-2761.
52. Slimak, L., and Nicholson, C. (2020). Cannibals in the forest: A comment on Defleur and Desclaux (2019). *J. Archaeol. Sci.* 117, 105034.
53. Comber, J. (1967). *Le Paléolithique de L'Ardèche dans Son Cadre Paléoclimatique*. Imprimeries Delmas, Bordeaux, France.
54. Buckley, M., and Kansa, S.W. (2011). Collagen fingerprinting of archaeological bone and teeth remains from Domuztepe, South Eastern Turkey. *Archaeol. Anthropol. Sci.* 3, 271–280.
55. Dee, M., and Bronk Ramsey, C. (2000). Refinement of Graphite Target Production at ORAU. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 172, 449-453.
56. Woodroffe, C.D., Short, S.A., Stoddart, D.R., Spencer, T., and Harmon, R.S. (1991). Stratigraphy and chronology of late Pleistocene reefs in the Southern Cook Islands, South Pacific. *Quat. Res.* 35, 246-263.
57. Joannes-Boyau, R., Bodin, T., and Grün, R. (2010). Decomposition of the laboratory gamma irradiation component of angular ESR spectra of fossil tooth enamel fragments. *Appl. Radiat. Isot.* 68, 1798–1808.
58. Joannes-Boyau, R., and Grün, R. (2011). A comprehensive model for CO₂– radicals in fossil tooth enamel: Implications for ESR dating. *Quat. Geochron.* 6, 82-97.
59. Joannes-Boyau, R. (2013). Detailed protocol for an accurate non-destructive direct dating of tooth enamel fragment using Electron Spin Resonance. *Geochronometria* 40, 322-333.

60. Gruñn, R., Mahat, R., and Joannes-Boyau, R. (2012). Ionization efficiencies of alanine dosimeters and tooth enamel irradiated by gamma and X-ray sources. *Rad. Meas.* 47, 665-668.
61. Joannes-Boyau, R., and Gruñn, R. (2009). Thermal behavior of oriented and non-oriented CO₂- radicals in tooth enamel. *Rad. Meas.* 44, 505-511.
62. Joannes-Boyau, R., Duval, M., and Bodin, T. (2018). MCDoseE 2.0. A new Markov Chain Monte Carlo program for ESR dose response curve fitting and dose evaluation. *Quat. Geochron.* 44, 13-22.
63. Duval, M., and Gruñn, R. (2016). Are published ESR dose assessments on fossil tooth enamel reliable? *Quat. Geochron.* 31, 19-27.
64. Prescott, J.R., and Hutton, J.T. (1994). Cosmic ray contributions to dose rates for luminescence and ESR dating: Large depths and long-term time variations. *Rad. Meas.* 23, 497-500.
65. Bronk Ramsey, C. (2009). Bayesian analysis of radiocarbon dates. *Radiocarbon* 51, 337-360.
66. Reimer, P.J., et al. (2020). The IntCal20 Northern Hemisphere radiocarbon age calibration curve (0-55 cal kBP). *Radiocarbon* 62, 725-757.
67. Bronk Ramsey, C. (2009). Dealing with outliers and offsets in radiocarbon dating. *Radiocarbon* 51, 1023-1045.
68. Koch, P.L. (2007). Isotopic study of the biology of modern and fossil vertebrates. In *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science 2*, R. Michener, K. Kajtha, eds, 99-154.
69. Bocherens, H., and Drucker, D.G. (2013). Terrestrial teeth and bones. In *Encyclopedia of Quaternary Sciences*, 2nd Edition vol. 1, S.A. Elias, ed. (Amsterdam: Elsevier), pp. 304-314.
70. Ecker, M., et al. (2013). Middle Pleistocene ecology and Neanderthal subsistence: Insights from stable isotope analyses in Payre (Ardèche, France). *J. Hum. Evol.* 65, 363-373.
71. Bocherens, H., Díaz-Zorita Bonilla, M., Moncel, M.-H., Daujeard, C., and Raynal, J.-P. (2016). Direct isotopic evidence for subsistence adaptability in middle Pleistocene Neandertals (Payre, southeastern France). *Quat. Sci. Rev.* 154, 226-236.
72. Moncel, M.-H., Fernandes, P., Willmes, M., James, H., and Gruñn, R. (2019). Rocks, teeth, and tools: New insights into early Neanderthal mobility strategies in South-Eastern France from lithic reconstructions and strontium isotope analysis. *PLoS ONE* 14, e0214925.
73. Bocherens, H., Fizet, M., and Mariotti, A. (1994). Diet, physiology and ecology of fossil mammals as inferred by stable carbon and nitrogen isotopes biogeochemistry: implications for Pleistocene bears. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 107, 213-225.

74. Bon, C., et al. (2011). Low regional diversity of late cave bears mitochondrial DNA at the time of Chauvet Aurignacian paintings. *J. Archaeol. Sci.* 38, 1886-1895.
75. Szmidski, C.C., Moncel, M.-H., and Daujeard, C. (2010). New data on the Late Mousterian in Mediterranean France: First radiocarbon (AMS) dates at Saint-Marcel Cave (Ardèche). *C. R. Palevol* 9, 185-199.
76. Szmidski, C. C., Brou, L., and Jaccottey, L. (2010). Direct radiocarbon (AMS) dating of split-based points from the (Proto)Aurignacian of Trou de la Mère Clochette, Northeastern France. Implications for the characterization of the Aurignacian and the timing of technical innovations in Europe. *J. Archaeol. Sci.* 37, 3320-3337.
77. Daujeard, C., et al. (2019). Neanderthal selective hunting of reindeer? The case study of Abri du Maras (south-eastern France). *Archaeol. Anthropol. Sci.* 11, 985-1011.
78. Bocherens, H., Koch, P.L., Mariotti, A., Geraads, D., and Jaeger, J.-J. (1996). Isotopic biogeochemistry (^{13}C , ^{18}O) of mammal enamel from African Pleistocene hominid sites: implications for the preservation of paleoclimatic isotopic signals. *Palaios* 11, 306-318.
79. Knipper, C., et al. (2018). A knot in a network: Residential mobility at the Late Iron Age proto-urban centre of Basel-Gasfabrik (Switzerland) revealed by isotope analyses. *J. Archaeol. Sci. Rep.* 17, 735-753.
80. Bocherens, H., et al. (1997). Paleobiological implications of the isotopic signatures (^{13}C , ^{15}N) of fossil mammal collagen in Scladina Cave (Sclayn, Belgium). *Quat. Res.* 48, 370-380.
81. DeNiro, M.J., (1985). Postmortem preservation and alteration of in vivo bone collagen isotope ratios in relation to palaeodietary reconstruction. *Nature* 317, 806-907.
82. Van Klinken, G.J. (1999). Bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements. *J. Archaeol. Sci.* 26, 687-695.
83. Wißing, C., et al. (2016). Isotopic evidence for dietary ecology of Neandertals in North-Western Europe. *Quat. Int.* 411, 327-345.
84. Bocherens, H., Drucker, D.G., Billiou, D., Patou-Mathis, M., and Vandermeersch, B. (2005). Isotopic evidence for diet and subsistence pattern of the Saint-Césaire I Neanderthal: Review and use of a multi-source mixing model. *J. Hum. Evol.* 49, 71-87.
85. Bocherens, H., Drucker, D.G., and Madelaine, S. (2014). Evidence for a ^{15}N positive excursion in terrestrial foodwebs at the middle to upper Palaeolithic transition in South-western France: implication for early modern human palaeodiet and palaeoenvironment. *J. Hum. Evol.* 69, 31-43.
86. Garcia, N., Feranec, R.S., Passey, B.H., Cerling, T.E., and Arsuaga, J.L. (2015). Exploring the potential of laser ablation carbon isotope analysis for examining ecology during the ontogeny of Middle Pleistocene Hominins from Sima de los Huesos (Northern Spain). *PLoS ONE* 10, e0142895.

87. Yang, D.Y., Eng, B., Wayne, J.S., Dудар, J.C., and Saunders, S.R. (1998). Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Am. J. Phys. Anthropol.* 105, 539–543.
88. Gamba, C., et al. (2014). Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nat. Commun.* 5, 5257. doi:10.1038/ncomms6257
89. Rohland, N., Harney, E., Mallick, S., Nordenfelt, S., and Reich, D. (2015). Partial uracil-DNA-glycosylase treatment for screening of ancient DNA. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 370, 20130624. doi:10.1098/rstb.2013.0624
90. Meyer, M., and Kircher, M. (2010). Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harb. Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot5448
91. Seguin-Orlando, A., et al. (2013). Ligation bias in Illumina next-generation DNA libraries: Implications for sequencing ancient genomes. *PLoS ONE* 8, e78575. doi:10.1371/journal.pone.0078575 Medline
92. Enk, J.M., et al. (2014). Ancient whole genome enrichment using baits built from modern DNA. *Mol. Biol. Evol.* 31, 1292–1294.
93. Schubert, M., et al. (2014). Characterization of ancient and modern genomes by SNP detection and phylogenomic and metagenomic analysis using PALEOMIX. *Nat. Protoc.* 9, 1056–1082. doi:10.1038/nprot.2014.063
94. Lindgreen, S. (2012). AdapterRemoval: Easy cleaning of next-generation sequencing reads. *BMC Res. Notes* 5, 337. doi:10.1186/1756-0500-5-337
95. Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324
96. McKenna, A., et al. (2010). The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20, 1297–1303. doi:10.1101/gr.107524.110
97. Jónsson, H., Ginolhac, A., Schubert, M., Johnson, P., and Orlando, L. (2013). mapDamage2.0: Fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics* 29, 1682–1684. doi:10.1093/bioinformatics/btt193
98. Al-Asadi, H., Dey, K.K., Novembre, J., Stephens, M. (2019). Inference and visualization of DNA damage patterns using a grade of membership model. *Bioinformatics* 35, 1292-1298.
99. Orlando, L., et al. (2013). Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature* 499, 74–78.
100. Korneliussen, T.S., Albrechtsen, A., and Nielsen, R. (2014). ANGSD: Analysis of Next Generation Sequencing Data. *BMC Bioinformatics* 15, 356.

101. Fu, Q., et al. (2013). A revised timescale for human evolution based on ancient mitochondrial genomes. *Curr. Biol.* 23, 553–559.
102. Katoh, K., and Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780.
103. Breitwieser, F.P., Baker, D.N., and Salzberg, S.L. (2018). KrakenUniq: confident and fast metagenomics classification using unique k-mer counts. *Genome Biol.* 19, 198. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1568-0>
104. Sikora, M., et al. (2019). The population history of northeastern Siberia since the Pleistocene. *Nature* 570, 182–188.
105. Krause, J., et al. (2010). A Complete mtDNA Genome of an Early Modern Human from Kostenki, Russia. *Curr. Biol.* 20, 231–236.
106. Posth, C., et al. (2016). Pleistocene mitochondrial genomes suggest a single major dispersal of non-africans and a late glacial population turnover in Europe. *Curr. Biol.* 26, 827–833.
107. Posth, C., et al. (2017). Deeply divergent archaic mitochondrial genome provides lower time boundary for African gene flow into Neanderthals. *Nat. Commun.* 8, 16046. doi:10.1038/ncomms16046.
108. Gansauge, M.T., and Meyer, M. (2014). Selective enrichment of damaged DNA molecules for ancient genome sequencing. *Genome Res.* 24, 1543–1549.
109. Skoglund, P., et al. (2014). Separating endogenous ancient DNA from modern day contamination in a Siberian Neandertal. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111, 2229-2234.
110. Briggs, A.W., et al. (2009). Targeted retrieval and analysis of five neandertal mtDNA genomes. *Science* 325, 318-321.
111. Meyer, M., et al. (2016). Nuclear DNA sequences from the Middle Pleistocene Sima de los Huesos hominins. *Nature* 531, 504-507.
112. Slon, V., et al. (2017). Neandertal and Denisovan DNA from Pleistocene sediments. *Science* 608, 605-608.
113. Reich, D., et al. (2010). Genetic history of an archaic hominin group from Denisova cave in Siberia. *Nature* 468, 1053-1060.
114. Meyer, M., et al. (2012). A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual. *Science* 338, 222-226.
115. Sawyer, S., et al. (2015). Nuclear and mitochondrial DNA sequences from two Denisovan individuals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 112, 15696-15700. doi:10.1073/pnas.1519905112.

116. Slon, V., et al. (2017). A fourth Denisovan individual. *Sci. Adv.* 3, e1700186.
doi:10.1126/sciadv.1700186.
117. Kozlov, A.M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., and Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: A fast, scalable, and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics* 35, 4453–4455.
118. Schliep, K.P. (2011). Phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 27, 592–593.
119. Fu, Q., et al. (2013). DNA analysis of an early modern human from Tianyuan Cave, China. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 110, 2223–2227.
120. Krause, J., et al. (2010). The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia. *Nature* 464, 894–897.
121. Ingman, M., Kaessmann, H., Paabo, S., and Gyllensten, U. (2001). Erratum: correction: Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 410, 611–611.
122. Bouckaert, R.R., and Drummond, A.J. (2017). bModelTest: Bayesian phylogenetic site model averaging and model comparison. *BMC Evol. Biol.* 17, 1–11.
123. Petr, M., et al. (2020). The evolutionary history of Neanderthal and Denisovan Y chromosomes. *Science* 369, 1653–1655. doi: 10.1126/science.abb6460
124. Broushaki, F., et al. (2016). Early Neolithic genomes from the eastern Fertile Crescent. *Science* 353, 499–504.
125. Hofmanová, Z., et al. (2016). Early farmers from across Europe directly descended from Neolithic Aegeans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 113, 6886–6891.
126. Jones, E.R., et al. (2015). Upper Palaeolithic genomes reveal deep roots of modern Eurasians. *Nat. Commun.* 6, 1–8.
127. Lazaridis, I., et al. (2014). Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans. *Nature* 513, 409–413.
128. de Barros Damgaard, P., et al. (2018). The first horse herders and the impact of early Bronze Age steppe expansions into Asia. *Science* 360, eaar7711.
129. Fu, Q., et al. (2014). Genome sequence of a 45,000-year-old modern human from western Siberia. *Nature* 514, 445–449.
130. Moreno-Mayar, J.V., et al. (2018). Terminal Pleistocene Alaskan genome reveals first founding population of Native Americans. *Nature* 553, 203–207.

131. Slon, V., et al. (2018). The genome of the offspring of a Neanderthal mother and a Denisovan father. *Nature* 561, 113–116.
132. Li, H., et al. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079.
133. Purcell, S., et al. (2007). PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 559–575.
134. Patterson, N., Price, A.L., and Reich, D. (2006). Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genet.* 2, 2074–2093.
135. Oksanen, J., et al. (2019). *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-4.
136. Pickrell, J.K., Pritchard, J.K. (2012). Inference of Population Splits and Mixtures from Genome-Wide Allele Frequency Data. *PLoS Genet.* 8, 1002967.
137. Mallick, S. (2016). The Simons Genome Diversity Project: 300 genomes from 142 diverse populations. *Nature* 538, 201–206.
138. Tibshirani, R., et al. (2005). Sparsity and smoothness via the fused lasso. *J. Royal Stat. Soc. B.* 67, 91-108.
139. Arnold, T., and Tibshirani, R. (2016). Efficient Implementations of the Generalized Lasso Dual Path Algorithm. *J. Comp. Graph. Stat.* 25, 1-27.
140. Niewoehner, W.A. (2008). Neanderthal hands in their proper perspective. In *Neanderthals Revisited: New Approaches and Perspectives*, K. Harvati, and T. Harrison, eds. (Springer, Netherlands,), pp. 157-190.

141. Trinkaus, E., Haduch, E., Valde-Nowak, P.W., and Wojtal, P. (2014). The Oblazowa 1 early modern human pollical phalanx and Late Pleistocene distal thumb proportions. *Homo*, 65, 1-12.
142. Trinkaus, E. (2016). The evolution of the hand in Pleistocene *Homo*. In *The Evolution of the Primate Hand: Anatomical, Developmental, Functional and Paleontological Evidence*, T. L. Kivell, P. Lemelin, B.G. Richmond, D. Schmitt, eds. (Springer, New York), pp. 545-571.
143. Villemeur, I. (1994). *La Main des Néandertaliens* (C.N.R.S. Editions, Paris).
144. The 1000 Genomes Project Consortium. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467, 1061-1073.
145. Rasmussen, M., et al. (2011). An aboriginal Australian genome reveals separate human dispersals into Asia. *Science* 334, 94-98.
146. Tamura, K., and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512-526.
147. Kass, R.E., and Raftery, A.E. (1995). Bayes Factors. *J. Am. Stat. Assoc.* 90, 773-795.
148. Skoglund, P., et al. (2012). Origins and Genetic Legacy of Neolithic Farmers and Hunter-Gatherers in Europe. *Science* 336, 466-469.
149. Zhao, J., and Grant, S.F.A, (2011). Advances in whole genome sequencing technology. *Curr. Pharmaceutical Biotech.* 12(2), 293-305.
150. Adcock, G.J., Dennis, E.S., Easteal, S., Huttley, G.A., Jermiin, L.S., Peacock, W.J., and Thorne, A. (2001). Mitochondrial DNA sequences in ancient Australians: implications for modern human origins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(2), 537-542.
151. Eriksson, A., and Manica, A. (2012). Effect of ancient population structure on the degree of polymorphism shared between modern human populations and ancient hominins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(35), 13956-13960.
152. Hawks, J. (2013). Significance of Neandertal and Denisovan genomes in human evolution. *Annu. Rev. Anthropol.* 42, 433-449.
153. Fu, Q., et al. (2015). An early modern human from Romania with a recent Neanderthal ancestor. *Nature* 524(7564), 216-219.
154. Kuhlwilm, M., et al. (2016). Ancient gene flow from early modern humans into Eastern Neanderthals. *Nature* 530(7591), 429-433.
155. Buckley M. (2013). A molecular phylogeny of *Plesiorcyteropus* reassigns the extinct mammalian order 'Bibymalagasia'. *PLoS One*, 8(3), e59614.

156. Breuil, H. (1913). Les subdivisions de Paléolithique supérieur et leur signification. In: Congrès International d'Anthropologie et d'Archéologie Préhistorique, Genève 1912: 65-238.
157. Bordes, F. (1968). La question Périgordienne. *La Préhistoire: Problèmes et Tendances*. CNRS, Paris: 59-70.
158. Pelegrin, J. (1995). *Technologie Lithique: Le Châtelperronien de Roc-de-Combe (Lot) et de La Côte (Dordogne)*. CNRS, Paris.
159. Pelegrin, J., and Soressi, M. (2007). Le Châtelperronien et ses rapports avec le Moustérien. In: Vandermeersch, B., Maureille, B. (Eds.), *Les Néandertaliens: Biologie et Cultures*, Paris, pp. 283-296.
160. Leroi-Gourhan, A., and Leroi-Gourhan, Ar. (1964). Chronologie des grottes d'Arcy-sur-Cure (Yonne). *Gallia Préhist.* 7, 1-64.
161. Lévêque, F., and Vandermeersch B. (1980). Les découvertes de restes humains dans un horizon castelperronien de Saint-Césaire (Charente-Maritime). *Bull. de la Soc. Préhist. de Française* 77, 187–189.
162. Bar-Yosef, O., and Bordes, J.G. (2010). Who were the makers of the Châtelperronian culture? *J. Human Evol.* 59(5), 586-93.
163. Gravina, B., Bachellerie, F., Caux, S., Discamps, E., Faivre, J.P., Galland, A., Michel, A., Teyssandier, N., and Bordes, J.G. (2018). No reliable evidence for a Neanderthal-Châtelperronian association at La Roche-à-Pierrot, Saint-Césaire. *Sci. Rep.* 8(1), 1-12.
164. Higham, T., Jacobi, R., Julien, M., David, F., Basell, L., Wood, R., Davies, W., and Ramsey, C.B. (2010). Chronology of the Grotte du Renne (France) and implications for the context of ornaments and human remains within the Châtelperronian. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107(47), 20234-20239.
165. Hublin, J.J., Talamo, S., Julien, M., David, F., Connet, N., Bodu, P., Vandermeersch, B., and Richards, M.P. (2012). Radiocarbon dates from the Grotte du Renne and Saint-Césaire support a Neandertal origin for the Châtelperronian. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(46), 18743-18748.
166. Maureille, B., and Hublin, J.J. (2019). L'Homme châtelperronien de la Grotte du Renne et l'inventaire des vestiges humains des grottes d'Arcy-sur-Cure. *Le Châtelperronien de la grotte du Renne (Arcy-sur-Cure, Yonne, France)*. *Paleo. Special issue*, 365-408.
167. Chen, F., et al. (2019). A late middle pleistocene denisovan mandible from the Tibetan plateau. *Nature* 569(7756), 409-412.
168. Buckley, M., Fariña, R.A., Lawless, C., Tambusso, P.S., Varela, L., Carlini, A.A., Powell, J.E., and Martinez, J.G. (2015). Collagen sequence analysis of the extinct giant ground sloths *Lestodon* and *Megatherium*. *PLoS ONE* 10(12), e0144793.

169. Shao, Q., Bahain, J.-J., Dolo, J.-M., and Falguères, C. (2014). Monte Carlo approach to calculate US-ESR age and age uncertainty for tooth enamel. *Quat. Geochron.* 22, 99-106.
170. Guérin, G., Mercier, N., and Adamiec, G. (2011). Dose rate conversion factors: update. *Anc. TL* 29, 5-8.
171. Grün, R. (2009). The DATA program for the calculation of ESR age estimates on tooth enamel. *Quat. Geochron.* 4, 231-232.
172. Karmin, M., et al. (2015). A recent bottleneck of Y chromosome diversity coincides with a global change in culture. *Genome Res.* 25, 459-466. doi:10.1101/gr.186684.114
173. Gallego Llorente, M., et al. (2015). Ancient Ethiopian genome reveals extensive Eurasian admixture throughout the African continent. *Science* 350, 820-822. doi: 10.1126/science.aad2879.
174. Rasmussen, M., et al. (2014). The genome of a Late Pleistocene human from a Clovis burial site in western Montana. *Nature* 506, 225-229. doi:10.1038/nature13025
175. White, T.D., and Folkens, P.A. (2000). *Human Osteology*, 2nd edition (Academic Press, New York).

Acknowledgements: We deeply acknowledge the Service Régional de l'Archéologie Auvergne Rhône-Alpes, the city of Malataverne, and all of the students/volunteers that supported the 30 years of continuous field research in Grotte Mandrin. The authors acknowledge Professors E. Willerslev and L. Orlando for fruitful discussions and continuous support. We thank the laboratory technicians of the Danish National High-throughput DNA Sequencing Center, as well as Tina B. Brand, Pernille V. S. Olsen and Jesper Stenderup from the Lundbeck Foundation Center for GeoGenetics for technical assistance. Thanks also go to Manasij Pal Chowdhury for assistance with the paleoproteomics data availability.

Funding: Long-term research was supported by the Service Régional de l'Archéologie Auvergne Rhône-Alpes, the French CNRS and the city of Malataverne. 3D site models were granted by the city of Malataverne and the Auvergne Rhône-Alpes region. This project received funding from the European Research Council (ERC) under the Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) grant no. 324139 ("PalaeoChron") awarded to T.H. The geochronology research conducted by M.D. and L.A. was supported by Australian Research Council Future Fellowship grant FT200100816.

Author contributions: L.S. and L.M. lead the scientific project and excavated the site. Microtomographic-based data were collected and analyzed by C.Z. L.S. analyzed the lithic technical systems. H.Co., O.D. and C.Z. studied human remains. Spatial analyses were performed by P.Y. and X.M. H.Ca. recorded and analyzed stratigraphy and deposit dynamics. Radiometric dating analyses and Bayesian age modeling were performed by T.H., R.J-B, L.A., M.D, M.F., T.D. and D.C. H.B. performed and interpreted the isotopic measurements on bones and teeth. M.S. coordinated the ancient DNA analyses. A.S.O performed the ancient DNA laboratory work and sequencing. T.V. and M.S. analyzed the genomic data. L.S., C.Z., M.S.,

T.V., and J.E.L. wrote the manuscript with contributions from all other authors. A.S.O., T.V., and L.S. wrote the supplementary materials with contributions from all other authors.

Competing interests: Authors declare no competing interests.

Data and materials availability: Include a note explaining any restrictions on materials, such as materials transfer agreements. Note accession numbers to any data relating to the paper and deposited in a public database; include a brief description of the data set or model with the number. If all data are in the paper and supplementary materials include the sentence “All data is available in the main text or the supplementary materials.” All data, code, and materials used in the analysis must be available in some form to any researcher for purposes of reproducing or extending the analysis.

Supplementary Materials:

Materials and Methods

Supplementary Note 1. Site and fossil descriptions

Supplementary Note 2. Quality control and contamination estimates

Supplementary Note 3. Uniparental markers: Mitochondrial & Y-chromosome analysis

Supplementary Note 4. Population genetic analyses

Figures S1-S24

Tables S1-S36

Supplementary References

Figures

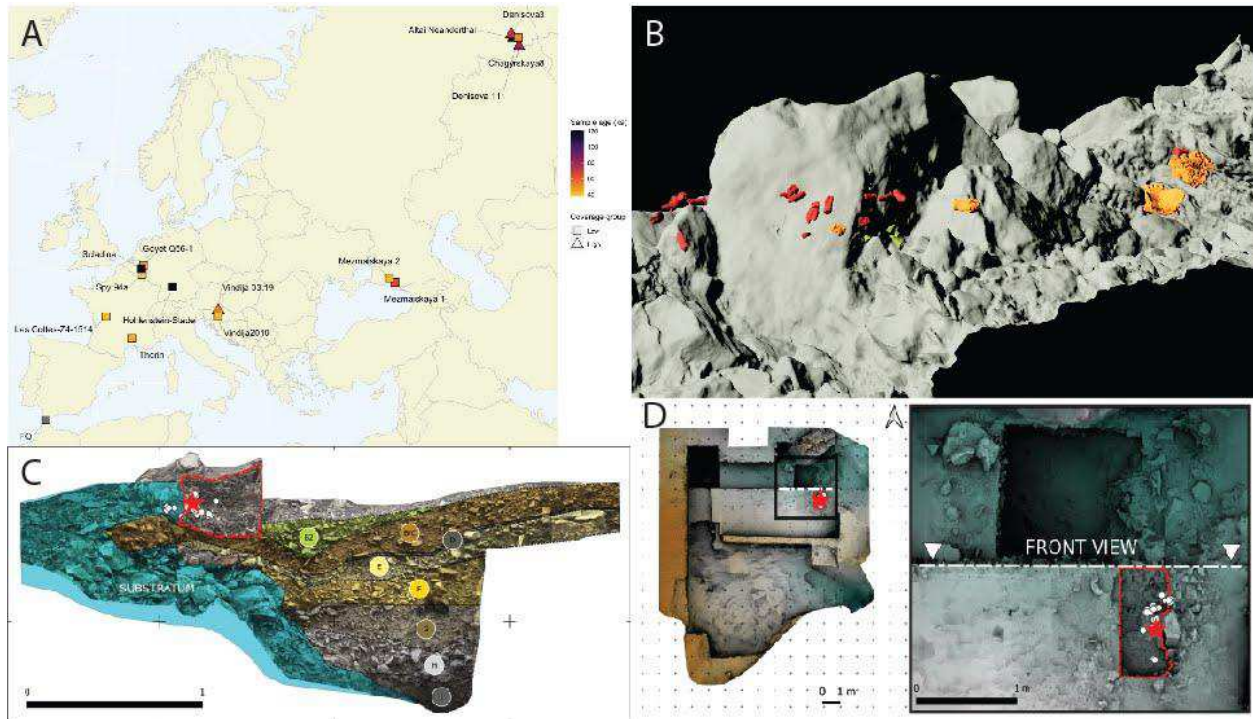


Fig. 1. (A) Map showing geographic location, ages, and coverage group of Neanderthal fossils with genome-wide data used in this study. (B) 3D model of the disposition of the Thorin fossils during discovery. Stratigraphic (C) and plan (D) views through Mandrin showing Thorin's discovery location.

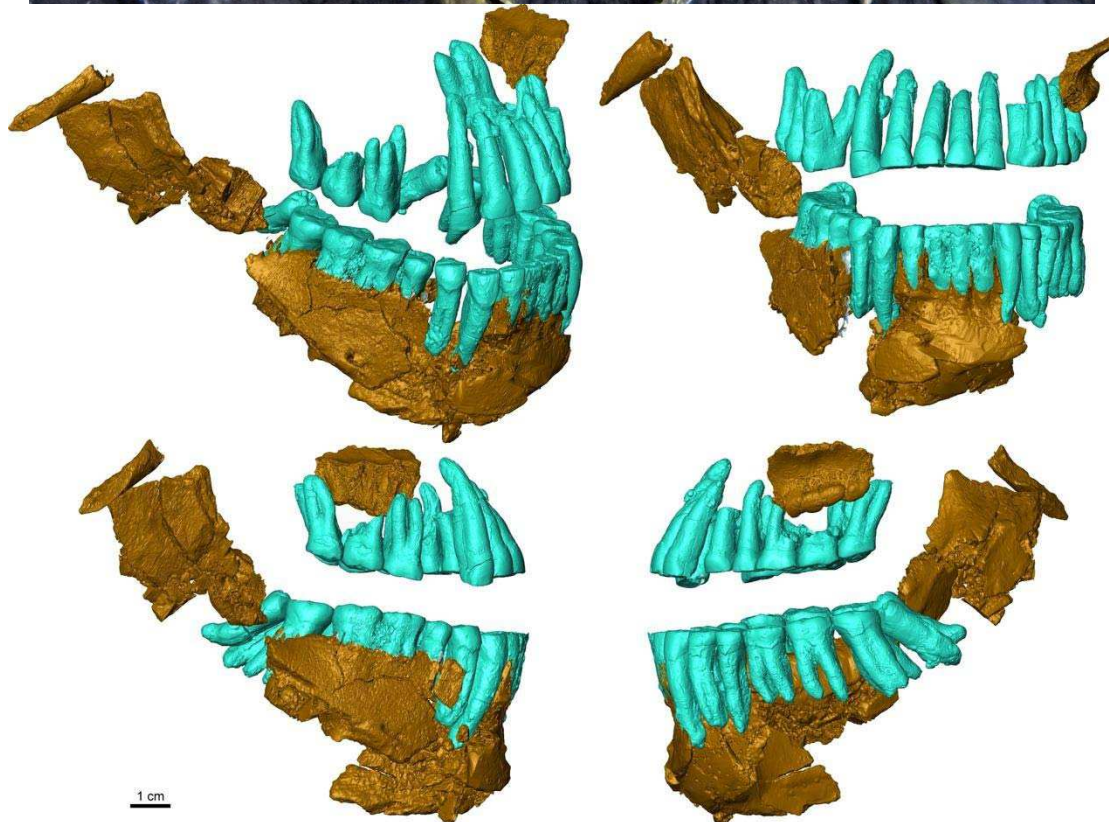


Fig. 2. The Thorin Neanderthal. **Top.** View of the mandible *in situ* when found in September 2019. **Bottom.** Virtual reconstruction of the jaw and dental elements of Thorin in tilted (upper left), anterior (upper right), and lateral (bottom right and left) views.

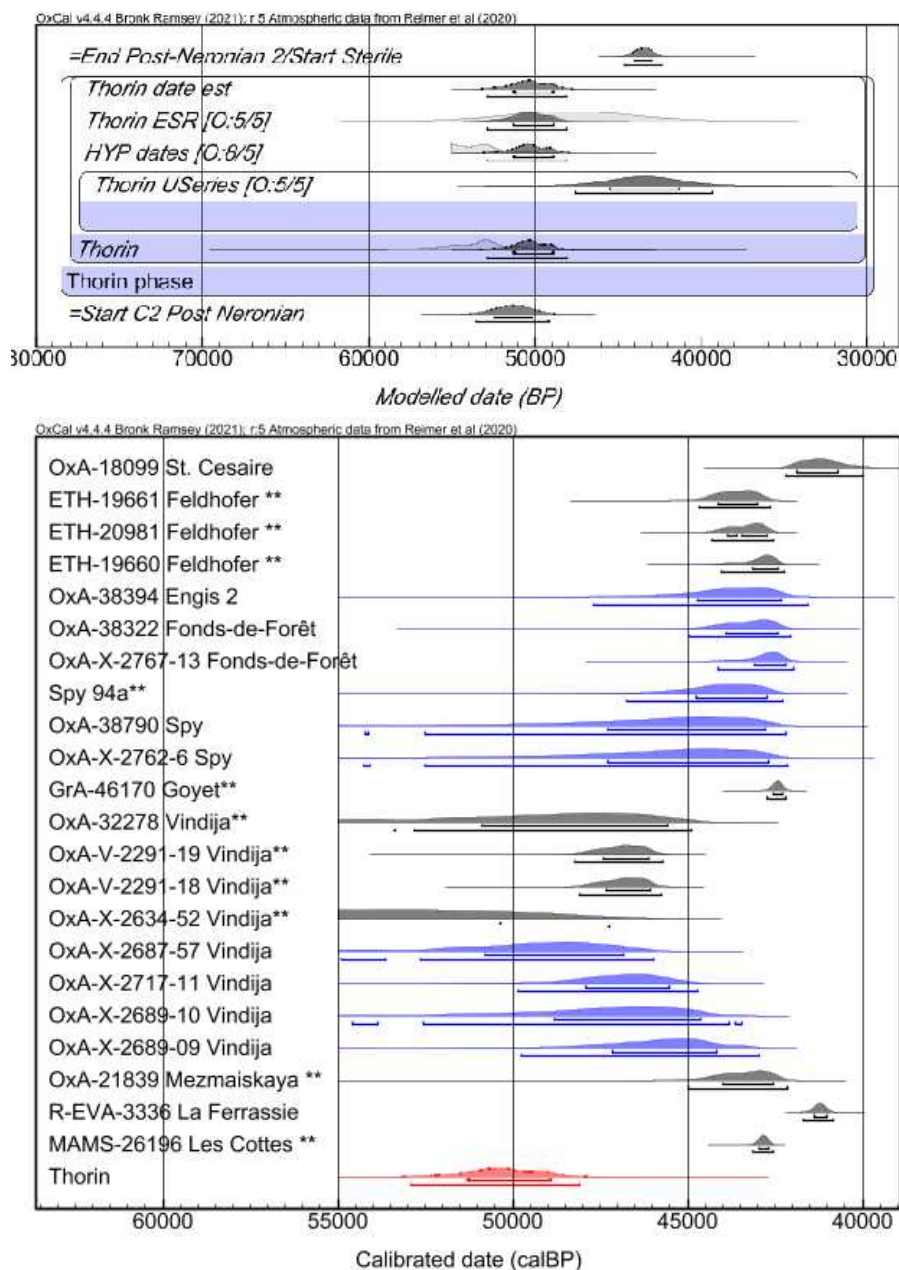


Fig. 3. Bayesian modeling of Mandrin's Post-Neronian II levels containing Thorin. Top. The PN2 phase of the Mandrin Bayesian model used to determine the age of Thorin. The direct ages on Thorin comprise an ESR age, a U-series age constrained as a minimum age and three pooled mean Hydroxyproline AMS ages). Outliers are included in the format [Outlier:posterior/prior]. The boundaries are cross-referenced to the main Bayesian model established for the site, and represent the start and end dates of the PN2. **Bottom.** Comparison of the Thorin modeled age against other 'late' Neanderthals. Calibrated likelihoods in blue represent AMS dates obtained using HYP protocols. ** indicates high or low autosomal coverage of the dated specimen. Other likelihoods in black represent dates obtained on bulk or ultrafiltered/purified collagen samples. Dates are after refs. 16 and 31-37.

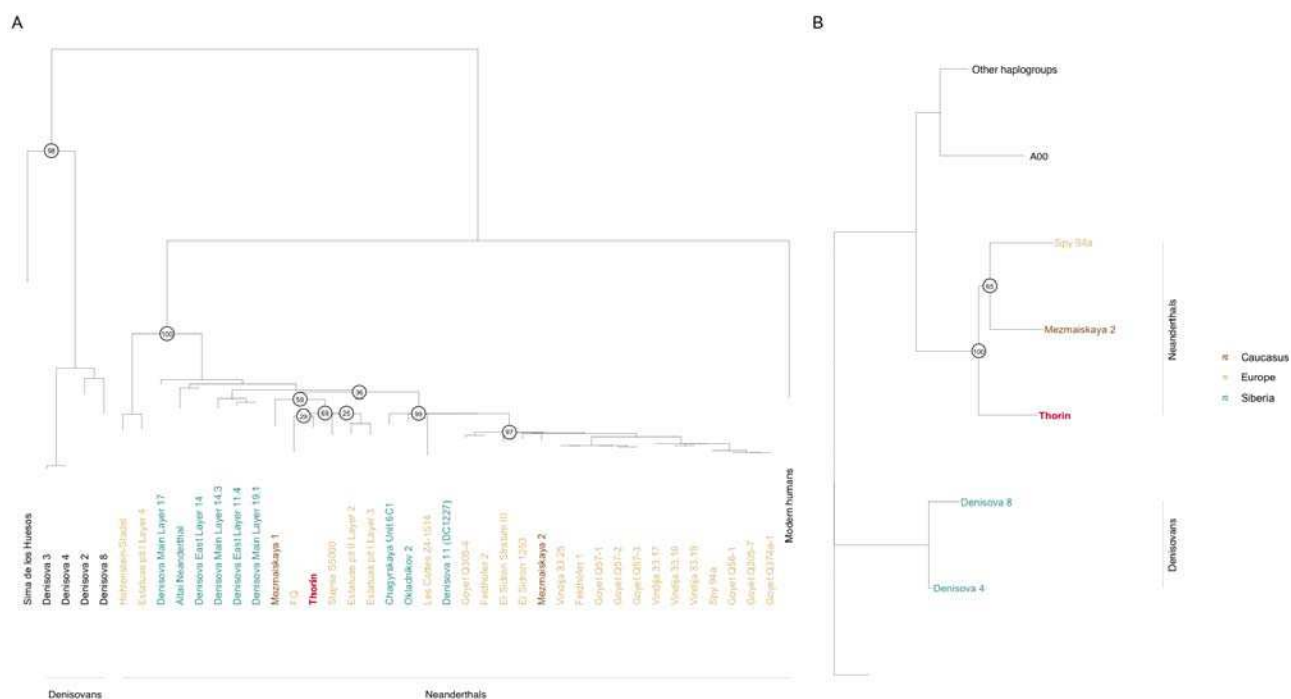


Fig. 4. Genetic affinities of Thorin Neanderthal with respect to previously published archaic hominins. (A) Maximum likelihood tree of mitochondrial DNA sequences. (B) Neighbor joining tree of Y chromosome sequences.

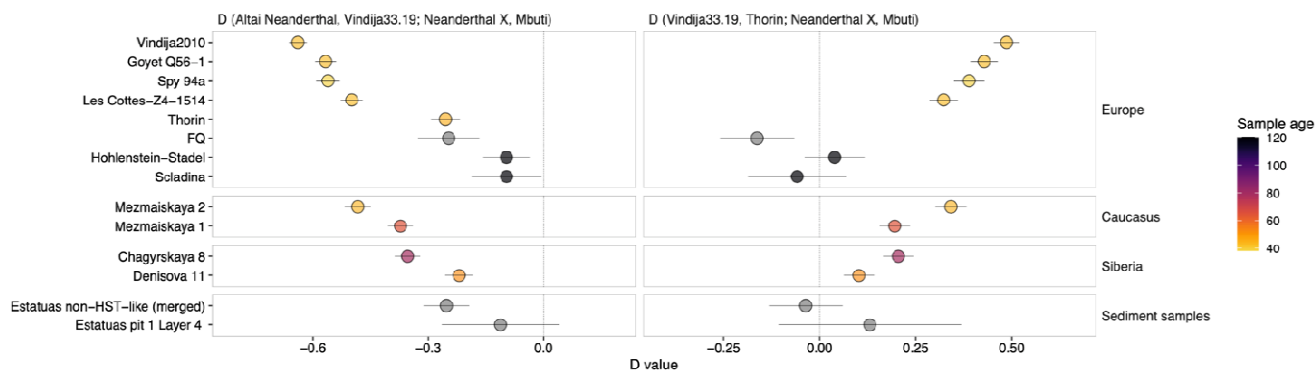


Fig. 5. Genetic affinities of Thorin. (*left*) D-statistics of the form $D(\text{Altai Neanderthal, Vindija 33.19; Neanderthal X, Mbuti})$, showing that all Eurasian Neanderthal samples share more alleles with Vindija 33.19 than with the Altai Neanderthal. Thorin shares relatively more alleles with Vindija 33.19 than early European Neanderthals of the putative first radiation (HST, Scladina, Estatuas pit 1 Layer 4), but less than the second radiation (Mezmaiskaya 1, Chagyrskaya 8). (*right*) D-statistics of the form $D(\text{Vindija 33.19, Thorin; Neanderthal X, Mbuti})$, showing that Neanderthals from Europe, the Caucasus, and Siberia younger than 80 ka share more alleles with Vindija 33.19 than with Thorin. The exception is the Gibraltar Neanderthal sample (FQ), which shows increased affinity with Thorin. Error bars indicate $3 \times$ standard error ($|Z| = 3$).

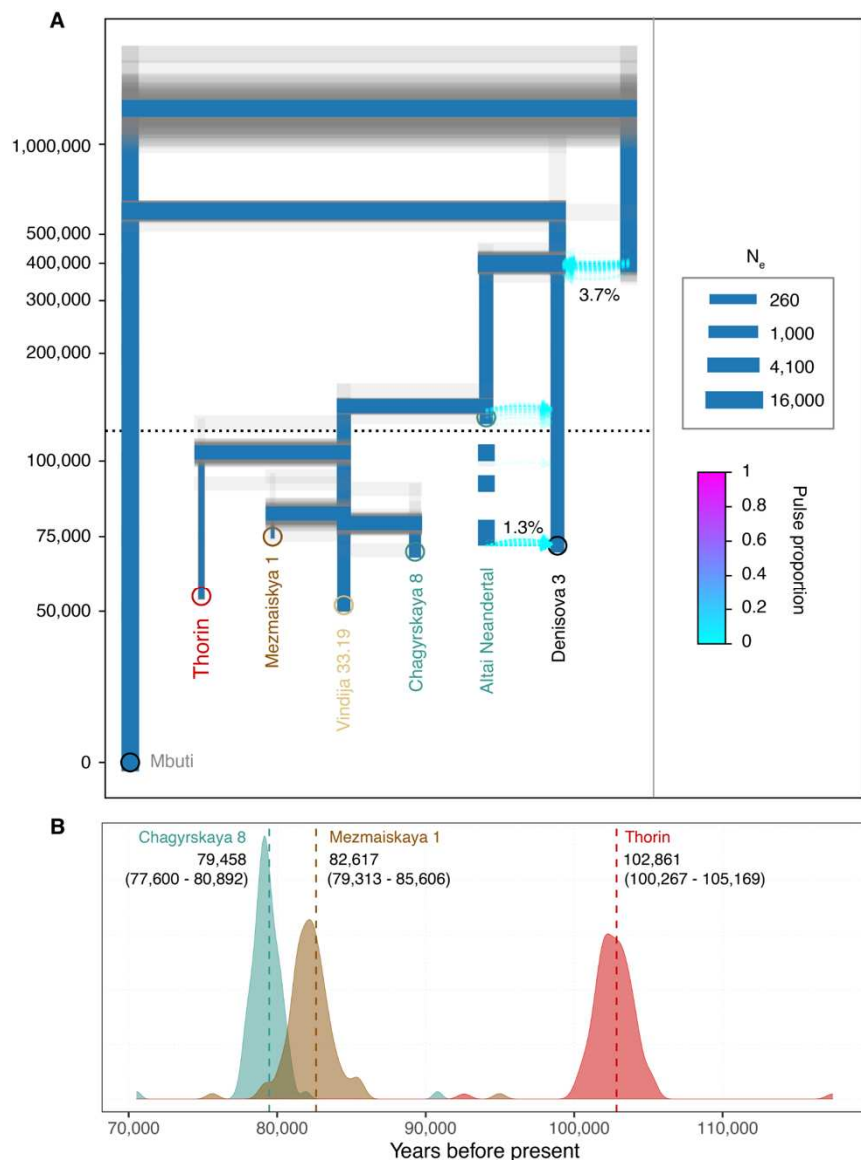


Fig. 6. Demographic history of the Thorin lineage. (A) Best-fitting demographic model relating Thorin to other Neanderthal and Denisovan genomes. Blue branches show point estimates, whereas gray transparent branches indicate estimates obtained using 100 nonparametric bootstrap replicates. (B) Point estimates (dashed line) and density of 100 parametric bootstrap replicates for divergence time parameters of Thorin, Mezmaiskaya 1 and Chagyrskaya 8 Neanderthal genomes from the late European Neanderthal Vindija 33.19.

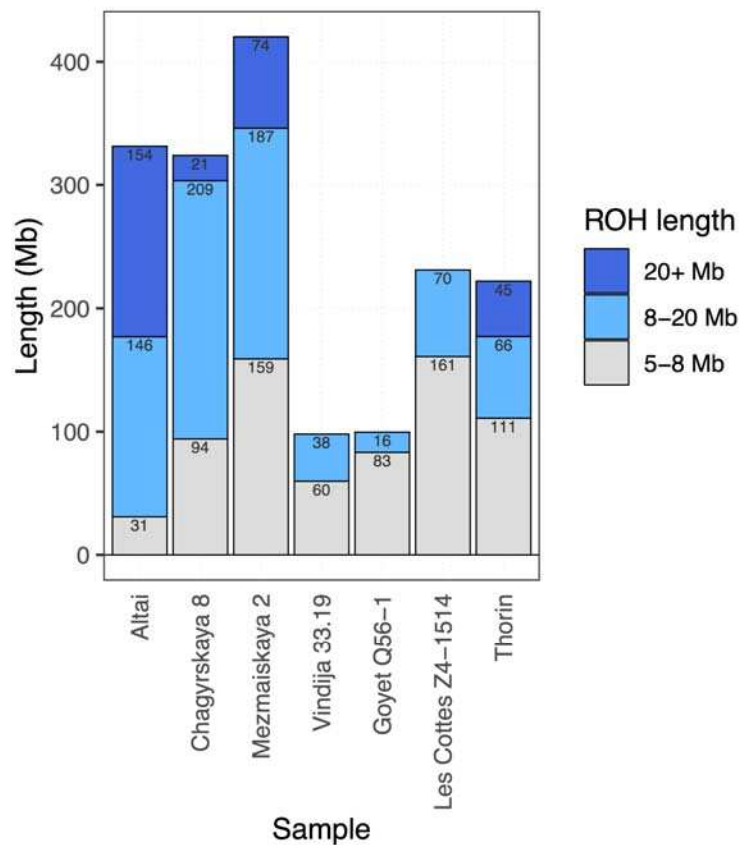


Fig. 7. Runs of homozygosity in Neanderthals. Bar plot showing cumulative total length of ROHs ≥ 5 Mb in Thorin and other Neanderthal genomes with average genomic coverage $\geq 1.5X$. ROH length classes are distinguished by bar colors, with total length in each class indicated.