



énergie atomique • énergies alternatives

UNIVERSITE PARIS-SUD 11

ÉCOLE DOCTORALE : GENES GENOMES CELLULES
Service de Biologie Intégrative et Génétique Moléculaire (CEA Saclay)

DISCIPLINE : BIOLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT
soutenue le 23/09/2011

par

Céline BON

Contribution de la Paléogénétique et de la
Paléogénomique à l'étude des sites archéologiques

Directeur de thèse : Jean-Marc ELALOUF

Chercheur (CEA, Saclay)

Composition du jury :

Président du jury :

M. Pierre CAPY

Professeur (Université Paris Sud-XI)

Rapporteurs :

M. Thomas Gilbert

Professeur (National History Museum of Denmark)

Mme Evelyne HEYER

Professeur (Museum National d'Histoire Naturelle)

Examineur :

M. Alain ARGANT

Chercheur (UMR6636, CNRS)

A Norbert Aujoulat,
dont le souvenir m'a accompagnée tout au long de la rédaction de cette thèse

A Bernard Bodo, mon oncle,
qui m'a transmis son amour de la science

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Marc Elalouf, mon directeur de thèse. Jean-Marc, vous m'avez accueillie dans le laboratoire et vous m'avez proposé de travailler sur ce sujet fascinant, la Grotte Chauvet. Vous m'avez intégrée dans l'équipe, vous m'avez permis d'entrer dans ce site extraordinaire. Avec beaucoup de patience (et dieu sait s'il en fallait !), vous m'avez appris à manipuler, à rédiger, à présenter. Au fur et à mesure des projets, nous avons vécu des moments exaltants, et d'autres plus difficiles, mais toujours dans la sérénité propice au travail. Mille fois merci pour ces cinq années passées au laboratoire et pour tout ce que vous m'avez apporté !

Je tiens également à remercier mon jury pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail. Merci au Pr Pierre Capy de m'avoir formée, il y a quelques années maintenant, dans l'étude des mécanismes de l'Evolution et de ses beautés. Je suis très heureuse d'avoir pu soutenir ma thèse devant vous, refermant ainsi la boucle initiée en Master.

Merci au Pr Evelyne Heyer pour ses conseils toujours pertinents, durant ma thèse et lors de la soutenance.

Merci au Pr Thomas Gilbert pour avoir lu et évalué cette thèse au pied levé. It was a real pleasure to discuss with you about my project.

Merci à Alain Argant d'avoir apporté son regard de paléontologue sur mon travail.

Je voudrais également remercier Michel Werner et Christophe Carles, successivement à la tête du Service de Biologie Intégrative et Génétique Moléculaire, pour avoir soutenu notre projet 'exotique' contre vents et marées.

Dominique Baffier, conservatrice de la Grotte Chauvet, m'a autorisé l'entrée dans la Grotte Chauvet, dans laquelle j'ai pu me rendre un grand nombre de fois. C'est un privilège fabuleux pour lequel je suis infiniment reconnaissante à Mme Baffier. Nous avons également eu l'autorisation de prélever dans ce site si protégé, de nombreux échantillons qui ont été fondamentaux dans mon projet de thèse. J'espère que les résultats que nous avons obtenus convainquent que le sacrifice de ces échantillons n'était pas inutile.

Jean-Michel Geneste m'a accueillie dans l'équipe scientifique de la Grotte Chauvet qu'il dirige et nous a généreusement soutenu dans l'étude génétique que nous menions sur les échantillons de Chauvet.

Je suis également reconnaissante à Jean Clottes d'avoir encouragé les études de paléogénétique dans la Grotte Chauvet. Avoir pu le cotoyer et entendre de sa bouche, avec son merveilleux talent de conteur, ses aventures extraordinaires fait partie des privilèges que cette thèse m'a apportée.

Je souhaite remercier aussi toute l'équipe scientifique de Chauvet pour leur accueil chaleureux dans l'équipe. Malgré le sujet très différent, et bien que je n'étais présente qu'occasionnellement durant les campagnes, je me suis toujours sentie intégrée dans l'équipe. Bernard Gely, Frederic Maksud, Valérie Feruglio, Michel Philippe, Philippe Fosse, Carole Fritz, Gilles Tosello, Marc Azéma, Hélène Valladas, Evelyne Debard, Bertrand Kervazo, Jean-Jacques Delannoy, Julien Monney, merci pour les discussions passionnantes que nous avons pu avoir dans la Grotte ou autour d'un verre de pec, à Salavas. Vous avez exaucé un rêve de petite fille.

Un mot particulier pour Norbert Aujoulat. Norbert fut mon premier guide dans Chauvet. J'entendrai toujours son accent chantant me décrivant les peintures et les gravures de la Grotte. Je me souviendrai de ce dernier après-midi passé dans la Salle du Fond en sa compagnie, pendant qu'il photographiait le panneau des Félines. Norbert était un puits de savoir qu'il transmettait avec passion, mais aussi un homme chaleureux et généreux dont la perte me désole.

Merci à Christian de nous avoir accueilli si chaleureusement à Salavas.

Mes remerciements se tournent vers Didier Casane, qui, après avoir été un professeur passionnant et rigoureux, s'est révélé être un collaborateur enthousiaste.

Je suis reconnaissante à Arnaud Martel pour son assistance dans les analyses de bio-informatique. Je n'aurais pas pu m'en sortir sans ses conseils avisés et son assistance de tous les instants. Merci également à Jean-Marc Aury qui a rendu nos banques de fragments utilisables pour les analyses, et dont les conseils nous ont été utiles.

Je remercie Renaud Vitalis dont l'aide a été précieuse pour analyser les données de génétique des populations.

Merci à Nicolas pour sa patience légendaire : mon apprentissage de la biologie moléculaire a pris du temps, beaucoup de temps et beaucoup, beaucoup de bourdes que tu as rattrapées avec talent. Ton accueil chaleureux de 'grand frère' m'a très vite mise à l'aise. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi.

Véronique, ton arrivée au laboratoire a été une bénédiction ! Ton assistance dans la poursuite des projets m'a été extrêmement utile. Et que dire du plaisir de partager le bureau avec Nad'a et toi ?

Nos discussions de musiques, de films, de mode, nos cafés du matin partagés toutes les trois, ont été des rayons de soleil.

Nad'a, j'ai été très heureuse de partager cette expérience avec toi. Bien que nous ne travaillions pas sur le même sujet, nos deux thèses se sont effectuées en parallèle, jusqu'aux moments exaltants de la rédaction du manuscrit, de son impression et de la soutenance. Ta présence m'a beaucoup épaulée !

Merci à Pascal, Vivienne, Arounie, Julie, Guilhem, Camille, Fanny, Helen, Gilles, Tomio, Marie-Claude, Michel..., pour la bonne ambiance que vous avez créée, pour les conseils, les déjeuners, les cafés, les discussions sans fin, votre présence, en un mot, chaleureuse et amicale.

Les sessions Irtelis ont été à la fois très intéressantes, très utiles et très plaisantes : merci à Christophe Carles et à Sylvie Esterlin de les avoir organisées, et à Emilie, Julien, Julia, Arounie, Anastazia, Adeline, Arezki, Julie, Agnès, Yue d'avoir participé à cette ambiance de promo géniale !

Enfin, last but not least, je tiens à remercier mes parents pour leur présence et leur aide. Vous m'avez écoutée sans broncher parler de mes ours, de mes hyènes, de mon ADN ancien. Vous m'avez consolée, parfois, et ouvert les bouteilles de champagne quand il le fallait. Vous m'avez aidée, relue, corrigée, soutenue. Vous avez été là, et jamais je ne vous remercierai assez.

Benoît, il n'est pas de mots pour te dire à quel point ta présence m'a été indispensable durant ces cinq années. Sans toi, sans ton soutien aveugle, sans la certitude de te retrouver tous les soirs, ces années auraient été beaucoup moins belles.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE

PARTIE 1 : INTRODUCTION

1. LA FAUNE DU PLEISTOCENE	15
1.1. DONNEES PALEONTOLOGIQUES SUR L'OURS DES CAVERNES.....	15
1.1.1. CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DE L'OURS DES CAVERNES	16
1.1.2. POSITION SYSTEMATIQUE DE L'OURS DES CAVERNES	17
1.1.3. PALEO-ETHOLOGIE DE L'OURS DES CAVERNES	22
1.1.4. DONNEES ISOTOPIQUES DEFINISSANT LE REGIME ALIMENTAIRE DE L'OURS DES CAVERNES	24
1.2. DONNEES PALEONTOLOGIQUES SUR L'HYENE DES CAVERNES	28
1.2.1. CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DE L'HYENE DES CAVERNES	28
1.2.2. ORIGINE EVOLUTIVE DE L'HYENE DES CAVERNES	29
1.2.3. ALIMENTATION	30
1.2.4. PALEO-ETHOLOGIE DE L'HYENE DES CAVERNES	30
2. LA PALEOGENETIQUE	32
2.1. LA NAISSANCE TUMULTUEUSE D'UNE DISCIPLINE	32
2.2. LES LIMITES DE LA PALEOGENETIQUE.....	34
2.2.1. LA DEGRADATION DE L'ADN	34
2.2.2. L'ETABLISSEMENT DE LESIONS BLOQUANTES	36
2.2.3. LES DOMMAGES DE L'ADN.....	38
2.2.4. LA PRESENCE DE MOLECULES INHIBITRICES.....	40
2.2.5. LES RISQUES DE CONTAMINATION	41
2.2.6. LES MESURES DE PRECAUTIONS PERMETTANT D'EVITER LES CONTAMINATIONS	42
2.3. LES METHODES DE L'ADN ANCIEN.....	43
2.3.1. LES MATERIAUX UTILISES.....	43
2.3.2. LES SEQUENCES D'ADN CIBLEES	51
2.4. LES APPORTS DE LA PALEOGENETIQUE.....	59
2.4.1. IDENTIFICATION DE VESTIGES	60
2.4.2. RECONSTITUTION DE PHYLOGENIES.....	61
2.4.3. ÉTUDE EN GENETIQUE DES POPULATIONS	61
3. LES GROTTES D'OU PROVIENNENT LES ECHANTILLONS ETUDIES.	63
3.1. PRESENTATION GENERALE DES GROTTES DES GORGES DE L'ARDECHE.....	63
3.2. LA GROTTE CHAUVET-PONT D'ARC	65
3.2.1. DECOUVERTE DE LA GROTTE CHAUVET-PONT D'ARC.....	65
3.2.2. LA PROTECTION D'UN PATRIMOINE UNIQUE AU MONDE.	65
3.2.3. LES REPRESENTATIONS ARTISTIQUES DE LA GROTTE CHAUVET-PONT D'ARC.....	67
3.2.4. LES OCCUPATIONS HUMAINES DE LA GROTTE CHAUVET-PONT D'ARC	68
3.2.5. LES OCCUPATIONS ANIMALES	69
3.3. LA GROTTE DES DEUX-OUVERTURES.....	76
3.3.1. DECOUVERTE DE LA GROTTE DES DEUX-OUVERTURES	76
3.3.2. LES OCCUPATIONS HUMAINES DANS LA GROTTE DES DEUX-OUVERTURES	78
3.3.3. LES OCCUPATIONS URSINES DANS LA GROTTE DES DEUX-OUVERTURES	78
3.4. LA GROTTE DE COUMERE	80

PARTIE 2 : ETUDE GENETIQUE DES OURS DES CAVERNES DES GORGES DE L'ARDECHE

1. SEQUENÇAGE DU GENOME MITOCHONDRIAL DE L'OURS DES CAVERNES.....	82
1.1. INTRODUCTION	82
1.2. RESULTATS : ARTICLE 1	85
1.3. COMPARAISON AVEC LES AUTRES SEQUENCES D'OURS ANCIENS	106
1.4. CONCLUSION.....	109
2. ANALYSE GENETIQUE DES POPULATIONS D'OURS DES CAVERNES DE LA VALLEE DE L'ARDECHE	110
2.1. INTRODUCTION	110
2.2. RESULTATS : ARTICLE 2	113
2.3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES SUR LA GROTTES DES DEUX-OUVERTURES.....	147
2.4. DISCUSSION	148
2.4.1. CONSERVATION DES ECHANTILLONS.....	148
2.4.2. COMPARAISON DES POPULATIONS D'OURS DES GROTTES CHAUVET-PONT D'ARC ET DES DEUX-OUVERTURES.....	149
2.4.3. APPORTS SUR LES CAUSES DE LA DISPARITION DES OURS DES CAVERNES EN ARDECHE ET SUR LA CONNAISSANCE DU SITE.....	149

PARTIE 3 : étude d'un paléoenvironnement à partir de coprolithes

1. INTRODUCTION	152
2. ETUDE DE COPROLITHES D'HYENE DES CAVERNES	154
2.1. EXTRACTION D'ADN A PARTIR DE COPROLITHES	154
2.1.1. ROLE DE L'EDTA.....	154
2.1.2. ROLE DU N-PTB	155
2.1.3. CONCLUSION	157
2.2. ANALYSE METAGENOMIQUE	158
2.2.1. CHOIX DES ECHANTILLONS.....	158
2.2.2. SEQUENÇAGE MASSIF DES DEUX BANQUES D'EXTRAITS DE CC8 ET CC9	159
2.2.3. RESULTATS DE L'ANALYSE METAGENOMIQUE : ARTICLE 3	161
2.2.4. RESULTATS ET DISCUSSION COMPLEMENTAIRES	199
2.3. DATATION RADIOCARBONE.....	201
2.3.1. MATERIEL ET METHODES	201
2.3.2. RESULTATS ET DISCUSSION	202
2.4. ANALYSE PALYNOLOGIQUE.....	203
3. CONCLUSION	205

PARTIE 4 : CONCLUSION GENERALE

Liste des figures

Figure 1 : Comparaison entre les crânes d'un ours des cavernes et d'un ours brun.	17
Figure 2 : Succession des différentes espèces fossiles composant la lignée des Ursidés.	20
Figure 3 : Valeurs des $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ des différents fossiles du Pléistocène en fonction de leur régime alimentaire.	27
Figure 4 : Exemples de fossiles très anciens utilisés en paléogénétique.	33
Figure 5 : Préservation de l'ADN ancien dans des tissus conservés dans le permafrost.	34
Figure 6 : Principales lésions conduisant à la coupure de la molécule d'ADN.	36
Figure 7 : Les bases azotées formant la plupart des lésions bloquantes dans l'ADN ancien.	37
Figure 8 : Différents types de liaisons moléculaires qui empêchent la progression de la Taq Polymérase.	37
Figure 9 : Les transitions de type 2 sont dues à la désamination.	39
Figure 10 : Mise en évidence de l'augmentation du nombre de substitutions de type 2 aux extrémités du brin d'ADN ancien.	39
Figure 11 : Structure d'un os long.	45
Figure 12 : Structure d'une dent.	45
Figure 13 : Coprolithes attribués à un canidé de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc.	47
Figure 14 : Temps de survie d'un ADN de taille supérieure à 100 pb, en fonction de la température.	50
Figure 15 : Organisation des gènes le long du génome mitochondrial des Mammifères.	52
Figure 16 : Séquençage métagénomique de bibliothèques d'ADN ancien, par une méthode traditionnelle.	54
Figure 17 : Principe de la méthode de séquençage à haut-débit 454.	55
Figure 18 : Représentation schématique de la méthode de séquençage à haut-débit Solexa.	56
Figure 19 : Principe du séquençage en cours de synthèse.	57
Figure 20 : Les Gorges de l'Ardèche.	64
Figure 21 : Topographie de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc.	66
Figure 22 : Emplacement des bauges, griffades et empreintes laissées par les ours des cavernes dans la Grotte Chauvet-Pont d'Arc.	74
Figure 24 : Topographie de la Grotte des Deux-Ouvertures.	77
Figure 25 : Emplacement des bauges et des polissés d'ours des cavernes dans la partie centrale de la Grotte des Deux-Ouvertures.	79
Figure 26 : Arbre phylogénétique utilisant les génomes mitochondriaux complets d'Ursidés.	107
Figure 27 : Gel d'électrophorèse montrant les fragments d'ADN amplifiés par PCR, à partir des extractions effectuées sur l'échantillon CC2, en absence ou en présence de N-PTB.	156
Figure 28 : Gels d'électrophorèse montrant les fragments d'ADN amplifiés par PCR à partir des extraits de sept coprolithes.	158
Figure 29 : Gels d'électrophorèse montrant les fragments d'ADN amplifiés par PCR à partir des extraits de trois échantillons de coprolithes.	159

Liste des tableaux

Tableau 1 : Cortège faunique du Pléistocène, de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc.	75
Tableau 2 : Listes des échantillons de la Grotte des Deux-Ouvertures analysés, en plus des cinq humérus présentés dans (Bon et al., 2011).	147
Tableau 3 : Composition des deux tampons d'extraction utilisés.	155
Tableau 4 : Datations obtenues pour deux coprolithes de la Grotte de Coumère.	202
Tableau 5 : Analyse palynologique des deux coprolithes CC8 et CC9.	204

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxy-ribo Nucléique

AMS : Accelerator Mass Spectrometer

ARN : Acide Ribo Nucléique

pb : paire de bases

BP : Before Present (avant 1950)

BSA : Bovine Serum Albumine

Caméra CCD : Camera comprenant un dispositif à transfert de charge.

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

DTT : Dithiothréitol

IRBP : InterphotoReceptor Binding Protein

ka : millier d'années

Ma : million d'années

N-PTB : *N*-Phénacylthiazolium

Numt : Nuclear-Mitochondrial Insertion

PCR : Polymerase Chain Reaction

rbcL : ribulose-bisphosphate carboxylase

TTR : Tranthyréine

Introduction générale

Les dessins et gravures des grottes ornées du Paléolithique révèlent un bestiaire insolite composé de mammouths, lions des cavernes, rhinocéros laineux, aurochs, ours des cavernes, et cerfs mégacéros (Clottes, 2001). Ces espèces, qui peuplaient autrefois l'Europe, formaient le quotidien des hommes d'alors et nourrissaient leur imaginaire. Les dessins de chevaux, mammouths, félins, bisons qui ornent les parois des grottes auraient pu représenter des figurations sexuelles symboliques (Leroi-Gourhan, 1965) ou les esprits animaux que rencontraient les chamanes de la Préhistoire (Clottes & Lewis-Williams, 1996).

L'étude de ces espèces n'a longtemps porté que sur leurs vestiges osseux et les représentations pariétales. S'ils permettent de se représenter convenablement ces animaux, ces témoins du passé ne nous donnent que des informations parcellaires sur le mode de vie, l'évolution ou l'écologie d'espèces disparues. En effet, l'art des cavernes représente des animaux, plus rarement des êtres humains, mais ne fournit aucune représentation des espèces végétales ou du milieu minéral.

Depuis le milieu des années 1980, la paléogénétique, ou étude de l'ADN ancien, permet d'avoir accès aux données génétiques contenues dans certains spécimens fossiles conservés dans des conditions particulières (Hofreiter *et al.*, 2001b; Willerslev & Cooper, 2005). Grâce aux séquences d'ADN, il est maintenant possible d'étudier la phylogénie d'espèces disparues, la raison de la disparition de certaines espèces, voire les relations entre différentes espèces et le fonctionnement des écosystèmes.

L'objectif de cette thèse est d'apporter des éléments à la caractérisation d'un paléoenvironnement, en s'attachant particulièrement à deux carnivores éteints : l'ours et l'hyène des cavernes. La première partie nous permettra d'introduire ces deux espèces en s'intéressant particulièrement aux données issues de la paléontologie ; nous appréhenderons ensuite les enjeux et les limites mais également les développements récents de la paléogénétique ; nous présenterons enfin les sites très particuliers d'où proviennent les spécimens étudiés : les grottes de Chauvet-Pont d'Arc, des Deux-Ouvertures et de Coumère. La seconde partie sera consacrée à l'ours des cavernes, dont nous avons caractérisé le génome mitochondrial complet. Deux populations provenant de cavités situées à une quinzaine de kilomètres l'une de l'autre ont été étudiées, ce qui permet d'appréhender la structure de ces

populations au niveau régional. Dans la troisième partie, nous nous intéresserons à des vestiges particuliers, les coprolithes, ou excréments fossiles, qui permettent d'étudier outre l'espèce productrice, son alimentation et d'avoir un aperçu sur son environnement.

Première partie :

*Introduction à l'étude de la faune du Pléistocène
au moyen de la Paléogénétique.*

1. LA FAUNE DU PLEISTOCENE

Durant l'Antiquité, et jusqu'à la Renaissance, les fossiles furent interprétés d'une façon qui révèle le fond culturel de l'époque. Ainsi, les crânes d'éléphants nains furent considérés comme des restes de géants ou de cyclopes (Gayraud-Valy & Thomas, 2000). Des ossements d'autres grands mammifères disparus ont également été attribués à des dragons, ou à des licornes (Kurtén, 1976). Ces fossiles ont ainsi donné corps à un imaginaire fantastique, où les dragons se font tuer par de jeunes gens plein de courage et où les licornes accompagnent les belles dames.

Il faut attendre la fin du XVII^{ème} siècle pour que les travaux d'anatomie comparée de Perrault (France), de Tyson (Angleterre) et de Campani (Italie) permettent une meilleure compréhension des éléments squelettiques fossiles. Parmi les espèces les plus étudiées, figure un ours retrouvé dans des cavernes. Des vestiges lui appartenant sont présents en abondance dans les grottes européennes, ce qui explique l'engouement des paléontologues pour cette espèce aujourd'hui disparue.

Au XVIII^{ème} siècle, les premières études comparatives des ossements d'ours des grottes avec ceux d'ours bruns, menées par des naturalistes comme Esper, Merck et Hunter, décrivent les particularités de cette espèce, nouvellement découverte, distincte de l'ours brun comme de l'ours polaire. C'est en 1794 qu'un autre naturaliste, Rosenmüller, lui donne un nom et son statut d'espèce : *Ursus spelaeus*, l'ours des cavernes.

1.1. Données paléontologiques sur l'ours des cavernes

De nombreuses cavités contiennent des ossements attribués à l'ours des cavernes. Ces vestiges sont généralement présents en très grande quantité, allant parfois jusqu'à des milliers ou dizaines de milliers d'échantillons. La masse de données accumulées permet de connaître la morphologie de l'animal dans les détails et de comprendre comment il est apparu et a évolué.

1.1.1. Caractéristiques morphologiques de l'ours des cavernes

L'ours des cavernes (*Ursus spelaeus*) est un Carnivore appartenant à la famille des Ursidés. Cette famille regroupe des espèces plantigrades ou semi-plantigrades, possédant cinq doigts aux membres antérieurs et postérieurs, tous munis de griffes non-rétractiles, et une queue rudimentaire (Argant & Crégut-Bonnoure, 1996; Quilès, 2003). Leur dentition montre une réduction, voire une disparition des prémolaires antérieures, tandis que les molaires deviennent broyeuses. Leurs canines sont puissantes, mais peu acérées.

Au sein de la famille des Ursidés, les Ursinés se caractérisent par un crâne allongé et étroit, qui ne présente qu'une seule fosse massétérique, ainsi des prémolaires antérieures réduites, et des molaires postérieures allongées. Les caractéristiques des Ursinés sont adaptées à un régime de plus en plus végétarien. Seul l'ours polaire se distingue par un régime exclusivement carnivore.

Le genre *Ursus* possède une formule dentaire du type 3/3 I, 1/1 C, 4/4 P, 2/3 M, qui tend à se transformer en 3/3 I, 1/1 C, 1/1 P, 2/3 M chez les formes les plus spécialisées comme *U. spelaeus*.

Ce dernier, l'ours des cavernes, est un ours massif, de grande, voire de très grande taille. En effet, pour un mâle moyen, la longueur comprise entre le museau et la base de la queue est de plus de 1,6 m et sa hauteur de 1,2 m au garrot. Il pouvait peser jusqu'à une tonne. Cette espèce connaît un fort dimorphisme sexuel, avec des femelles beaucoup plus petites que les mâles (Pacher & Stuart, 2009). Le squelette de ses membres est très épais. Les pattes antérieures sont plus longues et plus puissantes que les pattes postérieures, ce qui devait conduire l'arrière-train de l'animal à être nettement surbaissé par rapport au garrot. Le zeugopode (ulna/radius et tibia) est très réduit par rapport au stylopode (humérus et fémur), avec un rapport de 1/2. Les métapodes sont courts et massifs, particulièrement les métacarpiens qui sont très robustes.

Son crâne est aisément reconnaissable grâce à des bosses frontales marquées qui forment la glabella, avec un net enfoncement central (Figure 1). Quelques crânes d'ours des cavernes ne possèdent pas ce trait, mais de telles exceptions sont rares (Kurtén, 1976). Sauf dans de très rares occasions, les prémolaires antérieures aux P4 ont disparues.

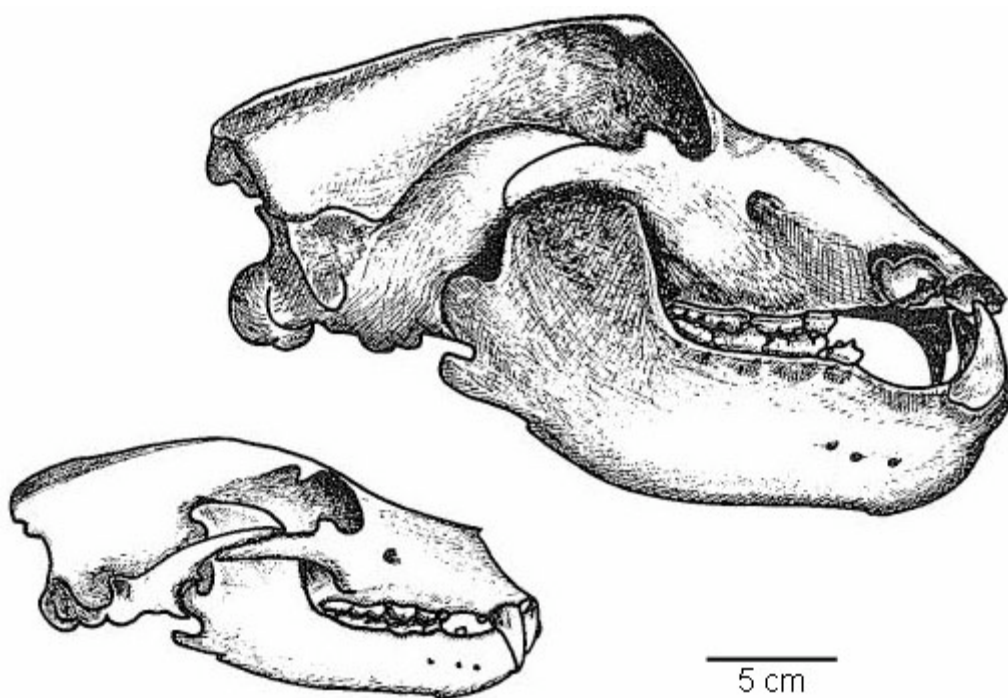


Figure 1: Comparaison entre les crânes d'un ours des cavernes (au dessus) et d'un ours brun (en dessous). D'après (Kurtén, 1976).

1.1.2. Position systématique de l'ours des cavernes

L'enregistrement fossile permet de retrouver des traces ancêtres de l'ours des cavernes. En retraçant l'évolution des Ursidés, les connaissances obtenues sur ces espèces très anciennes permettent de comprendre comment les espèces actuelles d'ours se sont individualisées et de définir leurs relations.

1.1.2.1. *Les ancêtres des ours*

Le plus ancien carnivore considéré comme un ours date du Miocène (Kurtén, 1976). Ce mammifère, appelé *Ursavus elmensis*, d'une taille à peine supérieure au loup, se distingue par ses dents qui possèdent des caractères ursins (molaires aplaties). Bien qu'on considère généralement que cette espèce est apparue il y a environ 20 millions d'années (Kurtén, 1976), un échantillon trouvé en Amérique du Nord pourrait reculer son apparition à 29 millions d'années (Qiu, 2003).

Les *Ursavi* continuent leur évolution au cours du Miocène : ils deviennent de plus en plus massifs, et leurs molaires s'élargissent. Des fossiles d'*Ursavus* sont connus dans une vingtaine de localités en Europe, principalement situées en Autriche, en Pologne et en France (Philippe & Argant, 1997; Quilès, 2003), ainsi qu'en Chine, en Turquie et en Amérique du Nord (Qiu *et al.*, 1985). Le dernier *Ursavus* connu provient d'Euboa, en Grèce, et a été trouvé dans des couches datées d'environ 9-8 millions d'années.

Il y a 12 millions d'années, vivait également une autre forme d'ours : *Protursus simpsoni*. Cet animal descend vraisemblablement d'une des formes les plus primitives d'*Ursavus* et pourrait être à l'origine de la lignée des *Ursus* (Kurtén, 1976).

1.1.2.2. Les premiers ours

Les premiers ours du genre *Ursus* apparaissent au début du Pliocène, il y a environ 5 millions d'années, avec *U. boeckhi* (Figure 2). Le premier représentant de ce genre provient des lignites de Baröth-Köpecz, en Hongrie, datées du Pliocène inférieur (Olive, 2006), mais d'autres spécimens ont également été trouvés sur le site hongrois d'Erdevidek et sur le site espagnol d'Alcoy (Montoya *et al.*, 2006). Ce petit ours présente principalement des caractères ancestraux par rapport aux Ursidés plus récents, à l'exception de la forme aplatie de sa canine semblable à celle d'*U. yinnanensis* et de l'ours actuel *U.* (ou *Melursus*) *ursinus*.

U. minimus est un ours très proche d'*U. boeckhi*, qui possède encore des traits primitifs, si bien que certains considèrent que les deux taxons forment deux sous-espèces (*U. minimus minimus* et *U. minimus boeckhi*) d'une même espèce (Morlo & Kunderlik, 2001). Cependant, cette opinion reste minoritaire (Wagner, 2010).

D'autre part, certaines de ses caractéristiques ont conduit Mazza et Rustoni (Mazza & Rustoni, 1994) à considérer *U. minimus* comme une forme primitive de l'ours actuel *U. thibetanus*.

U. minimus était un petit ours, environ de la taille d'un ours malais actuel. Ses dents montrent qu'il était encore carnivore : ses canines sont fines et graciles, et ses molaires gardent leur caractère aiguisé (Kurtén, 1976). Des vestiges de cet ours ont été retrouvés dans un grand nombre de formations en Europe.

U. thibetanus est décrit dans des formations du Pléistocène moyen en Europe (Mazza & Rustoni, 1994; Crégut-Bonnure, 1996).

1.1.2.3. *U. etruscus*, l'ours villafranchien

A partir du Pléistocène supérieur, les ours dits 'noirs' (*U. minimus*, *U. thibetanus*) disparaissent d'Europe et sont remplacés par *U. etruscus*, qui proviendrait d'Asie (Mazza & Rustioni, 1994). Des restes de cet ours ont ainsi été retrouvés à Saint-Vallier, en France (Argant, 2004), dans un site datant de 2 millions d'années, et à la Puebla de Valverde (Kurtén & Crusafont Pairó, 1977). Des restes d'ours datant de la même époque et très proches morphologiquement ont également été retrouvés en Asie et en Afrique (Wagner, 2010).

Cet ours, typique de l'époque villafranchienne, se caractérise par une taille plus importante, qu'*U. minimus*. La taille de cet ours va en s'accroissant tout au long du Villafranchien (entre 5,2 et 0,9 millions d'années) comme le montre le fait que les spécimens du Villafranchien tardif sont plus grands que ceux du Villafranchien moyen (Kurtén, 1976). Son museau est assez long, ses prémolaires très réduites, et ses molaires montrent une compression latérale marquée (Olive, 2006). Le paléoenvironnement qui lui est associé à Saint-Vallier permet de préciser le milieu dans lequel il vivait : il devait apprécier un climat tempéré, avec un milieu ouvert, mais à proximité de zones boisées et de cours d'eau (Argant, 2004).

Malheureusement, seul un petit nombre de restes est connu, peut-être parce que cet ours n'hibernait pas dans des grottes. Les relations évolutives entre cette espèce et celles qui lui ont succédé, les premiers *U. arctos* et *U. deningeri* (Argant, 2001) sont donc pour l'instant mal connues.

1.1.2.4. *De U. etruscus aux ours de la fin du Pléistocène*

Cette pénurie d'information a conduit à considérer deux scénarii alternatifs pour la divergence des lignées conduisant à l'ours brun et à l'ours des cavernes.

Le premier considère que les deux lignées arctoïde (*U. arctos*) et spéléoïde (*U. deningeri-spelaeus*) dérivent d'*U. etruscus* (Kurtén, 1976; Argant, 2009). Le second envisage qu'*U. etruscus* s'est éteint sans descendance, tandis que la lignée spéléenne apparaissait au sein de la grande diversité qui caractérise aujourd'hui encore les ours bruns *U. arctos* (Mazza & Rustioni, 1994; Wagner, 2010).

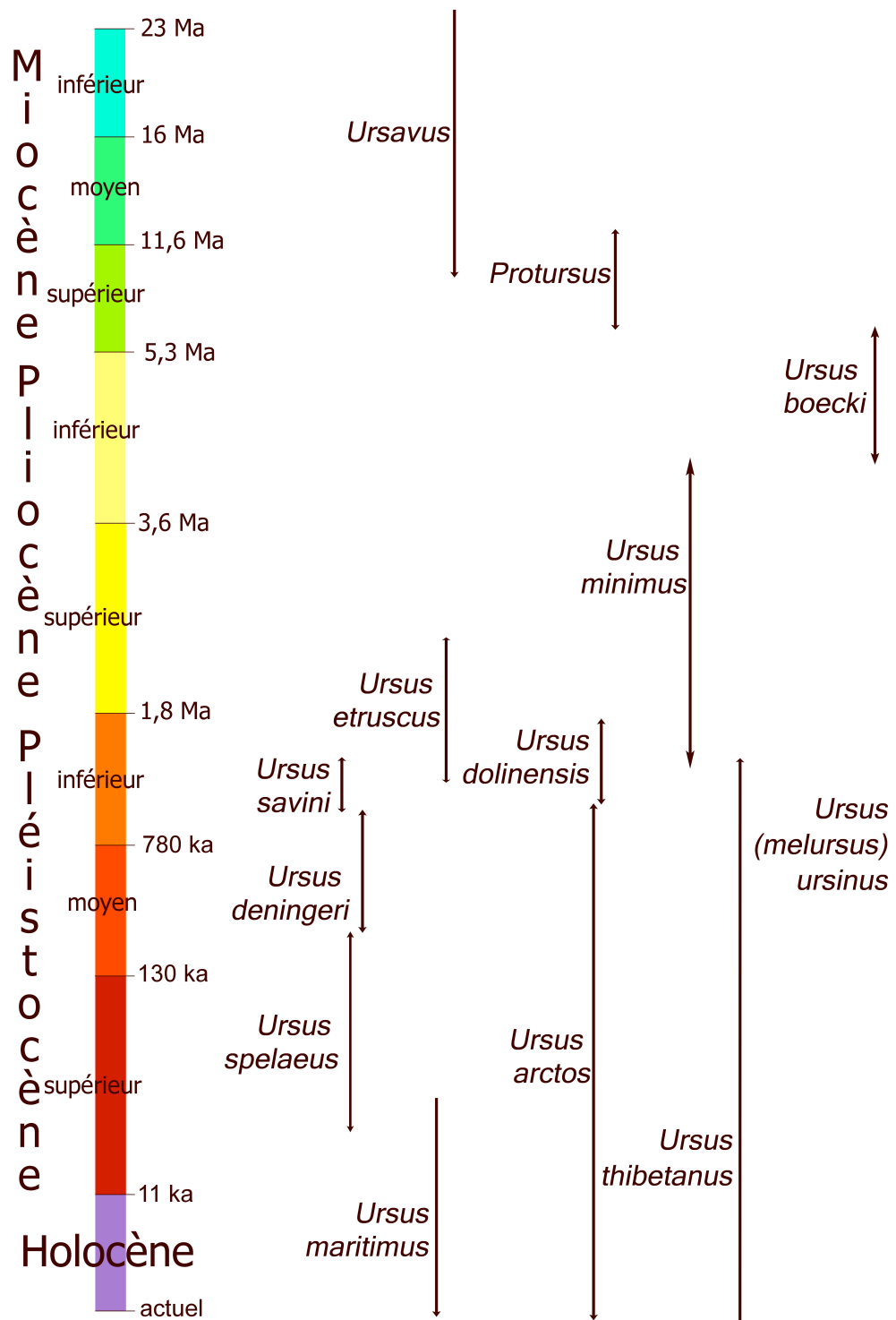


Figure 2 : Succession des différentes espèces fossiles composant la lignée des Ursidés.

Les données permettant de retracer l'histoire de la lignée arctoïde montrent une première occurrence de spécimens de cette lignée à Atapuerca (Espagne), dans un gisement de la fin du Pléistocène supérieur, où *U. dolinensis* est représenté. Bien que les inventeurs suggèrent que cette espèce appartient à la lignée speléoïde (Garcia & Arsuaga, 2001b), la plupart des auteurs considère qu'il s'agit d'une forme arctoïde (Olive, 2006; Argant, 2009; Wagner, 2010).

Des formes anciennes d'*U. arctos* sont décrites en Chine dès le Pléistocène inférieur (Quilès, 2003), mais son arrivée en Europe est plus tardive, vers le Pléistocène moyen. Peu de fossiles d'ours bruns existent car cet animal n'hivernait pas systématiquement dans des grottes (Argant, 2009). Extrêmement polymorphe, *U. arctos* a donné naissance à un grand nombre de sous-espèces, dont l'une en particulier s'est morphologiquement individualisée : *U. maritimus*, l'ours blanc.

La lignée speléoïde apparaît il y a environ un million d'années, avec *U. savini*. Cette espèce, qui est considérée par de nombreux auteurs comme une sous-espèce primitive d'*U. deningeri* (Argant, 2009), se caractérise par une absence complète de prémolaires (Kurtén, 1976). *U. savini* possède, malgré sa position chronologique, des caractères qui rappellent les stades terminaux d'*U. spelaeus*, ce qui tend à souligner l'évolution des caractères 'en mosaïque' au sein de la lignée speléenne (Olive, 2006).

U. deningeri est connu dès le Pléistocène inférieur dans le site du Vallonnet : il est reconnaissable par ses prémolaires antérieures très réduites, le développement de cuspides accessoires sur les incisives supérieures, une molaire M1 subdivisée, ainsi que l'ébauche de subdivision des cuspides des prémolaires P4 (Olive, 2006). Cette espèce pouvait occuper un grand nombre de niches écologiques, à l'exception de la haute montagne et avait donc une répartition largement ubiquiste, d'un milieu forestier à un milieu steppique (Quilès, 2003). Comme pour *U. spelaeus*, la plupart de ses restes a été retrouvée en grotte, ce qui tend à démontrer que cet ours recherchait des cavités pour hiberner. Sa dentition suggère une alimentation omnivore, à forte tendance végétarienne.

A partir du Pléistocène moyen, *U. deningeri* acquiert des formes de plus en plus speléoïdes dans certains sites, comme celui d'Azé I, qui peuvent conduire à la définition d'une sous-espèce de transition entre *U. deningeri* et *U. spelaeus* : *U. spelaeus deningeroides* (Argant, 2009). Les formes typiques d'ours des cavernes apparaissent à la fin du Pléistocène moyen et surtout au Pléistocène supérieur où certains individus atteignent des tailles caractéristiques.

L'ours des cavernes s'éteint à la fin du Pléistocène. Même si la date exacte de son extinction est encore débattue, on observe que la très grande majorité des échantillons date d'avant 24 000 ans BP (Pacher & Stuart, 2009). Un programme de datation des Ursidés du Massif de la Chartreuse a mis en évidence un échantillon plus jeune, daté de 14 000 ans BP (Philippe *et al.*, 2010).

1.1.2.5. Une ou plusieurs espèces d'ours des cavernes ?

L'ours des cavernes est une espèce très variable, ce qui a conduit à la définition de nombreuses sous-espèces locales (Grandal-d'Anglade & Vidal Romani, 1997), dont une grande partie n'est pas considérée comme valide (Pacher & Stuart, 2009). En 1998, l'étude de la morphologie dentaire d'échantillons trouvés dans le site de Kudaro-3 a conduit G. Baryshnikov à attribuer ces échantillons à une nouvelle espèce spéléenne, distincte d'*U. spelaeus*, appelée *U. deningeri kudarensis* (Baryshnikov, 1998). Par ailleurs, il a été également proposé que les ours des cavernes européens soient divisés en deux espèces : *U. spelaeus sensu stricto* et *U. ingressus*.

La spécificité de ces lignées est également documentée par des analyses génétiques portant sur la région hypervariable du génome mitochondrial : les lignées *U. deningeri kudarensis*, *U. spelaeus sensu stricto* et *U. ingressus* sont clairement individualisées sur un arbre phylogénétique (Knapp *et al.*, 2009). Cependant la définition d'une espèce sur des critères uniquement morphologiques ou génétiques est sujette à controverse. En effet, l'espèce est définie par des critères d'interfécondité et des descendants fertiles : ni la morphologie dentaire, ni les lignées maternelles auxquelles appartiennent les spécimens ne peuvent permettre de définir avec certitude des espèces.

1.1.3. Paléo-éthologie de l'ours des cavernes

En plus d'éclaircir son évolution, les données sur l'ours des cavernes permettent de définir son mode de vie, ainsi que son éthologie.

Les vestiges d'ours des cavernes sont retrouvés de manière abondante : 792 sites en Europe fournissent des restes d'ours des cavernes (Argant & Crégut-Bonnoure, 1996). Cependant, ce n'est pas dans l'effectif des populations qu'il faut rechercher la cause de cette abondance, mais dans son éthologie. En effet, afin de se préserver des froids hivernaux, il hibernait dans

des grottes dont la température (autour d'une dizaine de degrés) est quasiment constante tout au long de l'année.

D'après des données éthologiques obtenues sur les ours actuels, l'hibernation des ours n'est pas une hibernation au sens propre du terme, mais correspond plutôt à une somnolence hivernale que l'ours stoppe parfois par de brefs réveils ; de plus, il n'est qu'en hypothermie modérée. Cependant, son métabolisme est altéré : il ne mange, ne boit, n'urine, ni ne défèque durant son hibernation. Il peut perdre de 15 à 25% de sa masse corporelle, perte correspondant à la fonte graisseuse.

Une partie des individus mouraient durant cette période difficile. Leurs restes étaient ensuite éparpillés dans les grottes par les générations suivantes, ce qui explique l'abondance des restes retrouvés.

Chez les ours bruns actuels, la mise-bas a lieu durant l'hibernation. Or, dans la plupart des sites, les restes d'ours correspondents à des nouveaux-nés, ou à des ours d'un, deux ou trois ans, mais rarement à des jeunes ours d'âge intermédiaire (Kurtén, 1976). Cette observation renforce l'idée que ces ours des cavernes sont morts durant l'hiver. L'accumulation insuffisante de réserves les affaiblissait et conduisait à leur mort au cours de l'hiver ; ensuite, les petits dont les mères étaient mortes succombaient à leur tour (Grandal-d'Anglade & Vidal-Romani, 1997).

Le rapport entre le nombre de mâles et de femelles varie selon les grottes. Certaines contiennent majoritairement des femelles et de jeunes oursons (Geissbachhöhle, Suisse), tandis que d'autres (Fate, Italie) sont majoritairement peuplées de mâles (Quilès & Monchot, 2004). Les facteurs proposés pour justifier cette répartition sont :

- la taille de la grotte, car les femelles utiliseraient des grottes de taille plus restreinte que les mâles (Kurtén, 1976)
- la disponibilité d'eau, nécessaire aux femelles allaitantes
- l'altitude de la grotte, car les femelles préféreraient les altitudes plus élevées.

Cependant, ces hypothèses sont contestées par certains auteurs qui considèrent que des facteurs de régulations sociales, accessibles uniquement grâce à une étude à grande échelle des populations d'ours, sont plus susceptibles d'expliquer le sex-ratio (Quilès & Monchot, 2004).

Les ours n'ont pas laissé que des ossements dans des grottes, mais également d'autres traces de leur séjour. Les sols des grottes habitées par l'ours des cavernes sont creusés de larges bauges où les animaux se couchent, d'une taille allant de quelques dizaines de centimètres à

plusieurs mètres de diamètre. À proximité, se trouvent souvent de longues griffades striant les parois de la grotte.

Les parois des grottes portent d'autres traces du passage des ours. En effet, en les longeant, ils ont poli la roche et parfois effacé les dessins qui pouvaient y figurer. Dans les sols argileux, ils peuvent également laisser des empreintes de pattes.

1.1.4. Données isotopiques définissant le régime alimentaire de l'ours des cavernes

La dentition de l'ours des cavernes est nettement adaptée à une alimentation de type herbivore, ce qui est également démontré par la puissante musculature dont témoigne encore la forme de son crâne (Kurtén, 1976).

Cette préférence alimentaire a également été montrée grâce à des données isotopiques. En effet, l'étude des isotopes stables du carbone (^{13}C) et de l'azote (^{15}N) permet de préciser l'alimentation d'un animal. La quantité relative de chacun des isotopes est donnée par la valeur du $\delta^{13}\text{C}$ et du $\delta^{15}\text{N}$, qui permet de comparer les proportions entre l'isotope majoritaire (respectivement le ^{12}C et le ^{14}N) et l'isotope minoritaire. Cette valeur est calculée grâce aux formules :

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{échantillon}}}{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{standard}}} - 1 \right) * 1000$$

et

$$\delta^{15}\text{N} = \left(\frac{\left(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \right)_{\text{échantillon}}}{\left(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \right)_{\text{standard}}} - 1 \right) * 1000$$

et est donnée en pour-mille.

Le carbone est présent dans le collagène et l'hydroxyapatite des os et des dents, et sa composition isotopique ($\delta^{13}\text{C}$) chez un animal dépend de la composition isotopique de son alimentation.

En fonction du type de photosynthèse qu'utilisent les plantes à la base de la chaîne alimentaire (plantes en C_3 , arbres et plantes herbacées de milieu tempéré ; ou C_4 , plantes herbacées de milieu tropical), le $\delta^{13}\text{C}$ de leur matière organique est différent (respectivement - 26 ‰ et -13 ‰).

L'analyse du carbone issu du collagène renseigne uniquement sur la composition isotopique des protéines consommées tandis que celle de l'hydroxyapatite donne une indication sur celle de tous les nutriments (protéines, lipides et glucides). Ainsi, la différence de composition isotopique entre le collagène et l'hydroxyapatite est corrélée au régime alimentaire. Chez les carnivores, dont l'apport en nutriment est riche en protéines, ces deux valeurs sont presque identiques. En revanche, les herbivores, consommant majoritairement des glucides, ont des compositions isotopiques très différentes. Les valeurs sont intermédiaires chez les omnivores.

La composition isotopique de l'azote du collagène des os et dents est généralement choisie pour étudier le niveau trophique, car le $\delta^{15}\text{N}$ augmente de 2-5‰ à chaque acteur de la chaîne alimentaire.

La lactation, qui conduit à réutiliser les protéines maternelles, est également sensible à cet effet et induit une augmentation du $\delta^{15}\text{N}$ chez le nouveau-né. Après le sevrage, le ratio diminue. Ce changement de diète conduit à des différences parfois drastiques entre la composition des os (renouvelés en permanence) et des dents chez les espèces où elles cessent de pousser à un stade précoce (Bocherens *et al.*, 1994b).

Les abondances isotopiques sont conservées lors de la fossilisation si la composition en acides aminés extraits est similaire à celle du collagène. Pour vérifier cette condition, il faut mesurer le ratio C/N, qui est de 3 pour le collagène.

Depuis le début des années 90, la composition isotopique est utilisée pour déterminer la paléo-diète d'espèces disparues. Dès 1994, des échantillons d'ours de grottes françaises ont été comparés par H. Bocherens et ses collègues (Bocherens *et al.*, 1994b) à d'autres espèces de carnivores et d'herbivores, ainsi qu'à des ours actuels. Il en ressort que les ours des cavernes ont un régime encore plus herbivore que les ours actuels qui sont déjà majoritairement herbivores. Les basses valeurs du $\delta^{15}\text{N}$ mesuré chez des ours des cavernes et de Deninger indiqueraient la réutilisation de lipides durant l'hibernation.

Des analyses isotopiques ont également été effectuées lors d'autres études (Bocherens *et al.*, 1997; Fernandez-Mosquera, 1998; Nelson *et al.*, 1998; Liden & Angerbjorn, 1999; Vila-Taboada *et al.*, 1999; Fernandez-Mosquera *et al.*, 2001; Bocherens *et al.*, 2006) et permettent d'établir que :

- l'ours des cavernes avait un régime herbivore, principalement composé de plantes en C₃, plantes de milieu tempéré ou froid ;
- la lactation a un effet important sur la valeur du $\delta^{15}\text{N}$ des os des jeunes oursons et de la dentine des jeunes et des adultes (dû à l'absence de renouvellement de cette substance après le sevrage) ;
- les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$, parfois très élevées, sont interprétées comme un effet de l'hibernation (recyclage de l'urée) ou d'un climat rigoureux qui, en allongeant l'hibernation, peut augmenter la valeur du $\delta^{15}\text{N}$. De plus, de telles conditions climatiques peuvent diminuer le $\delta^{15}\text{N}$ des végétaux et favoriser une préférence alimentaire pour les végétaux avec de faibles valeurs de $\delta^{15}\text{N}$.

Cependant, deux études récentes remettent en cause le caractère herbivore strict du régime de l'ours des cavernes. L'analyse isotopique d'échantillons d'ours des cavernes de la grotte de Pestera cu Oase (Richards *et al.*, 2008) montre des valeurs du $\delta^{15}\text{N}$ élevées qui correspondraient à une alimentation mixte, composée de végétaux et de protéines animales (Figure 3). Les choix alimentaires des ours des cavernes pourraient ainsi avoir présenté la même flexibilité que ceux des ours bruns actuels.

Les observations de Richard et de ses collègues sont renforcées par une étude morphologique des dents d'ours des cavernes de la grotte de Goyet, en Belgique (Peigné *et al.*, 2009). Les derniers repas effectués par l'animal laissent sur les dents des micro-traces qui peuvent être observées lors d'une analyse spécifique ; la plupart des dents d'ours retrouvées proviennent d'animaux morts durant l'hibernation et permettent donc d'avoir un aperçu sur la diète des ours juste avant qu'ils entrent en hibernation. La comparaison avec les micro-traces portées par les dents d'animaux ayant des régimes alimentaires de différents types permet de montrer que l'ours des cavernes avait un régime mixte, à base de viande, de végétaux, d'insectes et d'éléments durs qui pourraient être des os.

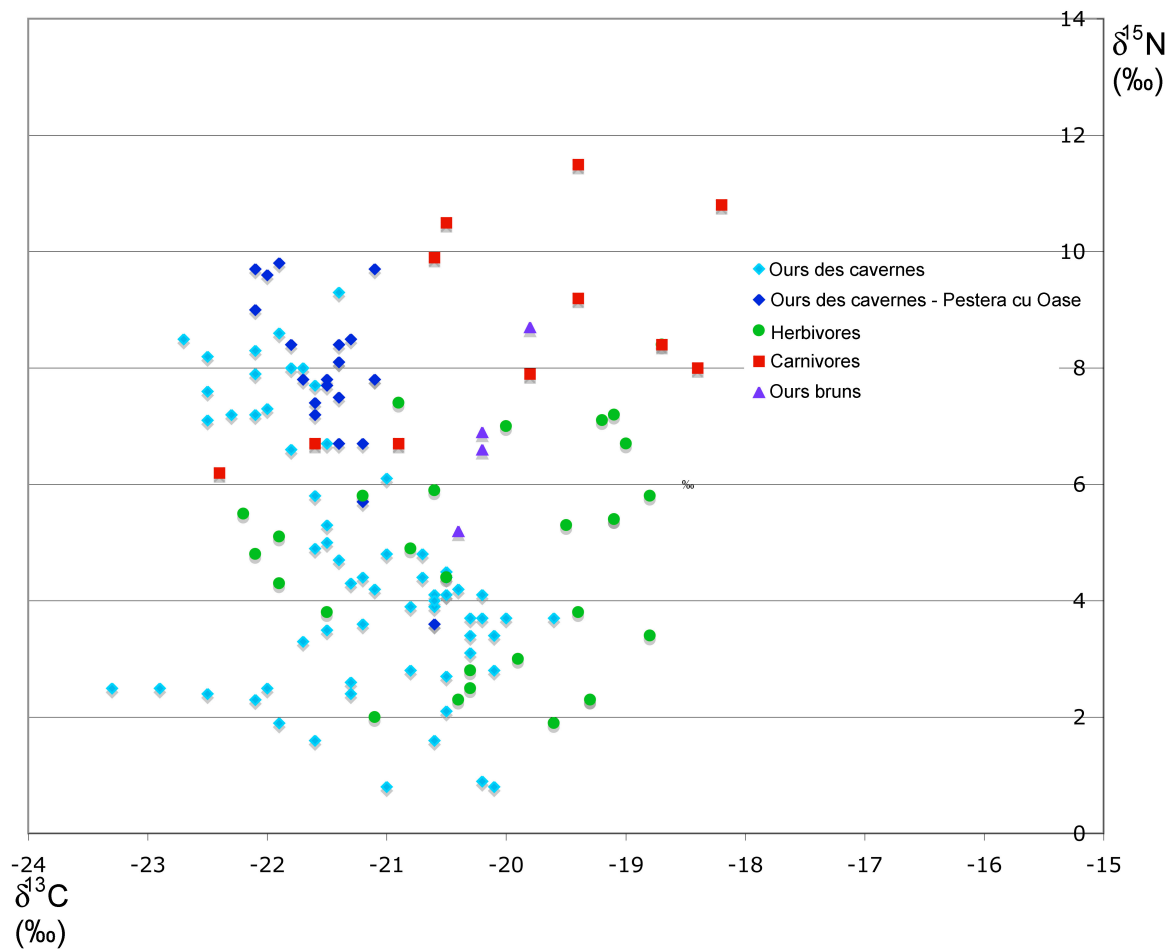


Figure 3 : Valeurs des $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ des différents fossiles du Pléistocène en fonction de leur régime alimentaire (Bocherens *et al.*, 1994a; Fernandez-Mosquera *et al.*, 2001; Bocherens *et al.*, 2005; Richards *et al.*, 2008).

Il est donc probable que les ours des cavernes, afin d'accumuler suffisamment de graisses pour passer l'hiver, passaient d'un régime herbivore à un régime plus carnivore durant l'automne. Par ailleurs, de nombreux ossements d'ours des cavernes portent des traces de dents, qui sont interprétés comme un indice de rongement par d'autres ours des cavernes, sans doute à la sortie de l'hibernation.

1.2. Données paléontologiques sur l'hyène des cavernes

Les analyses effectuées lors de cette thèse ont également porté sur un autre animal, appartenant à la famille des Carnivores, qui était un hôte régulier des cavités : l'hyène des cavernes.

Presque toutes les espèces d'hyènes actuelles ont été présentes en Europe au Pléistocène : l'hyène brune, l'hyène rayée et l'hyène tachetée (Kurtén, 1968). Seul le protèle (*Proteles cristatus*), une hyène insectivore, est resté spécifique de l'Afrique. Les restes d'hyène tachetée sont abondants dans les sites paléontologiques et sont présents dans la plupart des assemblages osseux provenant de grottes, ce qui a conduit à la définition d'une espèce (ou sous-espèce) particulière : l'hyène des cavernes, *Crocota (crocota) spelaea*.

1.2.1. Caractéristiques morphologiques de l'hyène des cavernes

Les hyènes se distinguent par leur alimentation : elles ont développé des molaires et prémolaires épaisses, de structure conique qui leur permettent de broyer les os pour en extraire la moelle et les tissus spongieux. Les hyènes appartenant au genre *Crocota* montrent des prémolaires encore plus puissantes. Leurs dents carnassières sont allongées et forment des lames aiguisées. Leurs canines en revanche sont peu imposantes (Kurtén, 1968).

La ressemblance entre l'hyène des cavernes et l'hyène tachetée est telle que le statut d'espèce à part entière de l'hyène des cavernes fait débat, certains la considérant comme une sous-espèce de l'hyène tachetée (Kurtén, 1968; Turner, 1984; Werdelin & Solounias, 1991), tandis que d'autres lui donnent le statut d'espèce à part entière (Markova *et al.*, 1995; Baryshnikov, 1999). Elle se distingue de l'hyène tachetée africaine actuelle par sa taille élevée et, dans les stades tardifs, par l'allongement de son humérus et de son fémur, doublé de l'épaississement des os de ses pattes, antérieures comme postérieures (Kurtén, 1968).

Le dimorphisme sexuel est peu marqué (Fosse, 1997), et les femelles d'hyène tachetée peuvent développer des pseudo-pénis par allongement de leur clitoris.

1.2.2. Origine évolutive de l'hyène des cavernes

Bien qu'il ne reste actuellement que quatre espèces de Hyénidés, représentant quatre genres différents, cette famille a été autrefois très diversifiée, près de 70 espèces fossiles ayant été décrites (Werdelin & Solounias, 1991). Les données paléontologiques suggèrent que cette famille est apparue il y a environ 25 Ma, à la fin de l'Oligocène. C'est à la fin du Miocène que la diversité spécifique est la plus importante, avec plus d'une vingtaine d'espèces coexistant à cette époque.

Les quatre espèces survivantes peuvent donc être considérées comme des reliquats d'un groupe autrefois très divers. Alors que le protèle est très différent, à la fois morphologiquement et sur le plan de sa diète, les trois autres espèces, l'hyène tachetée, l'hyène rayée et l'hyène brune se ressemblent, ce qui suggère que les lignées auxquelles elles appartiennent se sont séparées relativement récemment.

L'hyène des cavernes descend d'une hyène plus ancienne, *C. sivalensis*, qui vivait en Inde au Villafranchien. Elle se caractérise par une dentition plus primitive, et en particulier par la présence de molaires supérieures qui deviennent vestigiales ou disparaissent chez les espèces modernes (Kurtén, 1968). Durant le Pléistocène moyen, cette population se répand hors de son aire d'origine en direction de l'Europe, de l'Afrique et de la Chine.

Les premières hyènes appartenant au genre *Crocota* apparaissent en Europe durant la glaciation de Günz. La première occurrence de cette espèce est observée à la Sierra d'Atapuerca et est datée de 0.78 Ma (Garcia & Arsuaga, 2001a). Des restes d'animaux de même taille que les hyènes tachetées africaines actuelles sont présents sur les sites de Süssenborn et Gombasek.

L'hyène aurait pu suivre deux voies pour arriver en Europe. A partir de la Péninsule arabique, où elle est présente il y a 1,5 Ma, elle aurait pu traverser le Bosphore aux périodes où il était accessible, ou contourner la Mer Noire par le Caucase, où des restes de *C. sinensis* sont enregistrés au Pléistocène inférieur (Garcia & Arsuaga, 2001a).

C'est durant le Cromérien, quelques centaines de milliers d'années plus tard, que l'hyène des cavernes atteint sa taille distinctive. Les hyènes des cavernes européennes sont plus grandes que les hyènes tachetées africaines, mais on observe une gradation de taille continue entre les spécimens européens, du sud de la Russie, du Proche Orient et les spécimens africains.

1.2.3. Alimentation

Les hyènes du genre *Crocuta* se nourrissent principalement de proies de grande taille et de taille moyenne. Contrairement aux autres hyènes qui mangent surtout des charognes et chassent peu (5,8%), les hyènes tachetées tuent elles-mêmes 72,6 % des animaux qu'elles consomment, et jusqu'à 90,6% dans certaines régions (Bourdillat, 2008). Elles chassent généralement en groupe, ce qui permet d'attaquer de plus grosses proies, d'augmenter les taux de réussite et de mieux défendre leurs proies contre les charognards et les autres prédateurs. La taille du groupe dépend du nombre de proies susceptibles d'être chassées et de la présence de concurrents.

Durant les périodes interglaciaires, les milieux boisés rendent la chasse difficile et engendrent un fort taux de charognage des carcasses, ainsi qu'une importante mortalité des jeunes. Durant les périodes glaciaires, les paysages ouverts favorisent la chasse (Fosse, 1997).

Les assemblages osseux retrouvés dans les tanières d'hyènes se regroupent selon deux types : (i) les assemblages où prédominent les artiodactyles (cerf élaphe, renne) et les grands bovidés (auroch et bison), et (ii) les assemblages où sont représentés les périssodactyles (Equidés et Rhinocerotidés), accompagnés des proboscidiens (mammouth). Cette répartition pourrait être due à des facteurs environnementaux, éthologiques et taphonomiques (Fosse, 1997).

Les repaires contiennent également des coprolithes, qui sont des excréments fossiles, attribués à l'hyène des cavernes. Ces coprolithes concentrent les pollens, issus de l'eau de boisson ou de l'ingestion des restes végétaux contenus dans le tube digestif des proies (Leroi-Gourhan, 1966). Leur analyse palynologique permet de reconstituer ponctuellement l'environnement végétal des hyènes (Carrión *et al.*, 2001; Yll *et al.*, 2006; Carrión *et al.*, 2007).

1.2.4. Paléo-éthologie de l'hyène des cavernes

Deux types de repaires ont pu être utilisés par l'hyène des cavernes. Les premiers sont de petite taille et contiennent une grande quantité d'ossements, ainsi que de coprolithes. Ils auraient, pour la plupart, été utilisés durant les périodes interglaciaires (Sutcliffe, 1969). Les seconds sont plus grands et contiennent moins d'ossements et de coprolithes. Ils auraient majoritairement été utilisés durant les périodes froides. Dans ces derniers, les vestiges osseux

sont généralement concentrés dans les diverticules étroits, avec principalement des ossements appartenant à des sujets nouveaux-nés, jeunes et juvéniles (Fosse, 1997).

La comparaison des différents repaires d'hyène des cavernes permet de relever leurs traits caractéristiques. Les hyènes affichent une préférence pour les repaires contenant un nombre élevé d'entrées, avec une salle relativement vaste mais de faible hauteur (moins d'un mètre). C'est là que sont généralement retrouvés les restes de proies. Des tunnels étroits partent de cette salle et conduisent à des petites chambres où sont effectuées les mises-bas. Des petites galeries, creusées par les hyénons, leur permettent de se mettre à l'abri des mâles adultes. Les vestiges osseux sont abondants dans les zones proches de l'entrée, ainsi qu'aux abords du repaire, tandis que les zones de défécation sont généralement situées à l'extérieur (Fosse 1997).

Chez l'hyène tachetée actuelle, les repaires de petite taille sont fréquentés durant des périodes courtes, de quelques semaines à quelques mois (Kruuk, 1972; Mills, 1994), tandis que les repaires plus grands peuvent être occupés durant plusieurs années. Les femelles ont un à deux hyénons par portée qu'elles élèvent dans des repaires de petite taille, fréquentés uniquement par la cellule familiale (Mills, 1985). C'est à partir de la cinquième année que les jeunes sont réunis et élevés en commun (Kruuk, 1972).

2. LA PALEOGENETIQUE

Si l'analyse morphologique des vestiges animaux du Pléistocène permet de connaître l'apparence et la manière dont ont évolué certaines espèces aujourd'hui éteintes, l'étude de l'ADN ancien, ou paléogénétique, a ouvert un champ nouveau en paléontologie en donnant accès au matériel génétique qui subsiste dans les fossiles.

2.1. La naissance tumultueuse d'une discipline

La paléogénétique naît en 1984, quand l'équipe d'Alan Wilson réussit à analyser l'ADN d'une espèce aujourd'hui disparue, le couagga. À partir du muscle d'un individu naturalisé au XIX^{ème} siècle, ils parviennent à analyser une séquence de 112 pb, en la clonant dans un bactériophage (Higuchi *et al.*, 1984).

Cette première découverte ouvre la voie et quelques mois plus tard, Svante Pääbo publie une séquence attribuée à une momie d'enfant égyptien datant de 2400 avant J-C (Pääbo, 1985). Le fragment, long de 3 400 pb, contient des répétitions Alu et fait partie du système HLA. La séquence obtenue a été rapidement contestée et est maintenant considérée comme la conséquence d'une contamination par de l'ADN humain moderne (Delpozzo & Guardiola, 1989).

La découverte de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en 1986 (Mullis *et al.*, 1986) facilite l'étude de l'ADN ancien. En effet, les molécules d'ADN ancien, présentes en petite quantité, peuvent alors être amplifiées avant d'être analysées. De plus, cette méthode permet de sélectionner des régions d'intérêt qui sont étudiées.

Le groupe d'Alan Wilson est le premier à s'emparer de cette technique pour répondre à des problématiques archéologiques, en analysant par PCR des fragments d'ADN mitochondrial issus du cerveau d'un amérindien vieux de 7 000 ans, retrouvé dans la tourbière de Little Salt Spring en Floride (Pääbo *et al.*, 1988). La séquence obtenue se rattache à un haplotype alors inconnu mais qui, depuis, a été couramment retrouvé chez les amérindiens.

Dans la continuité de l'étude du couagga qui fonde cette discipline, la paléogénétique s'intéresse à des espèces disparues lors d'époques historiques et disponibles grâce à des

échantillons de musées. De cette façon, la paléogénétique complète les connaissances issues de la paléontologie. Ainsi, l'étude de l'ADN d'un loup de Tasmanie, *Thylacinus cynocephalus*, rapproche cette espèce des marsupiaux carnivores australiens, plutôt que des espèces d'Amérique latine auxquelles on pouvait la croire apparentée (Thomas *et al.*, 1989).

En 1990, la première étude sur des échantillons de végétaux anciens est publiée : il s'agit d'une analyse portant sur des feuilles de magnolia, provenant de dépôts d'argile du Miocène (17-20 Ma). Elle montre que les séquences retrouvées dans cet échantillon, dont l'apparence est très bien conservée, sont proches phylogénétiquement des magnolias actuels (Golenberg *et al.*, 1990; Golenberg, 1991). Cependant, l'absence de témoins négatifs de PCR pour cette expérience ainsi que les échecs subis par les autres équipes ayant essayé de reproduire ce résultat ont jeté un doute sur cette étude (Wayne *et al.*, 1999).

En laissant croire que l'ADN ancien de plus d'un million d'années pouvait subsister, cette étude a ouvert la porte à l'analyse d'ADN très ancien (Figure 4). Des séquences d'ADN d'insectes (DeSalle *et al.*, 1992; Cano *et al.*, 1993) et de plantes fossilisées dans l'ambre (Poinar *et al.*, 1993), de bactéries contenues dans le tube digestif de ces insectes (Cano *et al.*, 1994), et de l'ADN de dinosaure (Woodward *et al.*, 1994) sont publiées.

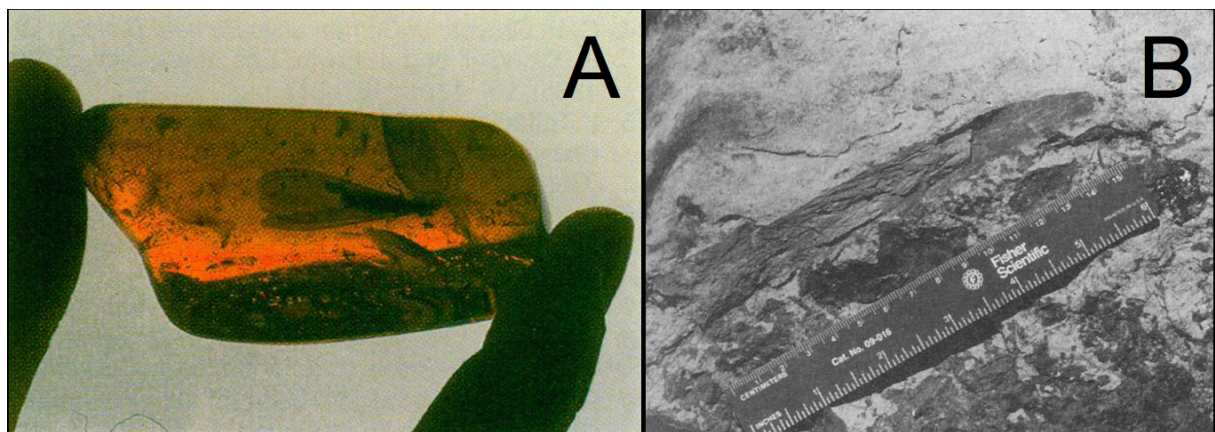


Figure 4 : Exemples de fossiles très anciens utilisés en paléogénétique **A :** Pièce d'ambre du Miocène contenant l'insecte qui a fait l'objet d'une analyse paléogénétique (DeSalle *et al.*, 1992) ; **B :** fragment d'un des os de dinosaure étudiés par Woodward *et al.*, (1994)

Cependant, plusieurs indices ont permis de montrer que ces études ne sont pas robustes et présentent vraisemblablement des contaminations. Premièrement, les autres molécules organiques, comme la chitine de l'exosquelette des insectes, et la lignine des plantes (Logan

et al., 1995; Stankiewicz *et al.*, 1998) ne sont pas conservées. Deuxièmement, les résultats ne sont pas reproductibles (Austin *et al.*, 1997). Enfin, l'ADN attribué à un dinosaure n'était en fait qu'un fragment d'ADN humain (Zischler *et al.*, 1995). A la suite des doutes soulevés sur les résultats de ces premières études (Wayne *et al.*, 1999), c'est l'ensemble de la discipline qui a été discréditée. Il a fallu la mise en place de critères rigoureux d'authentification pour redonner foi à ses résultats.

2.2. Les limites de la paléogénétique

La première étape consiste à mettre en évidence les limites intrinsèques de l'étude de l'ADN ancien, en analysant les causes de son altération et les limites de sa conservation. A partir de ce constat, des normes peuvent être définies pour permettre une meilleure récupération de l'ADN ancien et pour éviter les contaminations.

2.2.1. La dégradation de l'ADN

L'ADN ne subsiste que sous forme de fragments courts, de quelques centaines de nucléotides (Higuchi *et al.*, 1984). Même les échantillons les mieux préservés ne dérogent pas à cette règle. Dans un échantillon de muscle de mammouth, conservé dans des conditions telles que les noyaux des cellules étaient encore visibles (Figure 5), la taille maximale des séquences d'ADN amplifiées est de 1 613 nucléotides (Rogaev *et al.*, 2006).

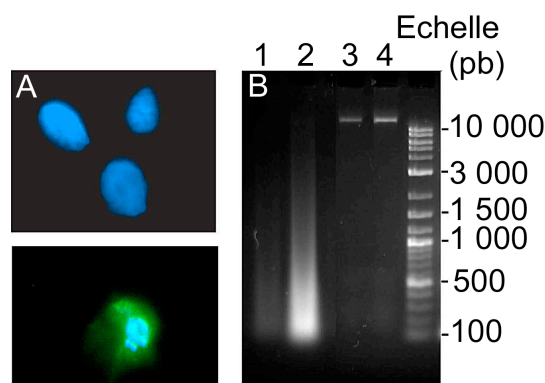


Figure 5 : Préservation de l'ADN ancien dans des tissus conservés dans le permafrost. **A** : La coloration de l'ADN des cellules au DAPI, en bleu, montre que ces tissus provenant d'un mammouth âgé d'environ 32 000 ans, conservent encore les structures cellulaires, comme le noyau. **B** : Gel d'acrylamide montrant la taille des molécules d'ADN dans un extrait de mammouth (1 et 2) et dans un extrait de sang d'homme actuel (3 et 4). Les pistes 1 et 3 correspondent respectivement à une dilution au dixième de l'extrait déposé dans les pistes 2 et 4.

L'ADN, quand il est présent dans les extraits archéologiques, l'est en très petite quantité. L'utilisation de la PCR quantitative a pu montrer que la plupart des amplifications ne commencent qu'avec quelques centaines, voire quelques milliers de molécules (Krings *et al.*, 1997; De Benedetto *et al.*, 2000; Caramelli *et al.*, 2003; Gilbert *et al.*, 2004; Pruvost & Geigl, 2004; Malmström *et al.*, 2005a).

Différents facteurs sont la cause de la perte de l'ADN ancien et des coupures qui diminuent sa taille. La plupart d'entre eux interviennent rapidement après la mort de l'individu.

Dès le décès, les organites cellulaires qui séquestrent les enzymes sont rompus, conduisant à la dégradation de l'ADN par des enzymes comme les nucléases lysosomales. Les molécules d'ADN sont également dégradées par les micro-organismes qui se nourrissent des macromolécules (Pääbo *et al.*, 2004).

Seules des circonstances exceptionnelles permettent de les préserver. Des sites récents peuvent ainsi être moins enclins à la conservation de l'ADN que des sites plus anciens, mais dont les conditions physico-chimiques sont plus propices à sauvegarder le matériel génétique (Hagelberg *et al.*, 1991; Kolman & Tuross, 2000). Parmi les facteurs favorables à la conservation de l'ADN se trouve la température : les températures basses inhibent l'action des enzymes et ralentissent les micro-organismes. De plus, l'adsorption de l'ADN à une matrice minérale, comme celle constituant les os ou les dents, pourrait aussi favoriser sa préservation (Collins *et al.*, 2002).

L'ADN qui a résisté à cette première étape de dégradation est soumis à d'autres facteurs qui le détériorent (Figure 6). Les réactions d'hydrolyse provoquent la rupture des liaisons phosphodiester, à l'origine de coupure simple-brin (Pääbo *et al.*, 2004; Willerslev & Cooper, 2005). Ces réactions peuvent également toucher la liaison glycosidique entre le sucre et la base azotée. Il est à noter que les purines sont vingt fois plus touchées par cette hydrolyse que les pyrimidines (Lindahl, 1993). Les sites abasiques ainsi créés sont déstabilisés et peuvent induire une coupure du double brin de l'ADN.

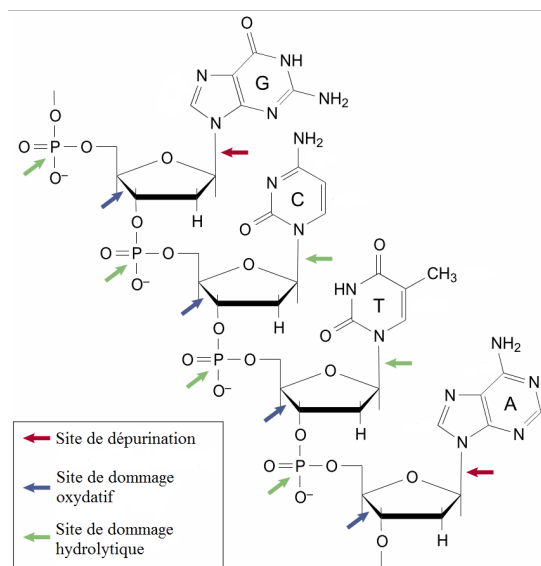


Figure 6 : Principales lésions conduisant à la coupure de la molécule d'ADN, d'après (Hofreiter *et al.*, 2001b).

2.2.2. L'établissement de lésions bloquantes

Certains échantillons anciens peuvent malgré tout fournir de l'ADN amplifiable lorsqu'ils sont traités avec une ADN-polymérase modifiée afin d'être capable de passer outre certains dommages de l'ADN (d'Abbadie *et al.*, 2007). Cette observation permet de supposer que la dégradation de l'ADN n'est pas le seul facteur qui empêche l'amplification d'ADN de longue taille, mais que des lésions bloquent également l'élongation par la Taq Polymérase lors de la PCR (Shapiro, 2008).

La technique de Polymerase Extension Profiling a été développée afin de déterminer l'importance des lésions bloquant l'avancée de la polymérase (Heyn *et al.*, 2010). Cette technique, qui utilise les récents développements du séquençage massif, permet de détecter directement les dommages qui empêchent l'avancée de la polymérase, molécule par molécule. L'étude a permis de montrer que les dommages bloquants de l'ADN touchent une quantité très variable de séquences, en fonction des conditions de préservation des échantillons : 2% des séquences issues d'un os de mammoth congelé contiennent des lésions bloquantes, taux qui s'élève à 10 et 39% pour deux os de chevaux conservés dans du permafrost, alors que ce taux est de 36% pour un os d'ours des cavernes provenant d'une grotte.

Les lésions peuvent être induites par des radicaux libres. Une irradiation aux rayons ultra-violets provoque une attaque oxydante à l'origine de liaisons entre deux pyrimidines

successives formant une structure en anneau. L'oxydation peut également conduire à la rupture du cycle carboné du sucre et à la formation de bases azotées oxydées (comme la 5-hydroxy-hydantoïne) qui bloquent l'ADN-polymérase (Figure 7).

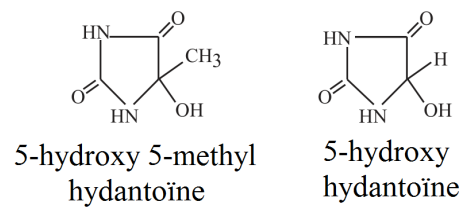


Figure 7 : Les bases azotées formant la plupart des lésions bloquantes dans l'ADN ancien.

Une autre cause de blocage de la polymérase réside dans l'établissement de liaisons entre les macromolécules du fait de la présence de produits de la réaction de Maillard. Des complexes se forment entre les sucres et les groupements amines des molécules organiques. Selon une interprétation extensive du phénomène, il pourrait également concerner les acides nucléiques. Ainsi, dans un coprolithe de paresseux géant analysé par spectrométrie de masse précédée d'une pyrolyse en phase gazeuse, des alkylpyrazines, furanones et furaldéhydes ont été mises en évidence (Poinar *et al.*, 1998). Ces produits sont spécifiques de réactions de Maillard avancées et pourraient résulter de la présence d'un grand nombre de liaisons croisées entre macromolécules (Figure 8).

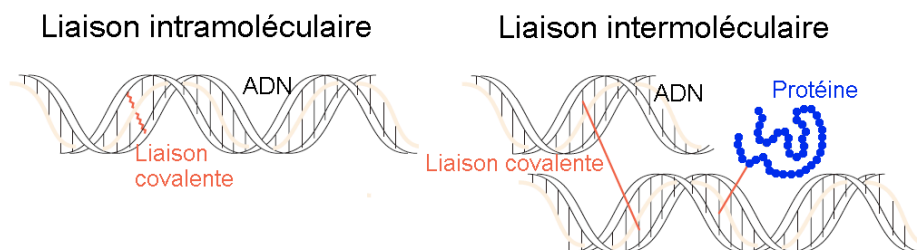


Figure 8: Différents types de liaisons moléculaires qui empêchent la progression de la Taq Polymérase.

Des études menées sur des échantillons conservés dans du permafrost ont permis de montrer que les liaisons croisées sont des dommages très fréquents (Hansen *et al.*, 2006). Elles seraient la première cause de dommage de l'ADN, avec une fréquence de lésion de $4 \cdot 10^{-14}$, alors que cette fréquence est de $2 \cdot 10^{-17}$ et $2 \cdot 10^{-15}$ pour les coupures double brins et simple brin (Mitchell *et al.*, 2005). Elles pourraient être plus nombreuses sur l'ADN nucléaire que mitochondrial, car le premier est en interaction étroite avec des protéines histones, ce qui favoriserait la création de produits de Maillard (Binladen *et al.*, 2006).

Cependant ces données ont été obtenues pour des échantillons conservés dans du permafrost, où l'eau liquide à l'origine des hydrolyses et des oxydations est rare. Des échantillons conservés en milieu tempéré pourraient présenter un autre profil de dommages.

L'emploi de bromure de N-phénacylthiazolium (N-PTB) (Vasan *et al.*, 1996) a été suggéré pour rompre ces liaisons, car cette molécule coupe la liaison entre des sucres réducteurs et des amines primaires. Elle pourrait faciliter la récupération d'ADN ancien (Poinar *et al.*, 1998; Poinar *et al.*, 2003).

2.2.3. Les dommages de l'ADN

En plus de la dégradation et des lésions qui touchent le squelette de la molécule d'ADN ancien, celle-ci présente également des dommages au niveau des bases azotées (Figure 9). Elles sont touchées par des réactions d'oxydation qui, en modifiant les interactions électrostatiques entre bases, conduisent fréquemment à l'incorporation de nucléotides erronés lors de la PCR. Le taux d'erreur lors de la PCR est de 8.10^{-3} alors qu'il est de 2.10^{-3} dans de l'ADN moderne (Olivieri *et al.*, 2010).

Pour des raisons géométriques, la majorité des mutations sont des transitions (Willerslev & Cooper, 2005). Celles-ci sont de deux types : le type 1 concerne les mutations $A \rightarrow G / T \rightarrow C$ et le type 2, celles $G \rightarrow A / C \rightarrow T$ (Hansen *et al.*, 2001). Lors des premières analyses, effectuées grâce à du séquençage Sanger classique, on a observé de 20 à 30% de mutations de type 1, pour 50 à 60% de lésions de type 2, avec un rapport entre les deux types de lésions proche de 1/2 (Gilbert *et al.*, 2003; Binladen *et al.*, 2006). Des études postérieures, effectuées grâce à du séquençage de nouvelle génération ont montré que les transitions de type 2 sont très largement majoritaires, et représentent 94% (Briggs *et al.*, 2007) des transitions et 88% des mutations (Gilbert *et al.*, 2007a), et que le ratio type 1/type 2 est de 1:8 (Olivieri *et al.*, 2010).

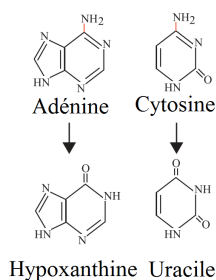


Figure 9 : Les transitions de type 2 sont dues à la désamination.

Les transitions de type 1 sont dues à des artefacts de PCR, conduisant aléatoirement à la mauvaise incorporation d'un nucléotide.

Les transitions de type 2 sont causées par la désamination de la cytosine (et de son homologue la 5-méthylcytosine) en uracile (et thymine) et de la guanine en hypoxanthine, qui est lue comme une adénine. De nombreuses études ont montré que c'est la transition des cytosines en uraciles qui est la principale modification touchant les bases azotées en ADN ancien (Green *et al.*, 2006; Stiller *et al.*, 2006; Brotherton *et al.*, 2007; Gilbert *et al.*, 2007a).

La proportion des transitions de type 2 $C \rightarrow T$ n'est pas identique tout au long de la séquence : selon Briggs et collaborateurs, elle est multipliée par 50 à l'extrémité 5' du fragment d'ADN (Briggs *et al.*, 2007) où elle touche une cytosine sur cinq. Cette observation est également visible à l'autre extrémité du brin d'ADN, avec des transitions $G \rightarrow A$ beaucoup plus nombreuses en position 3' (Figure 10). Ce profil correspond aux substitutions $C \rightarrow T$ se produisant sur le brin complémentaire. Or, les molécules d'ADN simple-brin sont très sensibles aux désaminations. Le profil observé correspond donc sans doute à l'existence de brins d'ADN dépassant de part et d'autre de la molécule, qui accumulent les désaminations.

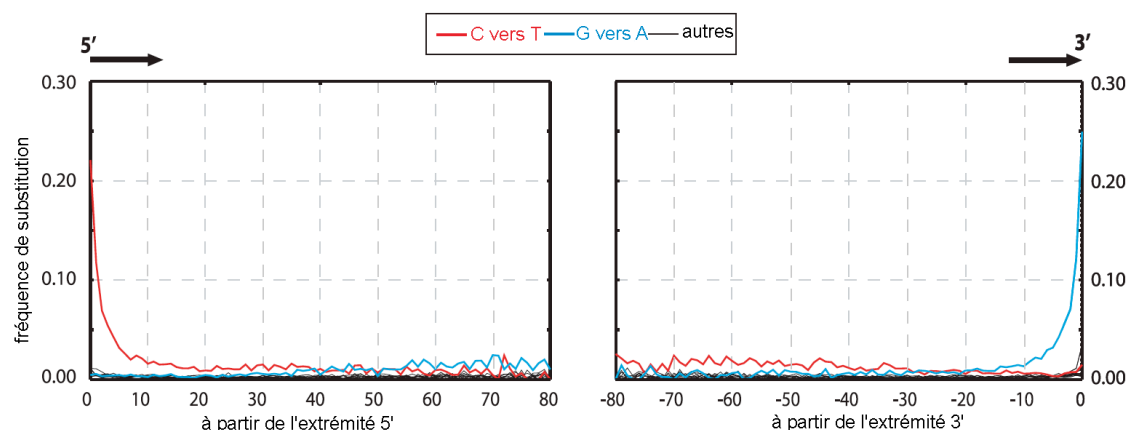


Figure 10 : Mise en évidence de l'augmentation du nombre de substitutions de type 2 aux extrémités du brin d'ADN ancien (d'après (Briggs *et al.*, 2007)).

Afin de déduire une séquence fiable, il est nécessaire d'effectuer plusieurs lectures pour chaque fragment d'ADN ancien. La multiplicité des lectures passe par la réalisation de plusieurs PCR sur le même échantillon pour chacune des séquences étudiées, et le séquençage de nombreux clones pour chacune de ces PCR (Bower *et al.*, 2005).

Une autre approche consiste à supprimer les bases azotées endommagées. La présence d'uracile étant la principale cause de ces mutations, certains chercheurs ont suggéré d'utiliser une uracile-DNA glycosylase. Cette enzyme coupe la base azotée du brin d'ADN, en laissant un site abasique (Hofreiter *et al.*, 2001a). Ainsi, les molécules abîmées ne sont plus amplifiées et la possibilité d'obtenir des séquences non mutées augmente. Il est possible de restaurer la viabilité de ces molécules en les réparant par élimination du site abasique (Briggs *et al.*, 2009).

2.2.4. La présence de molécules inhibitrices

Lors de l'extraction de l'ADN ancien, de nombreuses molécules provenant du sol ou de l'échantillon sont également extraites. Certaines d'entre elles ont une action inhibitrice sur les réactions de biologie moléculaire et empêchent en particulier l'amplification par PCR. Elles appartiennent principalement à la classe des acides humiques et fulviques, des composés polyphénoliques. Pour certains auteurs, ces inhibiteurs sont plus fréquents dans les extraits de sol, de coprolithes et de cheveux que dans les extraits d'os (King *et al.*, 2009).

Certains additifs, comme la bétaine, la BSA, la protéine T4 gp32 et le sperme de saumon, peuvent diminuer l'inhibition (Tebbe & Vahjen, 1993; Kreader, 1996; Abu Al-Soud & Radstrom, 2000; King *et al.*, 2009). Certaines polymérases sont également moins sensibles aux inhibiteurs que la Taq-polymérase couramment utilisée (Baar *et al.*, 2011).

À cause de ces molécules inhibitrices, il est impossible d'utiliser une trop forte quantité d'extrait dans la PCR. En effet, lorsque la quantité d'inhibiteurs devient trop importante, l'amplification échoue.

2.2.5. Les risques de contamination

La dégradation de l'ADN ancien rend son analyse très sensible aux contaminations. Comme il est endommagé et présent en très petite quantité, il est amplifié moins facilement que les quelques molécules d'ADN moderne qui peuvent se retrouver dans l'extrait.

La très grande majorité de l'ADN présent dans un échantillon archéologique est constituée de séquences microbiennes et environnementales présentes dans le sol où l'échantillon a été prélevé (Noonan *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2006; Noonan *et al.*, 2006). La PCR, en ciblant des régions particulières et une espèce ou un genre précis, permet d'éviter la plus grande partie des contaminations. Cependant, comme l'amplification par PCR est exponentielle à partir d'une seule molécule, elle peut facilement éclipser l'ADN ancien recherché et mettre en avant une molécule moderne contaminante.

Après le sol, la seconde source de contamination est l'ADN humain déposé sur l'échantillon archéologique par sa manipulation depuis la découverte jusqu'au laboratoire inclus (Malmström *et al.*, 2005b). Cette contamination peut-être facilement repérée dans le cas où les échantillons étudiés sont des végétaux ou des animaux non humains. En revanche, l'étude d'ADN ancien appartenant à la lignée humaine soulève de nombreux problèmes (Delpozzo & Guardiola, 1989; Wall & Kim, 2007).

Avant le séquençage du génome humain, les études d'animaux fossiles pouvaient être également touchées par des contaminations humaines. En effet, l'ADN nucléaire contient des insertions provenant du génome mitochondrial, que l'on appelle 'numts' (nuclear-mitochondrial insertions). Avant que les numts ne soient répertoriés, ils ont pu être annotés comme séquences mitochondriales (Willerslev & Cooper, 2005). Ainsi, c'est un numt humain qui correspond à la séquence retrouvée dans un échantillon de dinosaure et attribuée de façon erronée à cette espèce (Zischler *et al.*, 1995).

Une troisième source de contamination provient des produits utilisés pour l'extraction, l'amplification et le séquençage des molécules anciennes (Eshleman & Smith, 2001). Certains des réactifs (comme la BSA) sont fabriqués à partir de produits animaux qui peuvent laisser des quantités infimes d'ADN. Ces contaminants sont difficiles à détecter dans le cas de l'étude portant sur des espèces anciennes proches (Leonard *et al.*, 2005). De l'ADN humain contaminant a également été mis en évidence dans des solutions d'amorces (Deguilloux *et al.*, 2011).

La dernière source de contamination est l'ADN amplifié lors des manipulations précédentes, appartenant à la même espèce ou à une espèce proche. En effet, la PCR et le clonage subséquent permettent d'obtenir des quantités très importantes de molécules amplifiées ($10^9 - 10^{15}$). Ces molécules sont contenues dans un volume de petite taille et sont susceptibles de créer des aérosols dispersés lors de l'ouverture des tubes, ou du transfert des liquides. Les produits de PCR peuvent donc se répandre facilement dans le laboratoire, et dans des quantités des millions de fois plus importantes que celles présentes dans les échantillons anciens (Willerslev & Cooper, 2005). Comme ces séquences sont identiques aux séquences attendues ciblant la même espèce, et la même région du génome, elles sont très difficiles à mettre en évidence *a posteriori* et peuvent aisément fausser l'analyse.

2.2.6. Les mesures de précautions permettant d'éviter les contaminations

Des lignes de conduites ont été mises en place pour limiter les contaminations par de l'ADN moderne. Elles conseillent de manipuler les échantillons anciens et les extraits d'ADN ancien avant l'amplification dans un laboratoire dédié à la paléogénétique et de séparer, dans l'espace et dans le temps, les étapes pré-amplification des étapes post-amplification. Le laboratoire où les analyses d'ADN ancien sont effectuées peut être en surpression, afin de diminuer le risque d'entrée de molécules venant de l'extérieur, et posséder un système d'irradiation aux ultra-violets.

La reproductibilité dans un second laboratoire permet de vérifier qu'il n'y a pas de contaminations liées au lieu ni aux personnes (Pääbo *et al.*, 2004; Willerslev & Cooper, 2005).

Des vérifications *a posteriori* peuvent également être réalisées. Ainsi, la présence d'ADN humain dans un échantillon animal (et vice-versa) est due à une contamination. Dans le cas d'étude de séquences humaines, la présence d'hétérogénéités dans les séquences obtenues montre qu'il y a eu contamination, sans qu'il soit possible de déterminer quelle est la séquence initiale.

Le fait que les molécules séquencées soient courtes et contiennent des dommages est un indice caractéristique du caractère ancien de l'ADN (Hofreiter et al., 2001a; Gilbert *et al.*, 2003).

La réalisation de blancs d'amplification et d'extraction en parallèle de l'amplification est une condition nécessaire à l'authentification d'une séquence d'ADN ancien. Pourtant, ces blancs peuvent parfois être négatifs, alors que les séquences amplifiées par PCR montrent des contaminations. Certains chercheurs ont envisagé que ces contaminations soient silencieuses dans les blancs et ne s'expriment que lorsque de l'ADN ancien est présent en quantité suffisante : c'est l'effet '*carrier*' (Cooper, 1992; Handt *et al.*, 1996). Cependant, il semblerait que l'effet '*carrier*' ait une importance faible, et que la différence de comportement entre les réactions contenant de l'échantillon et les blancs soit due à la contamination de l'échantillon lui-même (Malmström *et al.*, 2005b).

2.3. Les méthodes de l'ADN ancien

Une fois les précautions prises pour éviter les contaminations et récupérer l'ADN ancien, la paléogénétique est une discipline qui permet d'obtenir des informations de sources variées et portant sur des problématiques diverses.

2.3.1. Les matériaux utilisés.

Tous les restes animaux ou végétaux, susceptibles d'être retrouvés sur des terrains archéologiques ou paléontologiques, ont pu être utilisés pour des analyses paléogénétiques : dents, os, poils, chair (si conservée), coprolithes ...

Par ailleurs, les recherches d'ADN ancien étant destructives, les paléontologues et les paléoanthropologues préfèrent leur réserver des éléments de peu de valeur paléontologique. Malheureusement, ces éléments dégradés ne se révèlent pas toujours riches en ADN.

2.3.1.1. Les tissus mous

Les tissus mous sont les éléments les plus riches en cellules et les plus susceptibles de

contenir initialement de l'ADN. Pour cette raison, ce sont les premiers échantillons à avoir été utilisés en paléogénétique grâce à l'étude d'animaux naturalisés dans des musées. Des tissus conservés dans des tourbières, milieu propice à la momification, ont également été étudiés (Pääbo *et al.*, 1988). En revanche, les momies égyptiennes ne sont pas des sources incontestables d'ADN ancien, car le climat chaud n'est pas propice à sa conservation. De plus, les produits utilisés par les embaumeurs, comme le natron ou des goudrons, ont pu endommager l'ADN.

La plupart des tissus mous utilisés en paléogénétique proviennent d'échantillons retrouvés dans le permafrost ou la glace. La congélation est si propice à la préservation des molécules organiques que les structures cellulaires peuvent même parfois y être conservées (Figure 5). Des données génomiques ont pu être obtenues grâce à ces tissus pour le mammouth (Vartanyan *et al.*, 1993; Noro *et al.*, 1998; Rogaev *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2008) et l'homme (Ermini *et al.*, 2008; Gilbert *et al.*, 2008b).

Pour des échantillons récents, il est même possible de retrouver des brins d'ARN, comme ceux du virus de la Grippe Espagnole de 1918 (Reid *et al.*, 1999; Basler *et al.*, 2001).

2.3.1.2. Les os et les dents

Comme les tissus mous sont peu fréquents, les paléogénéticiens se sont tournés vers les vestiges les plus abondants en milieu archéologique : les os et les dents. Bien que ces tissus soient relativement pauvres en cellules, la présence d'un cortex solide protège l'ADN de dégradations et de contaminations venues de l'extérieur (MacHugh *et al.*, 2000). De plus, l'hydroxyapatite de calcium, chargée positivement, pourrait adsorber l'ADN (chargé négativement) et ainsi le protéger des dommages (Lindahl, 1993). En effet, on observe une corrélation négative entre les altérations minérales et la survie de l'ADN qui suggère que l'ADN est stabilisé par son interaction avec l'hydroxyapatite de calcium (Okazaki *et al.*, 2001; Gotherström *et al.*, 2002).

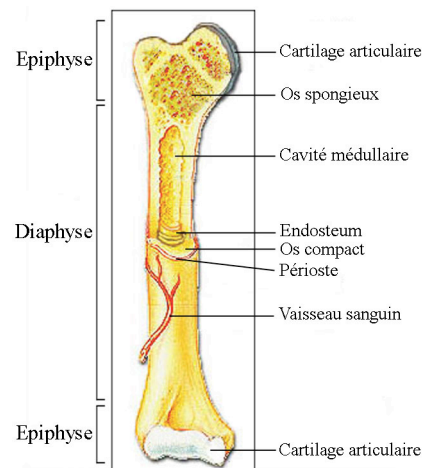


Figure 11 : Structure d'un os long.

L'os spongieux vivant (Figure 11) contient plus de cellules que le cortex. Il est riche en moelle osseuse rouge, alors que l'os compact du cortex ne possède que quelques cellules, des ostéocytes, protégées dans des loges creusées dans la matrice, les ostéoplastes. La protection complémentaire apportée par la matrice de l'os compact est favorable à la conservation de l'ADN. Par conséquent, on considère que le cortex est plus susceptible de conserver de l'ADN ancien, que le tissu spongieux. De plus, le risque de contamination par des organismes extérieurs est moins important dans l'os compact.

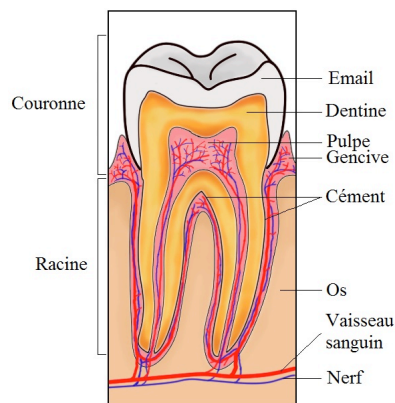


Figure 12 : Structure d'une dent.

Les dents sont souvent considérées comme étant une source d'ADN amplifiable plus riche que les os. En effet, le tissu dentaire vivant contient plus de cellules que le tissu osseux et la dureté de l'émail et du ciment protège l'ADN des dégradations et des contaminations (Figure 12).

La quantité d'ADN est variable au sein d'un même échantillon. Une étude comparative menée sur des dents humaines et de bison a montré que le ciment des dents était plus riche en ADN que la dentine ou l'émail (Adler *et al.*, 2011).

2.3.1.3. Les poils et les cheveux

Bien que le contenu en ADN des cellules kératinisées soit faible (Higuchi *et al.*, 1988; Allen *et al.*, 1998), les cheveux et les poils constituent également une source d'ADN ancien. Des analyses ont pu montrer la conservation de l'ADN dans des échantillons d'âge historique (Gilbert *et al.*, 2004; Amory *et al.*, 2007; Gilbert *et al.*, 2007d; Miller *et al.*, 2009; Willerslev *et al.*, 2009; Melchior *et al.*, 2010) et préhistorique (Gilbert *et al.*, 2004; Gilbert, *et al.*, 2007b; Gilbert *et al.*, 2008a; Gilbert *et al.*, 2008b; Rasmussen *et al.*, 2010).

Ces échantillons, riches en kératine hydrophobe, contiennent très peu d'eau, ce qui permet d'éviter l'hydrolyse et l'oxydation de l'ADN. De plus, ils sont peu sensibles à la contamination, car l'ADN contaminant pénètre difficilement dans l'échantillon (Gilbert *et al.*, 2004).

L'ADN est mieux conservé à la racine des poils que dans la tige, où il a subi une étape de kératinisation qui l'a partiellement endommagé. La majorité de l'ADN serait préservée à l'intérieur du cortex. La présence de colorants, comme l'eumélanine et la phaéomélanine responsables respectivement de la couleur noire et rousse des cheveux, agit comme inhibiteur de PCR (Bengtsson *et al.*, 2011).

Par ailleurs, il semble que l'ADN mitochondrial soit plus abondant ou mieux conservé que l'ADN nucléaire dans ce type d'échantillon : dans un os de mammoth, le ratio entre l'ADN mitochondrial et nucléaire est de 1/658 (Poinar *et al.*, 2006), alors qu'il est de 1/217 à 1/48 dans des poils de cette espèce (Gilbert *et al.*, 2007b). Les raisons de cette préservation différentielle ne sont pas encore éclaircies : l'activité métabolique intense des cellules des follicules pileux nécessite lors de la formation du poil une très grande quantité de mitochondries ; de plus, la membrane mitochondriale, plus petite que la membrane nucléaire, pourrait demeurer intacte lors de la formation du poil et protéger l'ADN qu'elle contient (Bengtsson *et al.*, 2011).

Les griffes et les ongles se révèlent être également de très bonnes sources d'ADN ancien.

Ainsi, des échantillons de sabot de rhinocéros noir et de Java contiennent 0,41 à 1,21 % d'ADN mitochondrial, une valeur proche de celle observée sur des poils de rhinocéros de Sumatra et de rhinocéros laineux (1,14% et 6,6%, respectivement).

Pour les mêmes raisons, les plumes des oiseaux provenant d'échantillons d'âge historique ont été utilisées pour retrouver de l'ADN ancien (Olsen *et al.*, 2011). C'est dans le calame et dans le rachis que l'ADN est le mieux conservé, et dans les barbes qu'il est le plus dégradé (Rawlence *et al.*, 2009).

2.3.1.4. *Les coprolithes*

Les coprolithes sont des excréments fossilisés susceptibles de fournir une grande variété d'informations (Figure 13). Ils sont utilisés depuis longtemps en palynologie car certains d'entre eux concentrent les pollens présents dans les eaux de boisson ou l'alimentation de l'individu producteur. Ils contiennent également de l'ADN de l'animal qui a produit l'excrément (Poinar *et al.*, 1998; Hofreiter *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2008). Du matériel génétique appartenant à l'alimentation du producteur du coprolithe est parfois présent et permet de mettre sa diète en évidence (Poinar *et al.*, 1998). Le cas échéant, l'étude génétique de coprolithes permet également de caractériser les parasites intestinaux (Loreille *et al.*, 2001b; Loreille & Bouchet, 2003; Iñiguez *et al.*, 2006; Luciani *et al.*, 2006).

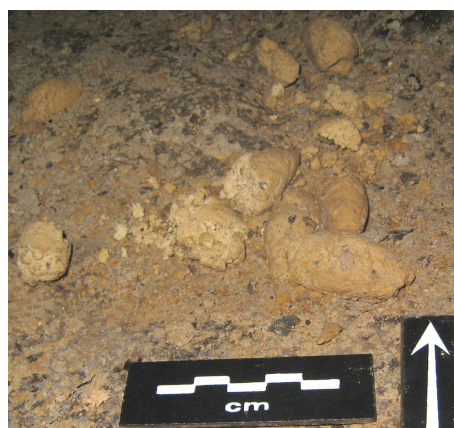


Figure 13 : Coprolithes attribués à un canidé de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc © MCC, CNP Périgueux.

Les coprolithes contiennent parfois des produits de la réaction de Maillard. Afin de les éliminer, l'utilisation de bromure de N-phénylthiazolium (Vasan *et al.*, 1996) a été suggérée

et se révèle efficace sur les coprolithes de paresseux (Poinar *et al.*, 1998).

2.3.1.5. *Le sol*

Le sol, et en particulier le sol gelé du permafrost, peut également contenir de l'ADN ancien. Ainsi, des séquences de vertébrés, de plantes (Willerslev *et al.*, 2003) et de bactéries (Willerslev *et al.*, 2004b) ont été mises en évidence directement dans du permafrost. Ce milieu atteint des températures extrêmes (de -9°C en Sibérie à -50°C dans les calottes polaires), ce qui inhibe les réactions de dégradation de l'ADN. La richesse en méthane du permafrost sibérien le rend anaérobie et empêche les réactions d'oxydation (Willerslev *et al.*, 2004a).

Dans ce milieu, l'ADN peut être conservé pendant des périodes longues de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de milliers d'années (Willerslev *et al.*, 2003; Willerslev *et al.*, 2004b).

Le sol de régions tempérées contient également de l'ADN ancien. Ainsi, une grotte néo-zélandaise a fourni des sédiments datés d'environ 600 ans, qui révèlent la présence d'ADN de plusieurs espèces de moas, maintenant éteintes (Willerslev *et al.*, 2003).

Le lessivage de l'ADN pourrait rendre inutilisable les informations obtenues à partir de ce substrat. En effet, si les molécules d'ADN circulent verticalement dans le sol, il devient impossible d'utiliser les séquences obtenues dans une couche particulière pour décrire le paléo-environnement. Par chance, il semble que la circulation de l'ADN soit très limitée, voire inexistante car on observe une succession d'écosystèmes différents selon la profondeur (Willerslev *et al.*, 2003; Lydolph *et al.*, 2005). L'étude de deux carottes de sédiments provenant de grottes néo-zélandaises montre que l'ADN de moas, disparus il y a 550 ans, ne se trouve que dans les couches les plus profondes, tandis que des séquences de moutons, arrivés dans cette région durant le XIX^{ème} siècle, n'apparaît que dans les couches superficielles. L'ADN retrouvé dans les sédiments les plus anciens porte plus de marques de dégradation que celui retrouvé dans les sédiments plus jeunes (Willerslev *et al.*, 2004a; Hansen *et al.*, 2006).

2.3.1.6. Les carapaces d'insectes

Bien que la plupart des études de paléogénétique aient porté sur de l'ADN de vertébrés, les insectes ont également pu fournir de l'ADN ancien, d'époque historique (Goldstein & Desalle, 2003; Chapco & Litzenberger, 2004; Harper *et al.*, 2006; Hartley *et al.*, 2006; Watts *et al.*, 2007), ou plus préhistorique (Reiss, 2006; Willerslev *et al.*, 2007).

2.3.1.7. Les coquilles d'oeuf

De l'ADN nucléaire et mitochondrial a également été retrouvé dans des coquilles d'œufs fossiles provenant de différentes régions tempérées (Australie, Madagascar, Nouvelle Zélande), et d'âges Holocène et Pléistocène (Huynen *et al.*, 2010; Oskam *et al.*, 2010). En particulier, des espèces disparues, comme l'oiseau-éléphant de Madagascar, ont ainsi pu être caractérisées génétiquement pour la première fois.

L'ADN est réparti dans la totalité de la matrice minérale de la coquille, à l'intérieur de petites niches. Ainsi protégé, il peut se conserver durant des périodes beaucoup plus longues que ce qui a été observé sur des échantillons osseux provenant de milieux tempérés. La structure de l'œuf, ainsi que la présence de molécules antibiotiques dans la coquille, permet de limiter la contamination bactérienne par rapport à l'os (Oskam *et al.*, 2010).

La couche externe de la coquille pourrait également collecter l'ADN de l'oiseau qui a couvé l'œuf. Ainsi, des analyses différentielles des couches externes et internes de la coquille ont permis de montrer que le mâle couvait la portée chez certaines espèces de moas (Huynen *et al.*, 2010).

2.3.1.8. Les tissus conservés dans la paraffine

Des tissus conservés dans de la paraffine peuvent être utilisés comme source de matériel génétique : ce cas est particulièrement courant pour des spécimens humains récents, sains ou malades. Ainsi, c'est dans des poumons de malades, conservés dans cette matrice, que les premières séquences nucléiques de grippe espagnole ont pu être retrouvées (Taubenberger *et al.*, 1997).

Bien que le formaldéhyde, généralement utilisé comme fixateur, ne soit pas cause de la dégradation de l'ADN ou de l'ARN ancien, il est à l'origine de liaisons croisées qui

empêchent son amplification. De plus, si la solution de fixation n'est pas tamponnée, le pH peut devenir très bas, ce qui est particulièrement néfaste pour la conservation de l'ADN (Gilbert *et al.*, 2007c).

2.3.1.9. Influence de l'environnement sur la préservation de l'ADN.

Parmi les différents facteurs environnementaux qui influent sur la conservation de l'ADN, la température, sa stabilité, la fréquence et l'amplitude de sa variation est le facteur le plus important. Plus un milieu est froid et stable, plus l'ADN qu'il contient se conserve longtemps. Les échantillons préservés dans du permafrost peuvent contenir de l'ADN amplifiable pendant plusieurs centaines de milliers d'années (Willerslev *et al.*, 2004a).

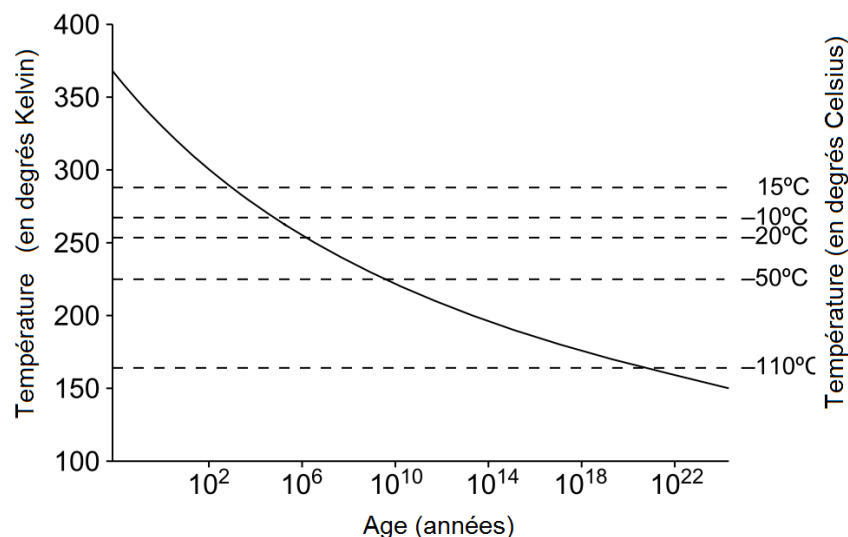


Figure 14 : Temps de survie d'un ADN de taille supérieure à 100 pb, en fonction de la température. Le calcul est effectué en partant d'un génome complet de 3 milliards de pb, subissant des dommages uniquement sur les purines, répartis de façon identique sur tout le génome. Le taux de dépurination suit une cinétique de Lindahl et Nyberg. D'après (Willerslev *et al.*, 2004a).

Dans les régions tempérées, ce sont les échantillons provenant de grottes qui sont souvent les mieux conservés (Figure 14). Dans les grottes, la température reste très stable, autour d'une valeur comprise entre 10 et 15°C. De plus, les grottes se creusent dans des environnements karstiques, riches en calcium et de pH neutre ou basique, qui sont des conditions propices à la conservation de la matière organique et de l'ADN en particulier.

L'ADN originaire de régions chaudes se conserve plus difficilement. Pourtant, des informations génétiques seraient bienvenues dans ces lieux, où a été initiée la domestication

d'un grand nombre d'espèces et où a été retrouvée une espèce humaine très particulière, *Homo florensiensis*. Quelques études ont tout de même permis de retrouver de l'ADN dans des échantillons de bovidés des Baléares (Lalueza-Fox *et al.*, 2005). Malheureusement, il est très rare de retrouver du matériel génétique dans des régions tropicales ou sub-tropicales.

Les échantillons conservés en musées possèdent un ADN plus endommagé que ceux conservés dans des grottes ou dans du permafrost (Binladen *et al.*, 2006). En particulier, la comparaison entre un fragment de mâchoire d'auroch conservé plusieurs dizaines d'années dans une réserve avec l'autre fragment resté en place et analysé immédiatement après son excavation, a montré que l'ADN était très mal préservé dans la partie prélevée il y a plusieurs dizaines d'années, alors qu'il était encore en grandes quantités dans le fragment conservé dans le sol (Pruvost *et al.*, 2007).

Les conditions de conservation en musée ou en réserve (en particulier la température), le lavage préalable des ossements, ainsi que l'application d'un vernis, sont néfastes à la préservation de l'ADN.

2.3.2. Les séquences d'ADN ciblées

2.3.2.1. *L'ADN mitochondrial*

La plupart des études de paléogénétique ont jusqu'à présent porté sur l'ADN mitochondrial. Ce génome, présent à plusieurs dizaines d'exemplaires dans les mitochondries, a une taille d'environ 17 000 pb (Figure 15). Chaque cellule en possède plusieurs centaines, voire plusieurs milliers de copies alors qu'elle ne présente que deux copies du génome nucléaire. Une portion du génome mitochondrial a donc une plus grande probabilité d'être préservée.

Les différentes régions de ce génome ne sont pas soumises à des pressions de sélection équivalentes et ne mutent donc pas à la même vitesse (Parson *et al.*, 1998). La région de contrôle et en particulier ses parties hypervariables HVR1 et HVR2, accumulent rapidement des mutations, jusqu'à 270%/Ma dans certaines régions. Leur analyse permet une étude au niveau des populations (Krajewski *et al.*, 1992; Vila *et al.*, 2001; Barnes *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2002; Leonard *et al.*, 2002; Orlando *et al.*, 2002; Shapiro *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2010a; Campos *et al.*, 2010b). D'autres régions, comme le gène Cytochrome b, mutent plus

lentement (2%/Ma) et permettent de classer les spécimens au niveau de l'espèce ou de la sous-espèce (Krajewski *et al.*, 1992; Noro *et al.*, 1998; Burger *et al.*, 2004; Rohland *et al.*, 2005; Hughes *et al.*, 2006). En particulier, le gène CoxI peut être utilisé dans des approches de classification par code-barres génétiques des espèces. Cette approche, courante sur les espèces modernes, a été réalisée avec succès sur des espèces éteintes de moas (Lambert *et al.*, 2005).

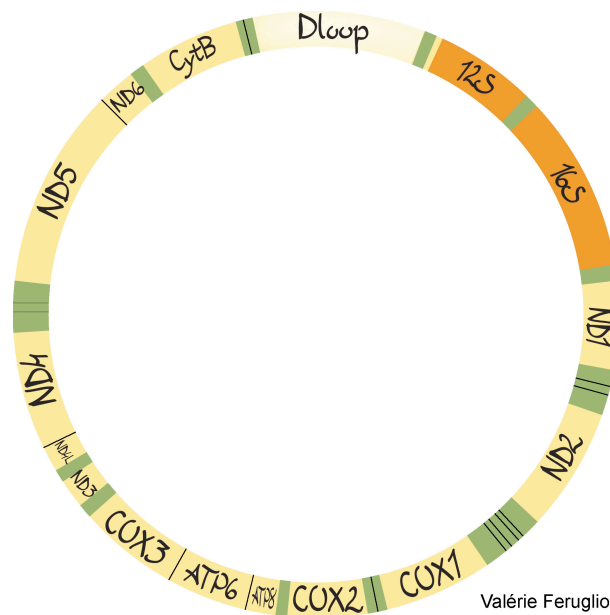


Figure 15 : Organisation des gènes le long du génome mitochondrial des Mammifères. Les régions représentées en jaune codent une protéine mitochondriale. Les régions représentées en orange sont des ARN ribosomiques. Les régions représentées en vert sont les ARN de transfert.

De plus, le génome mitochondrial a été séquencé pour de nombreuses espèces modernes et est disponible pour la plupart des espèces dans les banques de données. Il est donc aisé de comparer les informations obtenues pour des espèces anciennes avec le génome mitochondrial d'espèces proches qui existent toujours. En revanche, le génome nucléaire complet n'est séquencé que pour un petit nombre d'espèces.

Si les premières études phylogénétiques portant sur des espèces disparues ont ciblé des gènes individuels ou la région de contrôle, il est de plus en plus courant de séquencer le génome mitochondrial complet (Cooper *et al.*, 2001; Haddrath & Baker, 2001; Krause *et al.*, 2006; Rogaev *et al.*, 2006; Rohland *et al.*, 2007; Bon *et al.*, 2008; Ermini *et al.*, 2008; Gilbert *et al.*, 2008b; Green *et al.*, 2008; Krause *et al.*, 2008; Briggs *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2009; Rogaev

et al., 2009; Willerslev *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2010; Lindqvist *et al.*, 2010; Lari *et al.*, 2011). En effet, la taille de ce génome permet d'obtenir une phylogénie plus fine que celle portant sur seulement un gène et d'obtenir des valeurs de datation moléculaire plus précises (Yu *et al.*, 2007).

Comme il est de plus en plus facile d'obtenir des génomes mitochondriaux complets, ces séquences sont également utilisées pour des phylogénies intraspécifiques (Gilbert *et al.*, 2007b; Gilbert *et al.*, 2008a; Briggs *et al.*, 2009; Stiller *et al.*, 2009).

2.3.2.2. L'ADN nucléaire

Des séquences appartenant au génome nucléaire ont également été étudiées sur des échantillons archéologiques ou paléontologiques. En fonction des problématiques posées, les régions du génome nucléaire ciblées sont différentes.

Les microsatellites sont des séquences d'environ 50 à 100 pb, composées de répétitions d'un motif long de 1 à 5 nucléotides. Leur fréquence de mutation, c'est-à-dire la variation du nombre de motifs est très élevée (Karp, 2004). Ces marqueurs nucléaires permettent une analyse très fine de génétique des populations, en particulier en croisant les informations issues du génome nucléaire et du génome mitochondrial. L'ADN nucléaire étant très rarement conservé, il est difficile d'obtenir des séquences microsatellitaires pour un nombre suffisamment élevé d'échantillons anciens afin de mener une analyse de génétique des populations. Cependant, des séquences de ce type ont pu être mises en évidence dans des espèces éteintes de moas (Allentoft *et al.*, 2009). Leur analyse en paléogénétique est également compliquée par l'effet de « l'allèle marginal » : si les deux allèles portés par les deux chromosomes homologues sont différents, il arrive souvent que l'un d'entre eux soit préférentiellement amplifié dès les premiers stades de la PCR, ce qui peut conduire à l'effacement de l'autre allèle. Ainsi, un spécimen sera considéré à tort comme homozygote. Dans le cas des microsatellites, c'est l'allèle le plus court qui a tendance à être favorisé.

Cet effet, qui affecte également les études portant sur l'ADN moderne, est encore plus accentué pour l'ADN ancien (Allentoft *et al.*, 2011).

Des gènes nucléaires peuvent avoir une incidence sur le phénotype des spécimens étudiés. Certains gènes ont ainsi été analysés en vue de répondre à des questions portant sur la couleur de la peau (Lalueza-Fox *et al.*, 2007) ou du pelage (Lalueza-Fox *et al.*, 2007; Ludwig *et al.*,

2009), ainsi que sur la capacité de l'Homme de Néanderthal à parler (Krause *et al.*, 2007).

Comme la plupart des analyses portent sur le génome mitochondrial, qui se transmet uniquement par les mères, elles ne reflètent que l'histoire de la lignée femelle. Quelques études ont été menées sur le chromosome Y qui, transmis de père en fils, permet d'avoir des informations sur l'évolution des lignées mâles au sein d'une espèce (Bollongino *et al.*, 2008). L'étude de marqueurs nucléaires permet également de clarifier la division entre espèces de certains taxons comme le moa (Huynen *et al.*, 2003).

Pour les mêmes raisons que pour le génome mitochondrial, des séquences présentes en multiples copies dans le génome (comme les gènes 18S ou 28S) sont plus faciles à retrouver sur des échantillons archéologiques et peuvent être ciblées (Lalueza-Fox *et al.*, 2005).

2.3.2.3. De la paléogénétique à la paléogénomique

En 2005, la première étude visant à caractériser de larges portions du génome nucléaire est publiée (Noonan *et al.*, 2005). Deux échantillons d'ours des cavernes, âgés d'environ 40 000 ans environ ont été choisis pour construire des banques d'ADN, sans amplification ni sélection *a priori* des fragments. Près de 15 000 clones, appartenant aux deux librairies, ont ensuite été séquencés par la méthode de séquençage Sanger, ce qui a permis d'obtenir 26 800 pb du génome nucléaire d'ours des cavernes.

Cette première analyse a montré que la proportion d'ADN endogène était très faible par rapport aux ADN contaminants, car seules 1,1 et 5,5 % des lectures des deux banques s'alignaient avec les séquences de Carnivores.

Une analyse similaire, menée sur une librairie d'extrait d'os de Néanderthal (Figure 16), a permis de retrouver près de 55 000 pb de son génome nucléaire (Noonan *et al.*, 2006).

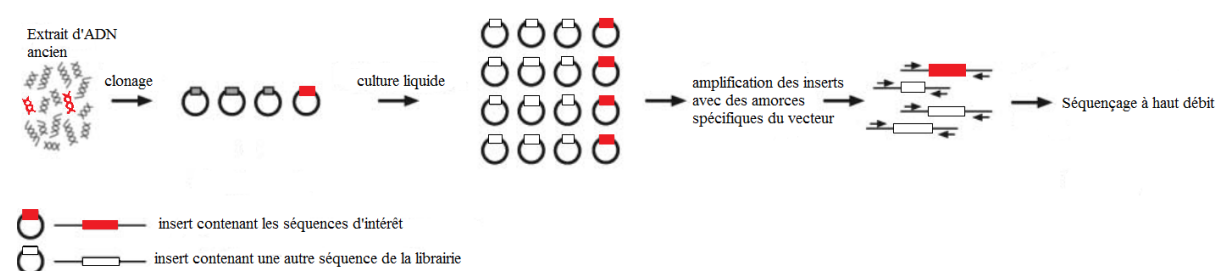


Figure 16 : Séquençage métagénomique de librairies d'ADN ancien, par une méthode traditionnelle (d'après (Noonan *et al.*, 2006)).

L'analyse de paléogénomes a beaucoup bénéficié des nouvelles technologies de séquençages, développées depuis 2005 par Roche Applied Science (454 Genome Sequencer FLX Instrument), Illumina (Solexa Genome Analyzer), Applied Biosystems (ABI SOLiD system) et Helicos Bioscience (HeliScope). Comme les deux premiers font partie de ceux qui sont les plus couramment utilisés en paléogénomique, nous les présentons plus en détail ci-dessous.

2.3.2.3.1. La méthode de séquençage à haut débit 454

La première de ces technologies (Margulies *et al.*, 2005) consiste à ligaturer des fragments d'ADN de petite taille à des adaptateurs spécifiques (Figure 17). Les fragments sont ensuite attachés à des billes de streptavidine sur lesquelles des amorces complémentaires de l'un des adaptateurs sont fixées. En moyenne, chaque bille ne porte qu'un fragment. Les fragments sont ensuite amplifiés par une PCR à émulsion, qui permet de couvrir la bille de millions de produits de PCR.

Les billes sont ensuite déposées sur une puce dans laquelle des puits ont été creusés, de façon à ce que chaque puit ne contienne qu'une bille. Chaque puit est relié à une fibre optique qui conduit les informations lumineuses émises dans ce puit jusqu'à une caméra CCD. Les fragments sont ensuite séquencés par pyroséquençage.

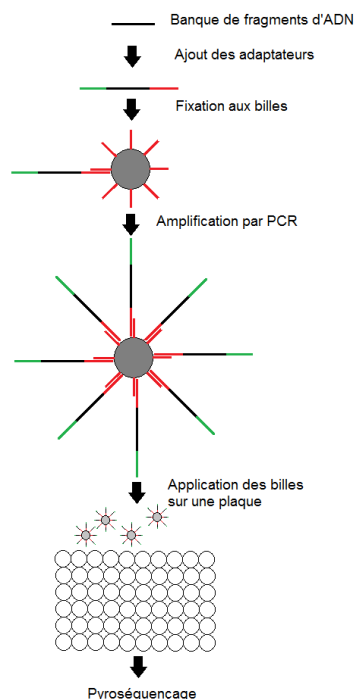


Figure 17 : Principe de la méthode de séquençage à haut-débit 454.

Cette méthode permet de séquencer un million de fragments d'ADN en parallèle, sur une longueur de 400 pb. Au total, un milliard de nucléotides peuvent être séquencés en une journée.

2.3.2.3.2. La méthode de séquençage à haut-débit Solexa

La deuxième méthode de séquençage de nouvelle génération a été développée par la société Solexa, rachetée depuis par Illumina (Bentley *et al.*, 2008). Comme pour le pyroséquençage, des adaptateurs sont ligaturés à des fragments d'ADN (Figure 18). Ils permettent la fixation des fragments à une puce sur laquelle se trouvent des amorces complémentaires en grande quantité. Une étape d'amplification « par pont » a ensuite lieu qui permet d'obtenir environ un millier de copies d'ADN simple brin.

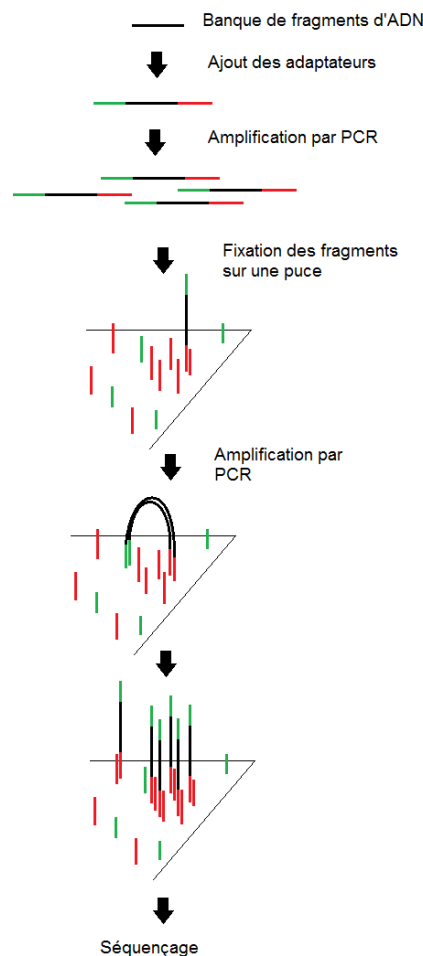


Figure 18 : Représentation schématique de la méthode de séquençage à haut-débit Solexa.

Les clusters de fragments identiques ainsi créés sont analysés par séquençage en cours de synthèse (Figure 19). Les quatre types de nucléotides terminateurs réversibles sont incorporés : ces nucléotides sont des déoxynucléotides tri-phosphates auxquels a été ajouté un groupement O-azidométhyle en 3'. Ce groupement est un terminateur qui permet d'éviter que plusieurs nucléotides ne soient insérés sur le même fragment d'ADN au cours d'un cycle. De plus, chacun des quatre types de nucléotides possède un pigment fluorescent de couleur différente.

Après incorporation du nucléotide au brin d'ADN en cours de synthèse, un signal laser est émis. La fluorescence provoquée par cette excitation est enregistrée par une caméra CCD et permet d'identifier la position et la nature du nucléotide terminateur. Le signal fluorescent est quantifié, la base correspondante est identifiée et un score de qualité lui est également alloué. Le groupement chimique responsable de la fonction terminatrice du nucléotide est ensuite retiré grâce à l'ajout de TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine). Un second cycle peut alors commencer.

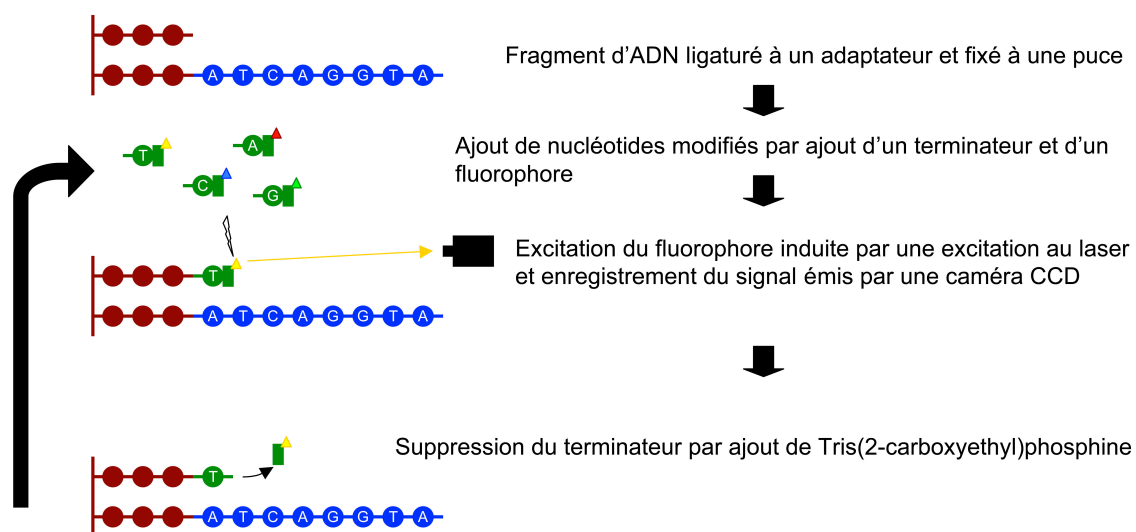


Figure 19 : Principe du séquençage en cours de synthèse.

Cette approche permet de séquencer un très grand nombre de fragments sur une puce (jusqu'à 320 millions de séquences). Cependant, la profondeur de lecture reste assez faible (150 pb).

2.3.2.3.3. Les autres méthodes de séquençage à haut-débit

La méthode ABI SOLiD débute par une étape identique à celle utilisée par la méthode 454 : les fragments de la librairie sont ligaturés à des billes, amplifiés par une PCR à émulsion, puis déposés sur un support. Le séquençage de ces fragments est en revanche très différent. Après fixation de l'amorce à l'adaptateur, des oligonucléotides de 8 pb sont hybridés au fragment d'ADN puis ligaturés. Ces octamères sont caractérisés par un marqueur fluorescent à leur extrémité, dont la couleur dépend de la nature d'un doublet de nucléotides (par exemple, du doublet contenant les nucléotides n°4 et 5). Après détection de la fluorescence, l'octamère est coupé après le dernier nucléotide du doublet (ici le 5), et le cycle de hybridation/ligation est recommencé.

Le processus de séquençage est répété en partant d'une amorce plus courte d'un nucléotide, ce qui permet de déterminer la séquences des doublets précédents. Le processus est recommencé autant de fois que nécessaire.

La méthode de séquençage HeliScope s'affranchit des étapes d'amplification en travaillant sur molécule unique. Pour cela, il faut que la caméra soit suffisamment sensible pour enregistrer un signal émis par une seule molécule. Les acides nucléiques sont fixés à une plaque de verre, sur laquelle sont ajoutés les réactifs de séquençage. Le séquençage est effectué en cours de synthèse, comme pour la méthode Solexa. Cependant, dans ce cas, la lecture est effectuée sur un brin, et non sur un cluster de séquences.

2.3.2.3.4. Utilisation des méthodes de séquençage à haut-débit en paléogénétique

Ces technologies sont particulièrement adaptées à l'étude de l'ADN ancien. En effet, elles permettent de séquencer un très grand nombre de fragments de courte taille (50 pb à 200 pb selon les techniques), qui sont les plus répandus dans un extrait d'ADN ancien. De plus, en évitant les amplifications ciblées, ces méthodes évitent qu'une contamination ne fausse drastiquement les résultats. Tout l'ADN d'un échantillon peut être séquencé de cette façon, sans sélection *a priori*. Ces nouvelles techniques de séquençage ont ainsi permis une analyse plus approfondie du génome nucléaire de spécimens anciens (Green *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2010) et le séquençage des génomes mitochondriaux complets (Gilbert *et al.*, 2008b; Green *et al.*, 2008; Willerslev *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2010).

Cependant, leur utilisation soulève plusieurs problèmes. La quantité d'ADN endogène varie selon les échantillons. Elle est très faible dans les os, avec quelques pourcents d'ADN endogène : 1 à 5% des extraits d'échantillons néanderthaliens utilisés pour le séquençage d'ADN nucléaire (Green *et al.*, 2010), 0,27% d'un extrait d'os de chèvre des Baléares (Ramirez *et al.*, 2009), 0,7% pour un os de cheval, 1,8% pour une mandibule de loup (Blow *et al.*, 2008). La seule exception est un os d'auroch du Mésolithique pour lequel 22% des lectures s'alignaient sur un génome de bovidé (Edwards *et al.*, 2010). En revanche, les banques construites à partir de poils ou de tissus congelés contiennent une large proportion d'ADN appartenant à l'espèce étudiée : 45,4% pour un échantillon de mammouth conservé dans du permafrost (Poinar *et al.*, 2006), 58% et 90% pour des poils de mammouth (Miller *et al.*, 2008) et 84,2% pour des cheveux d'un paléo-eskimo (Rasmussen *et al.*, 2010).

De plus, cette méthode reste sensible aux contaminations, en particulier lorsque les étapes précédant le séquençage ne sont pas réalisées dans des conditions rigoureuses. Ainsi, le premier séquençage à haut débit d'une banque construite à partir d'un échantillon néanderthalien (Green *et al.*, 2006) a été largement contaminé par des séquences d'ADN humain moderne, avec de 40% à 78% des lectures attribuées aux primates appartenant à *Homo sapiens sapiens* (Wall & Kim, 2007; Green *et al.*, 2008).

2.4. Les apports de la paléogénétique

La paléogénétique a été utilisée pour répondre à un grand nombre de questions portant sur l'Histoire et la Préhistoire. En donnant accès à des séquences d'ADN d'espèces ou de populations disparues, cette discipline permet d'éclaircir des phylogénies et de mieux comprendre comment sont nées et ont évolué les espèces du Pléistocène. Elle a permis d'identifier des restes humains et de clore des polémiques parfois vieilles de plusieurs siècles. L'information génétique permet de plus de caractériser l'espèce ou le genre d'un vestige dont la morphologie n'est pas assez informative.

2.4.1. Identification de vestiges

2.4.1.1. *Au niveau spécifique*

Tous les vestiges osseux ne sont pas identifiables sur le plan paléontologique. En effet, les échantillons trop abîmés, ou certains os dont la morphologie est peu exploitable, ne permettent pas aux paléontologues de déterminer l'espèce ou le genre auquel appartient l'échantillon. L'analyse génétique sans *a priori* des échantillons dont l'identification est douteuse peut permettre de les assigner à une espèce (Blow *et al.*, 2008).

La détermination du genre auquel appartient un échantillon est plus difficile. En effet, les marqueurs utilisés sont des fragments de gènes présents uniquement sur le chromosome Y (SRY), ou des sites polymorphiques entre les gènes homologues présents sur le chromosome X et le chromosome Y (amélogénine). Il faut donc que l'ADN soit suffisamment conservé pour que l'amplification de séquences nucléaires soit possible de manière robuste.

Jusqu'à présent, les études de détermination du genre ont principalement porté sur des vestiges humains historiques ou protohistoriques (Gamba *et al.*; Luptakova *et al.*; Kuch *et al.*, 2007).

2.4.1.2. *Au niveau individuel*

De manière épisodique, la paléogénétique s'est également intéressée à des personnages historiques, dont la tombe a, ou aurait, été retrouvée. Ainsi, des analyses génétiques menées sur les restes attribués à Pétrarque ont montré que le squelette était composite, car le crâne provenait d'un homme alors que les éléments post-crâniens appartenaient à une femme (Caramelli *et al.*, 2007).

Les restes de la famille Romanov (Gill *et al.*, 1994; Ivanov *et al.*, 1996), de Jesse James (Stone *et al.*, 2001), de Nicolas Copernic (Bogdanowicz *et al.*, 2009) ont pu être authentifiés. Par ailleurs, l'ADN ancien a pu montrer que Carl Wilhelm Naundorff n'était pas le jeune prince Louis XVII (Jehaes *et al.*, 1998), que les restes attribués à Sainte Brigitte et à sa fille Katarina appartenaient à des personnes non apparentées (Nilsson *et al.*).

2.4.2. Reconstitution de phylogénies

Grâce à leur étude génétique, de nombreuses espèces disparues ont pu être replacées dans des phylogénies. Elles appartiennent généralement à la faune du Pléistocène, qui disparaît à la fin de cette ère, ou au début de l'Holocène (Hofreiter & Stewart, 2009). On peut citer le mammouth (Hagelberg *et al.*, 1994; Hoss *et al.*, 1994; Hauf *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996; Ozawa *et al.*, 1997; Noro *et al.*, 1998; Barriel *et al.*, 1999; Greenwood *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2000; Debruyne *et al.*, 2003; Krause *et al.*, 2006; Rogaev *et al.*, 2006), l'ours des cavernes (Hanni *et al.*, 1994; Loreille *et al.*, 2001a; Orlando *et al.*, 2002; Willerslev *et al.*, 2009), le rhinocéros laineux (Willerslev *et al.*, 2009), l'hyène des cavernes (Rohland *et al.*, 2005), le bison des steppes (Shapiro *et al.*, 2004), le lion des cavernes (Barnett *et al.*, 2009) et le mégacéros (Hughes *et al.*, 2006).

Les autres espèces étudiées appartiennent souvent à la faune de l'hémisphère sud qui s'est éteinte lors de la première arrivée de l'Homme dans ces régions, ou lors de la conquête par les européens. En particulier, les moas ont été extensivement étudiés. Ce genre regroupe des oiseaux de la famille des ratites qui sont incapables de voler et qui se sont éteints lorsque les premières populations humaines, les Maoris, sont arrivés sur l'île. En effet, la manière dont s'est effectuée la divergence des lignées de ce genre permet d'éclaircir l'ordre dans lequel les continents se sont séparés à partir du Gondwana (Cooper *et al.*, 1992; Cooper *et al.*, 2001).

2.4.3. Étude en génétique des populations

Lorsque la quantité d'échantillons disponibles pour des études de paléogénétique est suffisamment importante, il devient possible d'étudier la diversité génétique des populations animales du Pléistocène et de l'Holocène (Hofreiter *et al.*, 2004b). Lorsque les espèces sont éteintes, l'analyse de l'ADN ancien est la seule manière d'avoir accès à la structure génétique des populations d'espèces disparues. De cette façon, la paléogénétique permet de répondre à certaines des interrogations concernant les extinctions d'espèces comme l'ours des cavernes (Stiller *et al.*, 2010) ou le mammouth (Barnes *et al.*, 2007; Debruyne *et al.*, 2008; Gilbert *et al.*, 2008a).

Les espèces qui ont subsisté jusqu'à présent portent encore la trace génétique des conséquences des variations climatiques du Pléistocène : durant les périodes de glaciation, les espèces de climat tempéré se réfugiaient dans les régions chaudes (refuges climatiques ibérique, italien, balkanique, ou des Carpates). Pendant les périodes plus chaudes, les espèces de climat froid se réfugiaient dans des refuges plus rigoureux (Scandinavie, montagnes alpines). En donnant accès à la structure génétique des populations avant la dernière glaciation, la paléogénétique permet d'affiner ce modèle.

L'ours brun est une espèce modèle pour l'étude des dynamiques de populations durant les périodes glaciaires. La population actuelle est ségrégée génétiquement en deux lignées, l'une orientale et l'autre occidentale. La première correspond à des populations présentes en Europe centrale, orientale et du Nord (Roumanie, Slovaquie, Finlande, Suède, Estonie, Russie), qui se seraient réfugiées durant le Dernier Maximum Glaciaire dans le Caucase et les Carpates. La seconde se trouve aujourd'hui en Europe occidentale et du Sud (Roumanie, Slovénie, Croatie, Grèce, Italie, France, Bulgarie) et se serait réfugiée sur la Péninsule Ibérique (Saarma *et al.*, 2007). L'étude d'échantillons datant du Pléistocène a permis d'enrichir cette représentation : en effet, des haplotypes appartenant à la lignée orientale ont été retrouvés en Espagne. Ainsi, avant le Dernier Maximum Glaciaire, la population d'ours brun était moins structurée qu'aujourd'hui (Valdiosera *et al.*, 2007; Valdiosera *et al.*, 2008), ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle cette accident climatique aurait isolé les populations d'ours les unes des autres.

D'autres espèces comme le bison (Shapiro *et al.*, 2004), ou les espèces ayant été domestiquées (Hardy *et al.*, 1995; Vila *et al.*, 2001; Larson *et al.*, 2005; Beja-Pereira *et al.*, 2006; Lira *et al.*, 2010) ont été étudiées.

3. LES GROTTES D'OU PROVIENNENT LES ECHANTILLONS ETUDIES.

Parce que la température y est fraîche et constante, les grottes sont les sites archéologiques où l'ADN ancien se conserve le mieux en milieu tempéré. Les échantillons étudiés lors de cette thèse proviennent de trois sites : la Grotte Chauvet-Pont d'Arc, la Grotte des Deux-Ouvertures en Ardèche, et la Grotte Coumère en Ariège.

3.1. Présentation générale des grottes des Gorges de l'Ardèche

Le Bas-Vivarais est une région située au sud de l'Ardèche, composée d'un plateau calcaire qui forme la bordure méridionale du Massif Central. Au niveau des Gorges de l'Ardèche, ce calcaire est de type urgonien (Clottes, 2001).

Comme toutes les structures karstiques, cette région possède un réseau hydrographique complexe, qui a creusé les Gorges, mais également de nombreuses grottes et gouffres (comme l'Aven d'Orgnac). Des structures remarquables ont été formées par le passage de l'Ardèche, dont le Pont d'Arc, une arche creusée dans le pédoncule d'un méandre abandonné de la rivière, à l'entrée des Gorges (Figure 20).

La présence d'un grand nombre de cavités a permis à des ours des cavernes de s'installer dans la région. Dans les environs immédiats de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc (c'est-à-dire la vallée de l'Ibie, partie amont des Gorges et Cirque d'Estre), quinze grottes à ours ont été répertoriées (Philippe, 2005). Quelques-unes de ces grottes, riches en composés organiques liés à la putréfaction des corps d'ours, ont été exploitées comme phosphatières à la fin du XIX^{ème} siècle. Outre *U. spelaeus*, un assemblage contenant des restes d'*U. deningeri* a été mis en évidence à la Grotte des Fées (Ballesio *et al.*, 2003), ainsi que des restes d'*U. arctos* datant de l'Holocène (Grotte Bodine). Cette région a donc été occupée par des Ursidés durant des dizaines de milliers d'années.

Cette région a également connu une occupation humaine, qui a commencé à Orgnac il y a environ 300 000 ans. La plupart des sites contenant des témoignages de la présence humaine

durant la préhistoire sont situés dans les grottes, très nombreuses. La Grotte Chauvet-Pont d'Arc est la plus importante des grottes ornées de la région. Une vingtaine d'autres sites dans les Gorges portent des traces d'occupations humaines datées de 37 000 à 12 000 ans BP. Certaines cavités ne sont ornées que de gravures (Grotte d'Ebbou, du Figuier, Huchard, première salle de la Grotte d'Oulen) et ne sont donc pas datables.

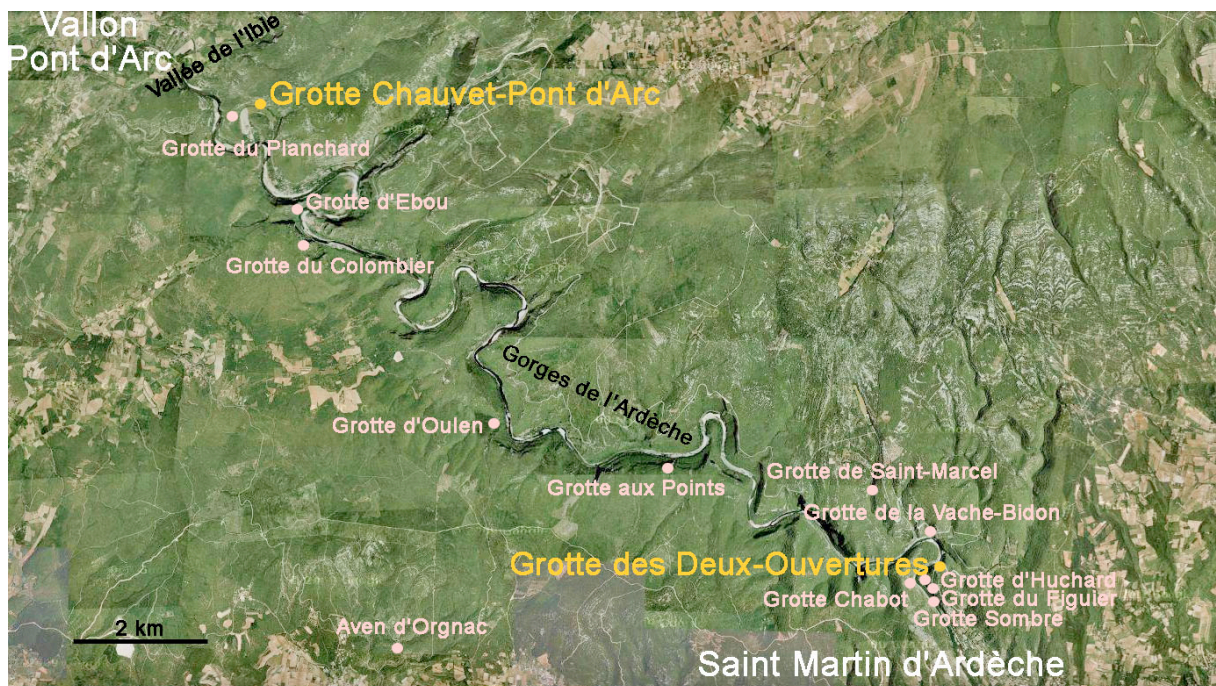


Figure 20 : Les Gorges de l'Ardèche. Les deux grottes ayant fournis les échantillons d'ours étudiés lors de cette thèse sont indiquées en jaunes. Les autres grottes ornées sont indiquées en rose.

Les Gorges abritent quelques sites moustériens récents, avec les sites de la Grotte Saint-Marcel (30 000-23 000 ans BP) et de Lagorce (42 000 – 40 500 BP).

En dehors de Chauvet, les sites aurignaciens (37 000-29 000 ans BP) sont rares : il s'agit de la Grotte du Figuier, de l'abri des Pêcheurs (Vallée du Chassezac) daté par une sagaie à 29 800 ans. Dans la région, d'autres sites sont attribués à cette période sur des arguments stylistiques : Baume Latrone (Gorges du Gardon), Grotte aux Points, Bergerie de Charmasson.

Au Gravettien (29 000-23 000 ans BP), les sites sont plus nombreux : six des grottes de l'Ardèche présentent des niveaux archéologiques se rattachant à cette période. C'est également le cas des niveaux les mieux conservés de la grotte d'Oulen. Des sites de plein air, comme le site du Bouzil, ont livré des traces d'occupation.

Le Solutrén (23 000-18 000 BP) est particulièrement bien représenté dans les Gorges, puisqu'une dizaine de sites sont répertoriés pour la phase la plus ancienne de cette période. Parmi les grottes ornées datées ou attribuées au Solutrén se trouvent les grottes de la Vache-Bidon, les Deux-Ouvertures, la grotte Sombre et la seconde salle d'Oulen.

Une soixantaine de sites, représentatifs de la culture magdalénienne (de 17 000 ans BP jusqu'à la fin du Paléolithiques), ont été inventoriés en Ardèche, dont quelques-uns correspondent à des cavités décorées : gravure de bison à Ebbou, de bouquetins et d'aurochs au Colombier et une silhouette féminine à la grotte du Planchard.

3.2. *La Grotte Chauvet-Pont d'Arc*

3.2.1. Découverte de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc

Le 18 décembre 1994, lors d'une prospection spéléologique, Eliette Brunel, Jean-Marie Chauvet et Christian Hillaire sont attirés par un filet air qui émane d'un trou s'ouvrant sur la falaise surplombant le Cirque d'Estre. Ils dégagent l'entrée d'une cavité et pénètrent dans une grande salle aux concrétions abondantes (Figure 21). Progressant dans la grotte, ils découvrent d'autres salles. C'est sur le chemin du retour qu'Eliette Brunel a le regard attiré par un petit dessin rouge de mammoth : pendant la Préhistoire, les hommes sont venus dans cette grotte et l'ont ornée. Quelques jours plus tard, les inventeurs déclarent leur découverte auprès de la Direction Régionale des Affaires Culturelles, qui dépêche Jean Clottes pour authentifier les peintures. La découverte est révélée au public un mois après l'entrée des trois inventeurs dans la grotte, le 18 janvier 1995.

3.2.2. La protection d'un patrimoine unique au monde.

Dès la découverte, cette grotte a fait l'objet de protections particulières. Les inventeurs ont recouvert de lacs de plastique noir le trajet qu'ils ont emprunté, afin qu'en dehors de cette zone sacrifiée, le paléo-sol soit conservé.

À partir du classement de la grotte aux Monuments Historiques en 1995, un important travail de conservation est engagé. L'entrée des inventeurs est agrandie, fermée d'une porte blindée surveillée par un système de vidéo-surveillance. Le cheminement de plastique posé sur le sol

est remplacé par un réseau de passerelles en matériel inoxydable, constitué d'éléments fixes et mobiles permettant l'évolution du réseau au gré des questions scientifiques.

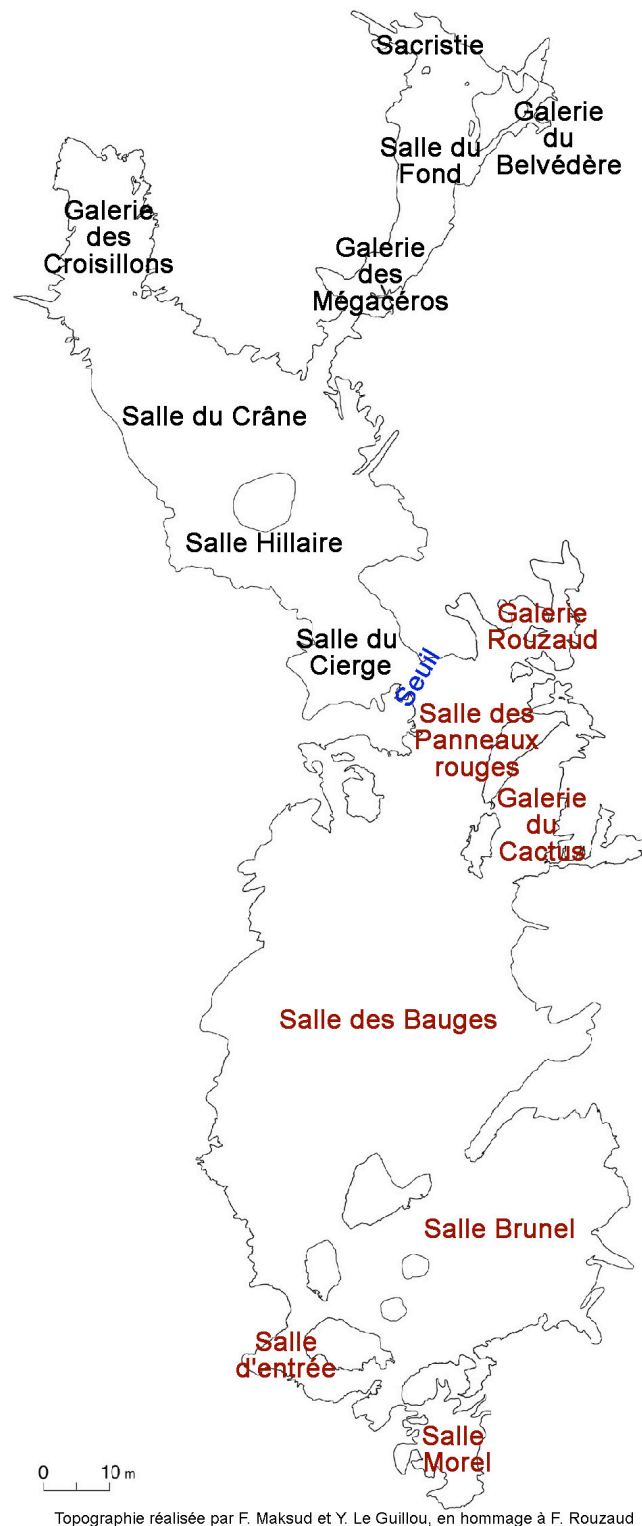


Figure 21 : Topographie de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc. Topographie réalisée par F. Maksud et Y. Le Guillou, en hommage à F. Rouzaud.

Par ailleurs, la climatologie de la grotte est examinée en détail grâce à des appareillages installés dans différentes salles et mesurant l'hygrométrie, la température de l'air, du sol et des parois, le taux de dioxyde de carbone et de radon (Baffier, 2005). L'entrée dans la grotte est strictement limitée afin d'éviter les dégâts occasionnés à Lascaux par un nombre élevé de visiteurs.

Ces mesures exceptionnelles de préservation ont permis de conserver la grotte dans l'état où elle était lorsqu'elle s'est fermée, à la fin du Paléolithique.

3.2.3. Les représentations artistiques de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc

La Grotte Chauvet-Pont d'Arc est renommée pour les représentations artistiques exceptionnelles qu'elle recèle. Celles-ci sont réalisées avec des pigments organiques (charbon de bois) ou minéraux (ocres rouge et jaune). Des gravures, effectuées au doigt ou avec un outil sur la surface légèrement argileuse, sont également présentes. Certaines des peintures mêlent dessin, estompe et gravure pour relever les détails les plus marquants de l'animal (Tosello & Fritz, 2005).

Près de l'entrée, la plupart des dessins sont effectués avec des pigments rouges (Figure 21). Cette partie a de ce fait été appelée Secteur Rouge. Après le Seuil, ce sont les dessins effectués au charbon de bois qui deviennent les plus fréquents : c'est le Secteur Noir. Malheureusement, le pigment rouge n'étant pas datable, il est difficile d'obtenir une chronologie dans l'ornementation des deux secteurs.

Malgré tout, plusieurs arguments montrent que les dessins ont été réalisés en plusieurs phases (Feruglio & Baffier, 2005). Dans le Secteur noir, on observe souvent que les premiers dessins effectués au charbon de bois ont été effacés par un raclage de la paroi. Dans un second temps, des dessins au charbon, effectués avec estompe, sont réalisés. Les dessins de la première phase ont pu être griffés par les ours. Certains dessins noirs recouvrent des dessins rouges, ce qui suggère que les plus anciens dessins ont été réalisés à l'aide de pigments minéraux.

Les animaux représentés sont majoritairement des animaux rares et dangereux : mammouths (66 représentations), Rhinocéros (65 représentations) et Félidés (75 représentations)

forment plus de 60% des animaux attestés. Il s'agit d'une originalité propre à Chauvet, mais qui pourrait être une des caractéristiques de l'art aurignacien. Des parallèles existent en effet avec d'autres sites de la même période, comme la Grande Grotte d'Arcy sur Cure et la Baume-Latrone. Les statuettes en ivoire du Jura souabe, datées de l'Aurignacien, représentent des êtres chimères mi-homme, mi-lion.

Les autres animaux représentés à Chauvet-Pont d'Arc sont le cheval, les bovinés, les cervidés, le bouquetin, l'ours des cavernes, le bœuf musqué, ainsi qu'une chouette. Quelques représentations très particulières sortent du lot comme celle d'un être chimère mi-femme, mi-bison. Des symboles ressemblant à des insectes sont également présents, ainsi que des mains négatives et positives et des représentations symboliques.

Les dessins effectués au charbon de bois, ainsi que certains mouchages de torche et des charbons provenant de foyers, ont pu être datés par la méthode du radiocarbone. Deux périodes de présence humaine ont été mises en évidence : une période aurignacienne (de 30 000 BP à 32 000 BP) qui concentre 80% des dates obtenues et une période gravettienne (de 25 000 BP à 27 000 BP) (Valladas *et al.*, 2001; Cuzange *et al.*, 2007). Les représentations datées de l'Aurignacien font des peintures de Chauvet-Pont d'Arc les plus anciennes actuellement connues.

3.2.4. Les occupations humaines de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc

Outre les peintures et les gravures, de nombreuses traces d'occupation humaine sont répertoriées dans la Grotte Chauvet-Pont d'Arc.

Le sol de la cavité est parfois recouvert d'une banquette d'argile, qui a permis d'enregistrer le passage des hommes et des animaux dans la grotte (Garcia, 2005). En particulier, entre la Salle du Crâne et le fond de la Galerie des Croisillons, se trouve une piste longue d'environ 70 m. La mesure des empreintes a permis de déterminer qu'elle avait été faite par un enfant, probablement un garçon. Il a régulièrement mouché sa torche au-dessus de son cheminement, en laissant des traces noires. L'analyse des charbons date son passage au cours de la seconde phase d'occupation de la grotte, il y a 25 500 ans BP.

La fréquentation humaine est également attestée par la présence de nombreux foyers, conservés dans la partie terminale de la grotte. Les foyers les plus riches sont répertoriés dans

la Galerie des Mégacéros où ils sont disposés le long de la paroi gauche. Ces charbons ont été datés à environ 32 000 ans BP et auraient servi à la réalisation des dessins de la Galerie des Mégacéros, des Salles Hillaire, du Fond et du Crâne (Clottes, 2001). Ils proviennent tous de pins sylvestres, ce qui témoignerait d'une utilisation préférentielle de cette espèce par les populations humaines (Théry-Parisot & Thiébault, 2005).

De plus, une vingtaine de silex ont été retrouvés sur le sol et dans l'épaisseur des sédiments, à la faveur d'un sondage conduit dans la Salle Hillaire. Outre des produits de débitage, les pièces retrouvées et examinées sont un burin, un fragment de pièce à dos sur une petite lame, une lame à retouche continue et une lamelle de coup de burin.

Parmi les huit pièces de silex récoltées dans la grotte, seules quatre d'entre elles portaient des traces d'utilisation pour la découpe de chair ou de peau, ou la préparation des parois (Plisson, 2005). Une pointe de projectile en ivoire, retrouvée dans la Galerie des Mégacéros, ressemble à d'autres pointes aurignaciennes de projectile connues ailleurs en Europe (Geneste, 2005).

Par ailleurs, certains ossements d'ours des cavernes, répandus sur le sol, ont été manipulés par les hommes. Un crâne d'ours a été déposé sur un bloc au milieu de la Salle du Crâne, par-dessus des charbons datés de 32 000 BP environ (Valladas *et al.*, 2001). Cette salle contient également une très forte concentration de crânes d'ours des cavernes, laissant suspecter une action anthropique. Deux humérus d'ours près de l'entrée et une côte dans la Galerie du Cactus pourraient avoir été plantés verticalement par l'homme.

3.2.5. Les occupations animales

En plus des vestiges humains, la grotte contient un grand nombre de traces de présence animale. Plus de 4 000 ossements ont été retrouvés éparpillés sur le sol, pour la plupart dans l'éboulis d'entrée, dans la Salle Hillaire et dans la Salle du Crâne (Fosse & Philippe, 2005). Les amas osseux sont rares et la plupart des locii contenant des os se limitent à quelques unités osseuses.

Les restes squelettiques ne sont pas les seules traces de la présence animale dans la cavité, car la grotte contient également des empreintes de pattes, des coprolithes, qui témoignent que les animaux ont vécu dans la cavité.

Parmi les indices de la présence animale dans la Grotte Chauvet-Pont d'Arc, la plupart se rapportent à l'ours des cavernes. 3 700 ossements, sur les 4 000 découverts en surface, appartiennent à cette espèce, et les traces de son passage peuvent être retrouvées dans toutes les salles de la cavité.

3.2.5.1. L'ours des cavernes

3.2.5.1.1. Les éléments osseux

Plus de 130 locii contenant des os d'ours des cavernes ont pu être répertoriés et sont répartis dans toute la grotte.

À l'entrée, dans l'éboulis, la représentation squelettique est comparable à celle obtenue dans le cadre d'une désintégration *in situ*. Les segments distaux sont en plus faible proportion qu'attendue, ce qui est vraisemblablement dû à la topographie du sol, qui facilite leur dispersion.

Dans le reste de la grotte, les éléments volumineux sont sur-représentés par rapport aux éléments de plus petite taille. Les éléments plats sont rares dans les secteurs ayant pu être modifiés par des agents abiotiques, comme l'eau. Peu d'éléments en connexion anatomique sont présents, ce qui laisse penser que les ours ont fréquenté la grotte pendant une longue période, déplaçant les vestiges de leurs congénères. Les 3700 ossements représentent un nombre minimal de 190 individus.

Toutes les salles de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc ne conservent pas de la même manière les échantillons. Sur les sols argileux, comme la Salle des Bauges et la Galerie des Mégacéros, les ossements sont apparemment moins bien préservés que dans les salles calcitées où l'os est recouvert d'une gaine de calcite. L'analyse physico-chimique du collagène montre que les diverticules étroits sont peu favorables à la conservation de la matière organique.

Une série de datations effectuées sur huit échantillons osseux d'ours des cavernes ont montré que la plupart des spécimens datent de 28 800 à 30 700 ans BP. Une mandibule, située dans la Salle des Panneaux Rouges, remonte à 37 400 ans BP (Bocherens *et al.*, 2006).

Les conditions de préservation de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc limitent le prélèvement des échantillons osseux, ainsi que leur manipulation. De plus, la présence d'une épaisse couche de calcite gêne les mesures anatomiques qui permettent la détermination spécifique.

Ces limites entravent l'analyse démographique des ours des cavernes. Malgré tout, des mesures effectuées sur 55% des crânes montrent que les femelles sont prédominantes. Comme les fouilles en stratigraphie sont limitées et que les restes d'ours sont rarement présents sur le paléosol, la structure d'âge de la population reste inconnue.

3.2.5.1.2. Les traces de vie

En plus de leurs ossements, les ours ont laissé de nombreuses preuves de leur vie et de leur hibernation dans la cavité (Figure 22 et Figure 23).

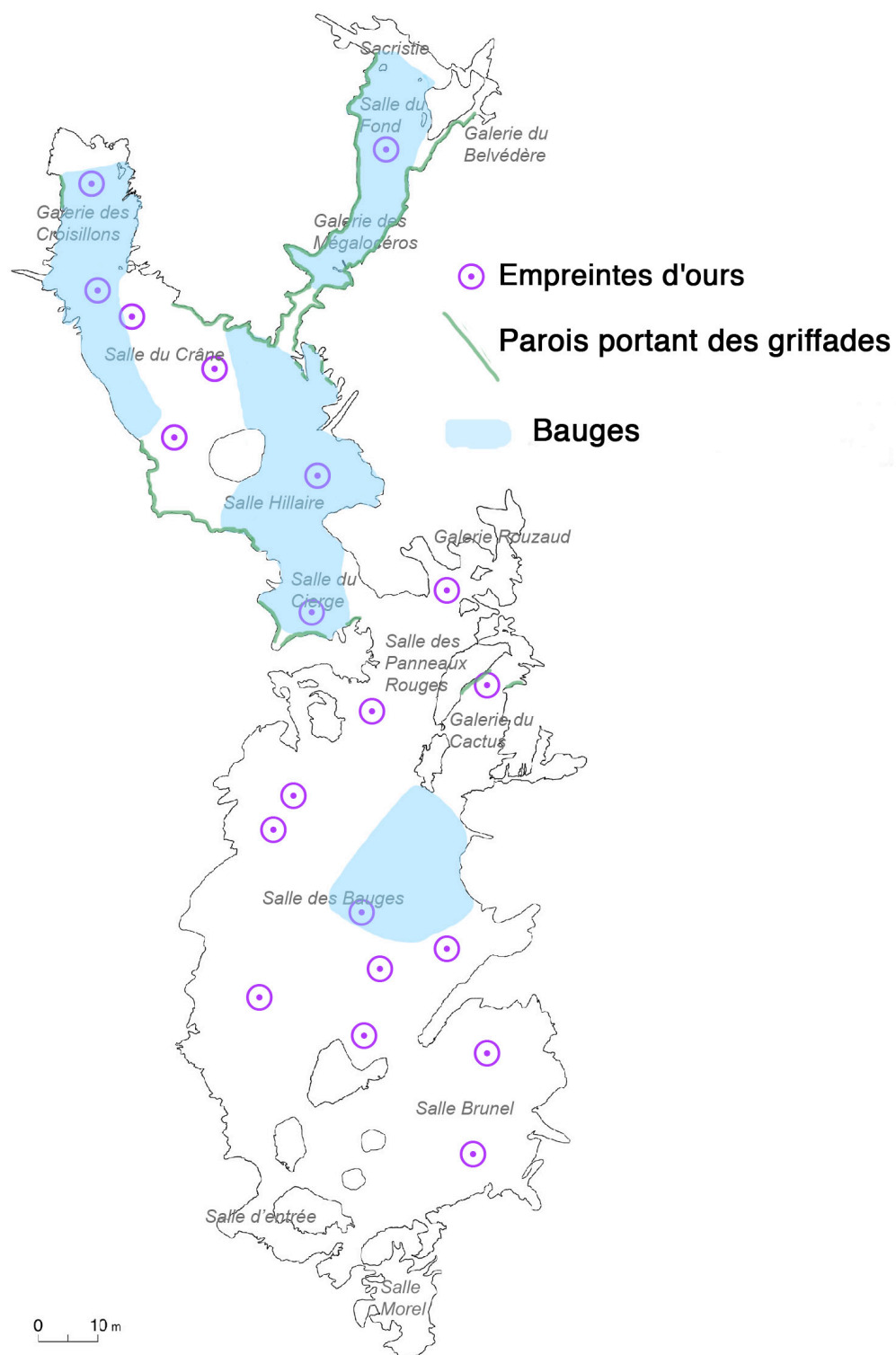


Figure 22 : Emplacement des bauges, griffades et empreintes laissées par les ours des cavernes dans la Grotte Chauvet-Pont d'Arc. Topographie réalisée par F. Maksud et Y. Le Guillou, en hommage à F. Rouzaud.

Le sol de la grotte est recouvert d'environ 300 bauges, des dépressions creusées par les ours pour y hiberner. Ces bauges sont de taille relativement modeste avec un diamètre généralement inférieur à 50 cm. Elles sont présentes dans plusieurs secteurs de la grotte. La

Salle des Bauges, qui leur doit son nom, en contient une cinquantaine. Dans la Salle Hillaire, la Salle du Crâne et la Galerie des Croisillons, la plupart des bauges sont situées sur une banquette d'argile. Des bauges sont également présentes dans la Salle du Fond.

Sur les parois à proximité des bauges, les ours ont laissé des griffades. Si leur localisation correspond globalement avec celle des bauges, les griffades sont beaucoup plus nombreuses dans le fond de la cavité, à partir de la Galerie du Cierge. Elles peuvent couvrir de grandes surfaces, comme à l'ouest de la Salle Hillaire et dans la Salle du Fond, et sont généralement situées à une hauteur comprise entre 1,50 m et 2 m. Elles recouvrent parfois des dessins, ou ont pu être partiellement effacées par les artistes qui ont orné la grotte.

La raison de ces griffades est encore mal connue. Les ours auraient pu chercher à aiguiser leurs griffes pour creuser des bauges plus efficacement. L'hypothèse d'un marquage par l'odeur est également envisagé (Philippe & Fosse, 2003).

En se déplaçant, les ours ont également laissé des empreintes sur les sols argileux de la cavité. Dans la Salle Brunel et la Salle des Bauges, ces empreintes forment des pistes qui peuvent être intégralement suivies et appartiennent aux plus longues pistes connues en grottes (Garcia, 2005). En revanche, dans les parties les plus profondes, les traces sont trop entremêlées pour que l'on arrive à distinguer des pistes. De manière émouvante, un ours a posé sa patte boueuse sur une paroi, près d'un dessin, laissant une trace de son passage.

En circulant dans les parties les plus sombres de la cavité, les ours se sont guidés en longeant les parois. Le passage répété des animaux a poli le bas des parois et les rebords des anfractuosités.

La multiplicité des témoignages de la présence d'ours des cavernes dans la Grotte Chauvet-Pont d'Arc fait de celle-ci une grotte à ours typique, et sans doute la plus importante des Gorges de l'Ardèche.

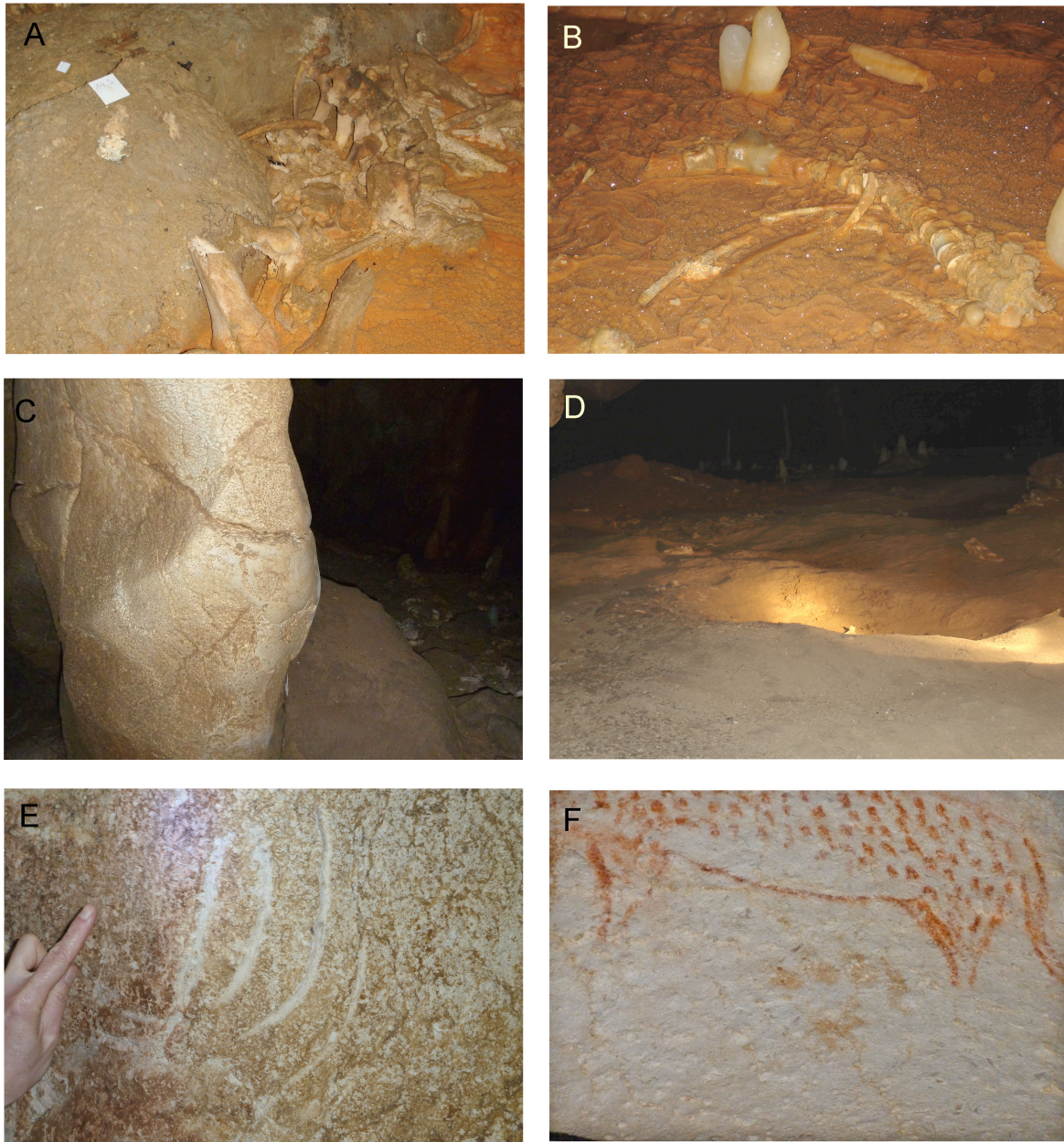


Figure 23 : Les traces d'occupation de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc par les ours des cavernes. **A** : amas d'ossements dans la Salle du Crâne. **B** : colonne vertébrale en connection anatomique (Galerie des Croisillons). **C** : poli d'ours (Galerie des Mégacéros). **D** : une des bauges de la Salle des Bauges. **E** : griffade d'ours (Galerie des Mégacéros). **F** : empreinte d'ours, sur le Panneau de la Panthère (Salle des Bauges). © MCC, CNP Périgueux

3.2.5.2. *Les autres occupations animales*

De nombreux animaux ont été répertoriés dans la Grotte Chauvet-Pont d'Arc. Outre l'ours des cavernes, des restes de loup, de renard, de martre, de bouquetin, etc., ont été retrouvés sur le paléo-sol (Tableau 1).

	Nombre de restes	Nombre minimal d'individus
<i>Ursus spelaeus</i>	4044	190
<i>Ursus arctos</i>	1	1
<i>Panthera pardus</i>	2	1
<i>Felis silvestris</i>	1	1
<i>Canis lupus</i>	6	1
<i>Vulpes vulpes</i>	36	2
<i>Crocuta crocuta</i>	2	1
<i>Capra ibex</i>	73	8
<i>Capreolus capreolus</i>	15	3
<i>Cervus elaphus</i>	1	1
<i>Bos/Bison</i>	3	1
<i>Equus caballus</i>	2	1

Tableau 1 : Cortège faunique du Pléistocène, de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc (d'après Philippe & Fosse 2005).

Le loup est connu grâce à deux crânes, dont l'un est gracile et pourrait provenir d'une femelle, tandis que le second est beaucoup plus robuste. Des éléments d'os long et une hémimandibule, ainsi qu'un métatarse, une phalange et deux vertèbres ont été retrouvés dans l'Entrée et dans sa Salle des Panneaux Rouges. Le loup a également déposé plusieurs coprolithes à divers endroits de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc et a laissé des empreintes de pattes.

Les Carnivores sont également représentés par un squelette presque complet de renard roux, quelques restes de panthère, de chat sauvage, d'hyène des cavernes, ainsi que par plusieurs squelettes de mustélidés datant vraisemblablement de l'Holocène.

Parmi les Artiodactyles, la Grotte Chauvet-Pont d'Arc présente un certain nombre de restes de bouquetins, y compris un magnifique crâne de mâle. Quelques empreintes sont également visibles dans la partie profonde de la Grotte. Des os de chevreuil sont trouvés à l'entrée. Comme ils ne sont pas fossilisés, ils pourraient dater de l'Holocène. Le cheval n'est représenté que par une molaire et l'extrémité distale d'un métapode et aurait pu être apporté dans la grotte par un charognard. On retrouve également la trace de la présence de bovidés et de cervidés.

Quelques restes d'oiseaux et de rongeurs sont également présents. Les restes de chauve-souris sont fréquents. Quelques tronçons d'un squelette de couleuvre ont été retrouvés.

3.3. *La Grotte des Deux-Ouvertures*

3.3.1. Découverte de la Grotte des Deux-Ouvertures

Contrairement à la Grotte Chauvet-Pont d'Arc, la Grotte des Deux-Ouvertures est connue depuis longtemps : dès 1893, on signalait dans les galeries d'entrée des vestiges attribués à la Préhistoire récente. Cette cavité, située à la sortie des Gorges de l'Ardèche, s'ouvre dans la falaise urgonienne, à une vingtaine de mètres au-dessus du lit de l'Ardèche. Son nom lui vient de l'existence de deux entrées, l'une située à l'Est et l'autre à l'Ouest (Figure 24).

La partie profonde du réseau n'a été découverte qu'en 1985 lorsque F. Landraud, C. Hillaire, M. Verdon et F. Monteil ont creusé un boyau dans le sol sous le bouchon calcitique qui fermait la galerie. Dans la galerie située de l'autre côté, ils ont découvert des ossements en grand nombre, ainsi que des gravures attribuées au Paléolithique.

Une première campagne de prospection a débuté en 1987, sous la direction de Bernard Gély et de Jean-Louis Porte. Elle a eu pour objet de relever des figures les plus évidentes, d'établir la topographie de la grotte et de débiter un sondage. Malheureusement, ces études furent ensuite interrompues. La grotte fut classée au titre des Monuments Historiques en 1990.

De nouvelles recherches ont débuté en 2005, sous la direction de Michel Philippe. Les objectifs de ces analyses étaient multiples. Cette cavité possède, comme la Grotte Chauvet-Pont d'Arc, de l'art pariétal et des traces de présence humaine, datant du Paléolithique. De plus, elle est un gisement très riche d'ossements d'ours des cavernes. La grotte étant soumise à des restrictions moins drastiques que la Grotte Chauvet-Pont d'Arc, il est possible de manipuler les échantillons qui s'y trouvent, afin d'étudier les caractéristiques anatomiques des populations ursines des Gorges de l'Ardèche.

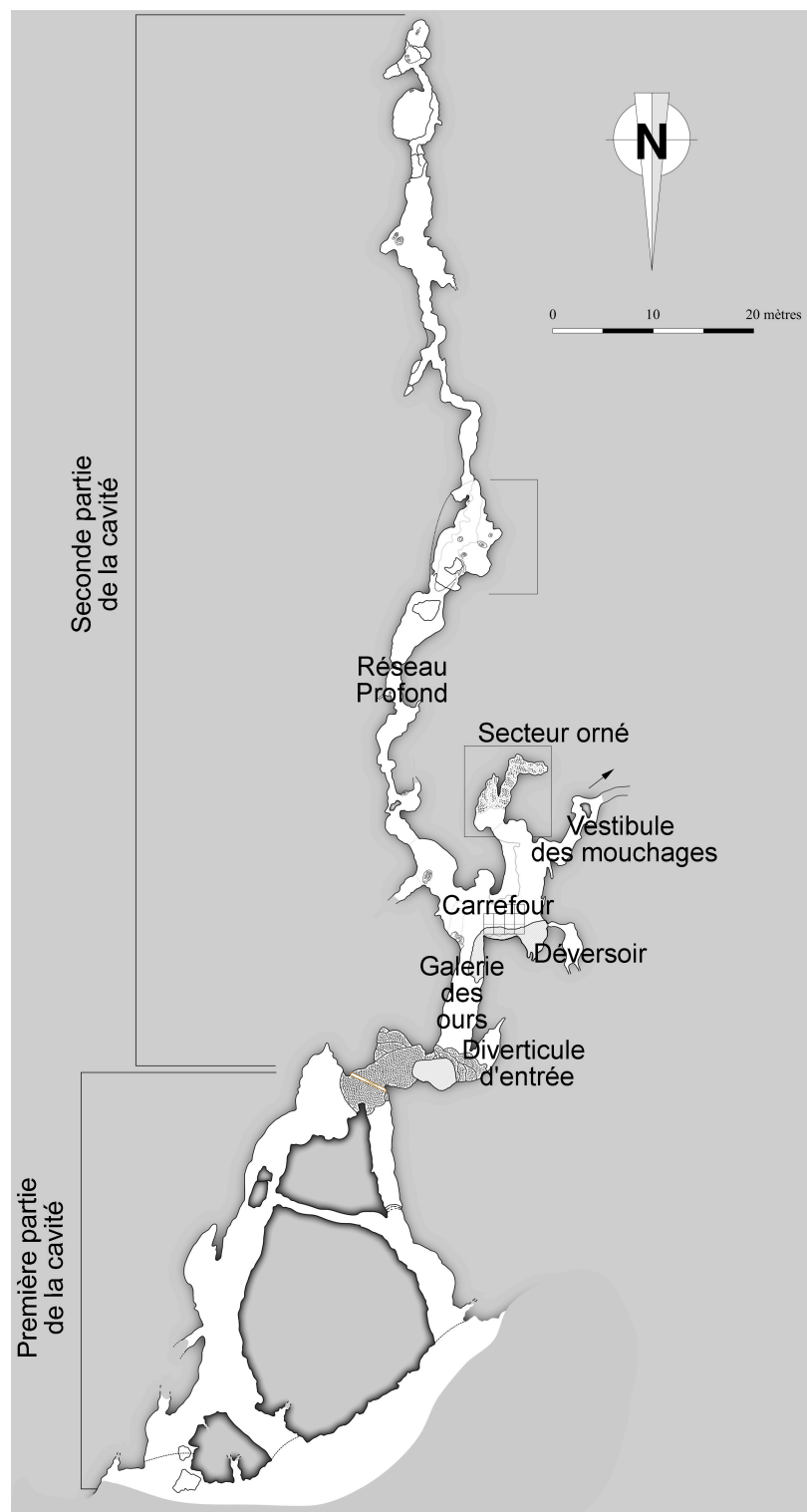


Figure 24 : Topographie de la Grotte des Deux-Ouvertures, d'après (Philippe, 2009).

3.3.2. Les occupations humaines dans la Grotte des Deux-Ouvertures

Avec la découverte de la partie profonde de la grotte en 1985, les archéologues ont mis en évidence plusieurs indices d'occupation humaine au Paléolithique supérieur.

Le secteur orné est une galerie, située à quelques mètres du Carrefour, recouverte de gravures attribuées au Solutrén ancien (Gély & Porte, 1996). D'autres gravures, en dehors du Secteur orné, ont également été observées (Philippe, 2007). Elles représentent majoritairement des mammoths (19) et des aurochs (13), ainsi que deux bouquetins, un félin, un bison et un équidé. Les humains sont également présents, sous forme de triangles pubiens, d'une figure féminine et d'un être composite (Monney, 2010).

La présence humaine est également attestée par l'existence de nombreux mouchages de torches.

Par ailleurs, deux ossements humains ont été mis en évidence dans ce secteur orné. Ces ossements sont manifestement en position déplacée (Philippe, 2009) et l'un d'entre eux, un radius, se situe à moins d'un mètre des gravures.

D'autres éléments, comme un crâne d'ours brun, pourraient avoir été déplacés par l'homme.

3.3.3. Les occupations ursines dans la Grotte des Deux-Ouvertures

La Grotte des Deux-Ouvertures contient également un grand nombre de restes osseux animaux. L'omniprésence de l'ours des cavernes permet de la définir comme étant une grotte à ours, au même titre que la Grotte Chauvet-Pont d'Arc (Figure 25).

En effet, des fouilles archéologiques menées sur une surface de quelques mètres carrés au niveau du Carrefour ont permis de mettre en évidence une lentille fossilifère très riche en ossements d'ours des cavernes (Philippe *et al.*, 2009). En 1987, neuf m² ont été fouillés qui ont permis l'extraction d'une cinquantaine d'ossements. La reprise des fouilles en 2007 concernait deux carrés partiellement fouillés en 1987 et deux carrés vierges. Plus de 667 ossements d'ours des cavernes ont été recueillis pendant cette fouille de 2007. La plupart des éléments squelettiques correspondent à ceux de jeunes oursons. Des restes d'animaux adultes sont également présents, ainsi que des dents usées attribuées à des animaux âgés.

D'autres vestiges d'ours des cavernes ont été retrouvés sur le paléo-sol et dans l'effondrement d'entrée. L'un d'entre eux a permis une datation radiocarbone à 28 600 ans BP.

La grotte des Deux-Ouvertures se distingue également par la présence de nombreuses traces de passage des ours. En effet plusieurs bauges ont été relevées, ainsi que des polis d'ours et des griffades. Les bauges sont d'une taille assez modeste, qui correspond environ à celles relevées à Chauvet-Pont d'Arc. Certaines bauges sont superposées, ce qui complique la lecture de leur structure.

Les polis sont situés à environ 50 cm à 80 cm de hauteur, et sont répartis dans toute la cavité. Les griffades d'ours ne sont présentes que dans le réseau profond, principalement dans la Salle des Griffades, sur le placage argileux qui la recouvre.

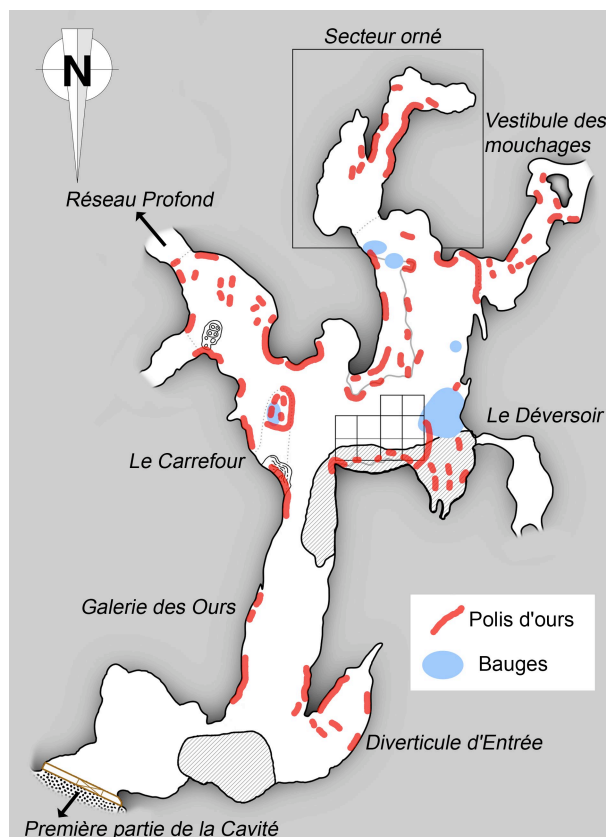


Figure 25 : Emplacement des bauges et des polis d'ours des cavernes dans la partie centrale de la Grotte des Deux-Ouvertures, d'après (Philippe, 2009). L'emplacement fouillé est matérialisé par le carroyage.

Outre l'ours des cavernes, des restes de loup, de renard, de bovinés, de cheval, de cerf élaphe, de bouquetin, ainsi que de la microfaune, ont également été mis en évidence. L'hyène des cavernes est représentée par quelques coprolithes identifiés dans le secteur fouillé.

3.4. *La Grotte de Coumère*

La Grotte de Coumère est située dans les Pyrénées, sur la Commune de Balaguère (Ariège). Elle a été découverte en 1995 par des spéléologues, qui en ont désobstrué l'entrée à l'aide d'explosifs.

Cette cavité contient une galerie longue de 50 m et large de 15 à 20 m, orientée dans un axe Est-Ouest. A l'extrémité, se trouve une galerie plus étroite (2-3 m) et plus basse, qui est orientée vers le Nord.

Comme les grottes de Chauvet-Pont d'Arc et des Deux-Ouvertures, la Grotte de Coumère a également servi de tanière à ours des cavernes. De nombreuses empreintes ont été enregistrées dans les deux galeries principale et annexe. Les restes d'ours des cavernes sont également présents en grande quantité.

De nombreux vestiges appartenant à l'hyène des cavernes ont aussi été observés sur le paléosol. Ils sont concentrés dans la galerie secondaire, étroite et basse, ce qui est en accord avec la préférence de cette espèce pour des tanières situées en fond de cavité. Ces vestiges sont des ossements et des coprolithes présents en très grande quantité. En particulier, un crâne, appartenant à un individu âgé et souffrant de pathologies dentaires, a été prélevé.

D'autres espèces ont été mises en évidence dans cette grotte. Une molaire témoigne de la présence de cerf élaphe. Un crâne d'Ursidé pourrait appartenir à un ours brun archaïque.

Partie 2 :

*Etude génétique des ours des cavernes des Gorges
de l'Ardèche*

1. SEQUENÇAGE DU GENOME MITOCHONDRIAL DE L'OURS DES CAVERNES

1.1. Introduction

Les Ursidés sont actuellement représentés par huit espèces réparties en trois sous-familles : les Ailuropodins, les Tremarctinidés et les Ursinés. Les Ailuropodins ne contiennent qu'une seule espèce, le panda, *Ailuropoda melanoleuca*. La position phylogénétique du panda roux est sujette à controverse. En effet, alors qu'elle a longtemps été considérée comme un membre de la famille des Ailuropodins, cette espèce appartiendrait plutôt aux Mustélidés (Sato *et al.*, 2009). Les Tremarctinidés sont actuellement représentés par une seule espèce, *Tremarctos ornatus*, et les Ursinés sont composés de *Melursus ursinus*, *U. arctos*, *U. maritimus*, *U. thibetanus*, *U. americanus*, *Helarctos malayanus*.

Des analyses phylogénétiques ont permis d'étudier les relations entre ces différentes espèces. Les premières ont porté sur des fragments du génome mitochondrial (Cytochrome b, ARNt thréonine et proline, ARN ribosomique 12S) et ont montré que les classifications qui définissent *A. melaneuloca* et *T. ornatus* comme des espèces ayant divergé anciennement des Ursinés (Zhang & Ryder, 1993; Talbot & Shields, 1996a), sont fondées.

Bien que la première étude phylogénétique place l'ours polaire au sein des Trémactinidés (Zhang & Ryder, 1993), au rebours de toutes les études de paléontologie, il est rapidement démontré que cette espèce se situe au sein de la variabilité inhérente à l'ours brun (Talbot & Shields, 1996a; b), ce qui fait d'*U. arctos* une espèce paraphylétique.

En revanche, les relations phylogénétiques entre les différentes espèces d'Ursinés se révèlent plus difficiles à éclaircir. Les premières études révèlent que les arbres phylogénétiques obtenus dépendent à la fois des séquences utilisées, des échantillons choisis et des méthodes de reconstitution (distance ou parcimonie) sélectionnées (Zhang & Ryder, 1993; 1994; Talbot & Shields, 1996a). Une étude a été effectuée sur différents gènes mitochondriaux (Cytochrome b, 16S, NADH-4, NADH-5 et Cox-II), ainsi que sur la région de contrôle mitochondriale en utilisant des algorithmes de reconstitution d'arbres phylogénétiques (maximum de parcimonie et de maximum de vraisemblance) (Waits *et al.*, 1999). Elle suggère que les difficultés pour résoudre la phylogénie des Ursinés sont causées par une

radiation rapide des lignées menant à *H. malayanus*, *U. thibetanus*, *U. americanus* et *U. arctos-U. maritimus*. Cette étude propose également que *M. ursinus* se trouve à la base des Ursinés et se soit individualisé avant la radiation.

Pour diversifier les sources d'ADN, l'équipe de Zhang a choisi de s'intéresser à des séquences nucléaires, en analysant des fragments de l'exon 1 du gène IRBP et de l'intron 1 du gène TTR (Yu *et al.*, 2004).

Les conclusions sont en accord avec celles déduites de l'analyse des séquences mitochondriales pour placer le panda à la base des Ursidés, et pour considérer *T. ornatus* comme un groupe adjacent aux Ursinés. Cependant, elles ne permettent pas de résoudre la radiation au sein des Ursinés, car les arbres obtenus avec chacun des deux gènes et par concaténation des données issues des deux jeux de données ne sont pas identiques.

Afin d'obtenir une quantité d'information suffisante pour discriminer l'ordre dans lequel les différentes lignées ursines se sont individualisées, la même équipe s'est ensuite tournée vers les génomes mitochondriaux complets qu'elle a séquencés chez toutes les espèces d'ours actuels (Yu *et al.*, 2007). La séquence du génome mitochondrial était déjà connue pour *U. americanus*, *U. arctos* et *U. maritimus*, grâce aux travaux de Delisle et Strobeck (Delisle & Strobeck, 2002).

La phylogénie construite montre que *M. ursinus* se sépare en premier des autres Ursinés. Les cinq espèces restantes se scindent en deux lignées : l'une contenant *U. arctos* et *U. maritimus*, d'une part, et l'autre contenant les ours noirs américain (*U. americanus*) et asiatique (*U. thibetanus*) et l'ours malais (*H. malayanus*) d'autre part. Les nœuds de cette phylogénie sont validés par des paramètres statistiques robustes, ce qui montre l'intérêt du séquençage de génomes mitochondriaux entiers.

Les données paléontologiques suggèrent que l'ours des cavernes est apparenté à l'ours brun. Cependant, les conclusions divergent sur cette relation. Ainsi que nous l'avons vu dans l'introduction, les ours des cavernes sont considérés par la plupart des paléontologues comme une espèce-sœur des ours bruns, mais pourraient également avoir un statut équivalent à celui des ours polaires en étant issu d'une lignée d'ours bruns.

La paléogénétique a abordé cette question dès 1994. La première étude a porté sur un fragment long de 139 pb de la région de contrôle mitochondriale (Hanni *et al.*, 1994). Cette

séquence a pu être amplifiée sur l'un des échantillons étudiés, âgé de 40 000 ans et s'est révélée différente de toutes les séquences d'ours bruns connues à l'époque.

Un arbre phylogénétique construit avec ce fragment de la région de contrôle, place l'ours des cavernes en dehors de la variabilité de l'ours brun, accréditant une divergence précoce des lignées arctoïdes et spéléoïdes. Cependant, la distance génétique et les valeurs de 'bootstrap' assez faibles ne permettent pas d'exclure l'hypothèse d'une spéciation tardive.

L'analyse s'est ensuite étendue à une dizaine d'échantillons de cette espèce, en augmentant la taille du fragment étudié de 139 pb à 282 bp. De plus, le gène Cytochrome b a été séquencé en entier pour l'un des échantillons (Loreille *et al.*, 2001a). Les résultats obtenus valident l'hypothèse d'une spéciation précoce de l'ours des cavernes.

La région de contrôle des ours brun et polaire présente une délétion de 13 pb, absente chez les ours noirs américains et tibétains, ainsi que chez l'ours des cavernes. Cette différence de taille est un argument fort en faveur d'une monophylie du groupe *arctos-maritimus*.

Cependant, les études menées sur les séquences mitochondriales d'ours actuels montrent que les résultats obtenus sur des fragments du génome mitochondrial peuvent ne pas être congruents et qu'une quantité importante d'informations est nécessaire pour valider les nœuds. De plus, la datation moléculaire des divergences entre espèces est d'autant plus précise qu'elle est effectuée sur des séquences longues.

Pour obtenir une phylogénie robuste de l'ours des cavernes, nous avons décidé de séquencer le génome complet de cette espèce. Nous sommes partis d'un échantillon particulièrement bien préservé de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc, prélevé dans la Galerie des Croisillons.

L'approche choisie pour le séquençage du génome mitochondrial complet est une approche par amplification de fragments chevauchants. Un processus itératif a été conduit afin de choisir des amorces spécifiques à cette espèce.

Un génome mitochondrial d'ours brun de la lignée ouest-européenne a été également séquencé pour clarifier la position phylogénétique de l'ours des cavernes. Pour ce séquençage, nous avons sélectionné un échantillon sub-moderne provenant des Pyrénées.

Ces données, ajoutées aux génomes mitochondriaux complets publiés (Delisle & Strobeck, 2002; Yu *et al.*, 2007) nous ont permis de déterminer la position phylogénétique exacte de l'ours des cavernes, ainsi que de dater les différents événements de spéciations dans la lignée ursine.

1.2. *Résultats : Article 1*

Article n°1 : DECIPHERING THE COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME AND PHYLOGENY OF THE EXTINCT CAVE BEAR IN THE PALEOLITHIC PAINTED CAVE OF CHAUVET. Bon C., Caudy N., de Dieuleveult M., Fosse P., Philippe M., Maksud F., Beraud-Colomb E., Bouzaid E., Kefi R., Laugier C., Rousseau B., Casane D., van der Plicht J., Elalouf J.-M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:17447-52, 2008

Deciphering the complete mitochondrial genome and phylogeny of the extinct cave bear in the Paleolithic painted cave of Chauvet

Céline Bon^a, Nicolas Caudy^a, Maud de Dieuleveult^a, Philippe Fosse^b, Michel Philippe^c, Frédéric Maksud^d, Éliane Beraud-Colomb^e, Eric Bouzaid^e, Rym Kefi^e, Christelle Laugier^f, Bernard Rousseau^f, Didier Casane^g, Johannes van der Plicht^h, and Jean-Marc Elalouf^{a,i,1}

^aService de Biologie Intégrative et Génétique Moléculaire, ^fService de Chimie Bioorganique et de Marquage, Institut de Biologie et Technologies de Saclay, Commissariat à l'Énergie Atomique Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France; ^bCentre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5608, Université Toulouse le Mirail, 31058 Toulouse Cedex 1, France; ^cMuséum d'Histoire Naturelle, 28 Boulevard des Belges, 69000 Lyon, France; ^dService Régional de l'Archéologie, 32 Rue de la Dalbade, BP811 31080 Toulouse cedex 6, France; ^eInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale U600, Hôpital Sainte Marguerite, 270 Boulevard Sainte Marguerite, 13009 Marseille, France; ^fLaboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, Unité Propre de Recherche 9034 Centre National de la Recherche Scientifique, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France; ^gRadiocarbon Laboratory, Groningen University, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands; and ^hFaculty of Archaeology, Leiden University, P.O. Box 9515, 2300 RA Leiden, The Netherlands

Edited by Francisco J Ayala, University of California, Irvine, CA, and approved August 22, 2008 (received for review July 1, 2008)

Retrieving a large amount of genetic information from extinct species was demonstrated feasible, but complete mitochondrial genome sequences have only been deciphered for the moa, a bird that became extinct a few hundred years ago, and for Pleistocene species, such as the woolly mammoth and the mastodon, both of which could be studied from animals embedded in permafrost. To enlarge the diversity of mitochondrial genomes available for Pleistocene species, we turned to the cave bear (*Ursus spelaeus*), whose only remains consist of skeletal elements. We collected bone samples from the Paleolithic painted cave of Chauvet-Pont d'Arc (France), which displays the earliest known human drawings, and contains thousands of bear remains. We selected a cave bear *sternebra*, radiocarbon dated to 32,000 years before present, from which we generated overlapping DNA fragments assembling into a 16,810-base pair mitochondrial genome. Together with the first mitochondrial genome for the brown bear western lineage, this study provides a statistically secured molecular phylogeny assessing the cave bear as a sister taxon to the brown bear and polar bear clade, with a divergence inferred to 1.6 million years ago. With the first mitochondrial genome for a Pleistocene carnivore to be delivered, our study establishes the Chauvet-Pont d'Arc Cave as a new reservoir for Paleogenetic studies. These molecular data enable establishing the chronology of bear speciation, and provide a helpful resource to rescue for genetic analysis archeological samples initially diagnosed as devoid of amplifiable DNA.

ancient DNA | pleistocene | *Ursus spelaeus*

Ancient DNA analysis was initiated >20 years ago by studies performed on the extinct quagga (1) and has long been devoted to the characterization of short nucleotide sequences, most often retrieved from the mitochondrial genome. Cooper *et al.* (2) raised the field to the genomic level by retrieving complete mitochondrial genomes for the moa, a flightless bird that became extinct a few hundred years ago. Recently, decisive progress has been accomplished by analysis carried out on Pleistocene specimens with a variety of approaches. Complete mitochondrial genomes have been obtained for the woolly mammoth and the mastodon, using either standard or multiplex PCR (3–5). Metagenomic studies performed on the mammoth yielded 13 million base pairs of nuclear DNA and several mitochondrial genomes (6, 7), and a similar approach carried out on Paleo-Eskimo frozen hair provided a mitochondrial genome for a human individual that lived ≈4,000 years ago (8). However, it is still unclear to what extent such approaches are valuable for species that did not benefit from the exceptional preservation conferred by long-term inclusion in permafrost. A genomic analysis of two cave bear (*Ursus spelaeus*) DNA libraries that contained 1–6%

of bear sequences yielded 27 kb of nuclear DNA but did not allow to retrieve any mitochondrial sequence (9). An alternative strategy should therefore be considered to sequence the cave bear mitochondrial genome.

The cave bear, a member of the order of Carnivora, gradually evolved from *Ursus deningeri* and was present in Europe and the Near East from ≈300,000 to 15,000 years ago, when it became extinct (10). This bear is known from rock art pictures of the late Pleistocene and from skeletal remains that are almost exclusively found in caves. The subterranean milieu ensures stable temperature (12–15°C) conditions, away from UV irradiation, but is still less favorable than permafrost for DNA preservation. Consequently, cave bear mitochondrial genome fragments have only been retrieved as short sequences that up to now could be assembled into a partial control region and a single protein coding gene (11, 12), which together span <10% of the expected 17 kb mitochondrial genome. Phylogenetic analysis carried out using the available sequence information (12–14) supported one hypothesis drawn from morphometric studies of fossil records (10) arguing for an early split of the cave bear from the brown bear lineage. However, considering the accumulating evidence demonstrating that long sequences are often necessary to obtain correct phylogenies (5), it is highly desirable to better characterize the cave bear mitochondrial genome.

In the present study, we collected *U. spelaeus* bone samples from the Chauvet-Pont d'Arc Cave (Ardèche, France). This cave (44° 23' N, 4° 26' E; 240 m above sea level) was discovered in 1994 and contains the oldest rock art pictures ever found, with charcoal drawings dating back to 32,000 years before present (B.P.) (15). The numerous drawings and engravings of the cave are part of a well preserved environment that appears as a reservoir for the analysis of natural (speleothems, grounds), anthropogenic (fireplaces, footprints, carved flints) and animal (bone remains, coprolithes, tracks) material (16). The majority

Author contributions: C.B., B.R., and J.-M.E. designed research; C.B., N.C., M.d.D., P.F., M.P., F.M., E.B.-C., E.B., R.K., C.L., J.v.d.P., and J.-M.E. performed research; C.B., N.C., M.d.D., E.B.-C., E.B., R.K., B.R., D.C., J.v.d.P., and J.-M.E. analyzed data; and C.B., D.C., J.v.d.P., and J.-M.E. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Data deposition: The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank database (accession nos. DQ227308, EU327344, and EU497665).

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: jean-marc.elalouf@cea.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0806143105/DCSupplemental.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

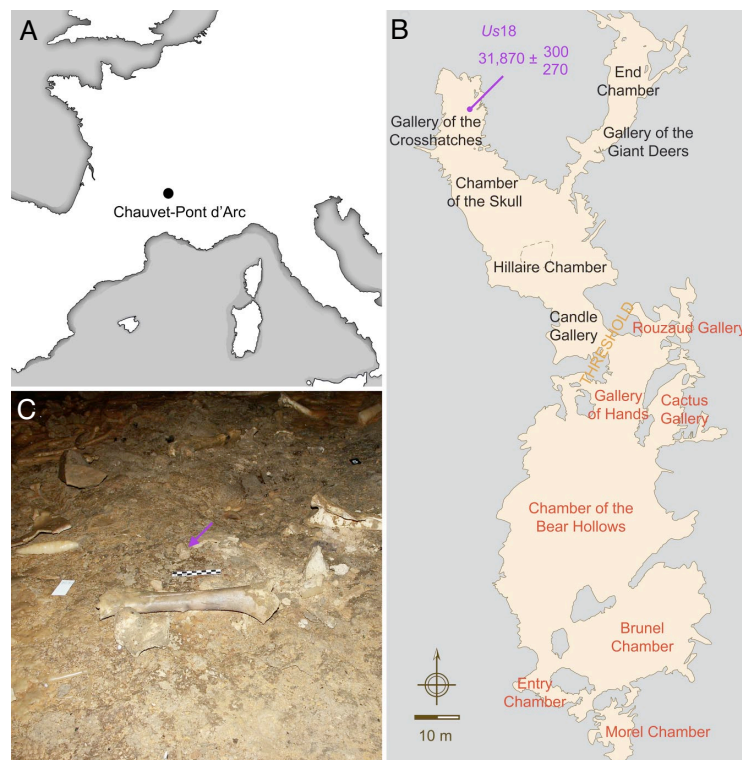


Fig. 1. Bear bone sample and archaeological context. (A) Geographical localization of the Chauvet-Pont d'Arc Cave. (B) Cave topography. Red and black characters refer to the color of rock art pictures in the entry and deep sectors, respectively. (C) The sector of the Gallery of the Cross-Hatches from which *Us18* (purple arrow) was retrieved.

(> 90%) of skeletal pieces belong to the cave bear, with a current record of >4,000 remains dispatched into 130 bone assemblages (17). They belong to a variety of individuals, as shown by the presence of a large number of skulls laying on the ground surface. Osteometric data suggest a homogeneous cave bear population with a predominance of females (17). As part of an interdisciplinary research project, we could collect bone samples in different cave sectors for ancient DNA analysis. Our analytical procedure rested on the design of a series of bear-specific oligonucleotide primers that were used to generate hundreds of overlapping DNA fragments enabling the characterization of a complete cave bear mitochondrial genome.

Results and Discussion

After searching for cave bear skeletal elements that could be analyzed for DNA content in the Chauvet-Pont d'Arc cave, we identified a bone sample that reproductively yielded robust PCR amplifications. *Us18* laid along the track of human footprints that extends from the Gallery of the Cross-Hatches to the Chamber of the Skull (Fig. 1). It consists of a sternebra that was radiocarbon dated to $31,870 (+300, -270)$ years B.P. (Groningen AMS sample number: GrA-28194).

The Chauvet-Pont d'Arc Cave is expected to contain cave bear rather than brown bear remains (16, 17). We nevertheless initiated the molecular characterization of *Us18* using primers which, although encompassing a highly variable portion of the mitochondrial control region, are conserved enough to allow DNA amplification from a variety of cave bear and brown bear mitochondrial haplotypes. These primers proved to be highly

efficient for PCR amplification (Fig. 2), and generated a DNA fragment that displayed seven substitutions with the closest brown bear sequence, but was identical to sequences for the cave bear B haplogroup obtained in Scladina (40,000 to 45,000

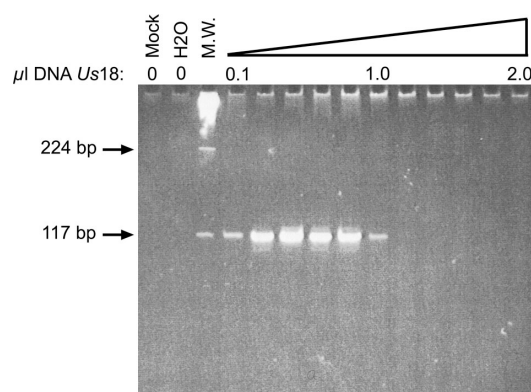


Fig. 2. Gel electrophoresis analysis of mitochondrial genome fragments generated by PCR from *Us18*. Variable amounts of the DNA extract (from 0.1 to 2.0 μl) were amplified using primer pair # 236, predicting a 117-bp DNA fragment. The total reaction volume was electrophoresed through an acrylamide gel stained with SYBR Green I. Negative controls included reactions carried out on a mock extract (Mock) or in the absence of any extract (H₂O). Molecular weight marker (M.W.) corresponds to λBstEII digest.

years-old samples) (13). These data therefore strongly support the notion that we have retrieved authentic cave bear DNA. In addition, the amount of *Urs18* DNA extract allowing successful amplification (0.1 μ l, or 0.05% of the total amount) was low enough to plan a large series of experiments. Ancient DNA samples usually contain DNA polymerase inhibitors that prevent from using large volume of extracts in the PCR (18, 19), as was indeed observed here. Nevertheless, the range of suitable DNA amounts spanned one order of magnitude, indicating that robust PCR conditions could be easily defined.

Because independent replication is a prerequisite for the study of ancient DNA (18, 19), a second extract was obtained and analyzed by another group of investigators from a different Institute (see *Methods*). The same and another overlapping pair of primers confirmed the sequence initially obtained, further corroborating that the sample was a reliable source of cave bear DNA. Subsequent experiments were carried out on both extracts, using 0.05 to 0.1% of the ancient DNA sample in each PCR.

To decipher the complete cave bear mitochondrial genome, we first selected a series of 147 primer pairs targeting conserved sequence motifs scattered throughout the brown bear and polar bear mitochondrial genomes. Because large DNA fragments are very rarely obtained from Pleistocene specimens, except for animals conserved in permafrost (3–7), most primer pairs were designed to amplify 150- to 180-bp DNA sequences. This first round of whole mitochondrial genome screening yielded 7.2 kb of DNA sequence, i.e., less than half of the mitochondrial genome. Considering that unsuccessful PCRs resulted from the use of primers that may not perfectly match the cave bear genome, we performed a screening iterative procedure using the cave bear sequence to design much more specific primers. We used a total of 245 primer pairs to retrieve a complete mitochondrial genome [supporting information (SI) Table S1].

Several lines of evidence support the conclusion that we deliver a reliable cave bear mitochondrial genome sequence. First, extensive replication was performed, the 245 primer pairs being used to generate 570 PCR fragments (Fig. S1). These PCR fragments were all cloned, and multiple clones were systematically sequenced on both strands to accurately determine a consensus sequence. Second, before assembly, all such consensus sequences were individually analyzed by BLAST to check that the best GenBank match corresponded to an *Ursidae* sequence. Third, among *Ursidae*, mitochondrial fragments previously analyzed in the cave bear displayed the best BLAST score with our sequences. As mentioned above, this was initially observed in the control region. The other published cave bear mitochondrial genome fragment concerns the cytochrome B (cytB). Our cytB sequence is identical to that obtained by Loreille *et al.* (12) for a cave bear from La Balme à Collomb, except for four transitions (0.35% of all cytB nucleotides). Two of these locate at the third base position of codons, and may reveal polymorphisms between cave bear coding sequences. For the two others, we recorded C instead of T residues, suggesting that the Chauvet-Pont d'Arc sample had been better preserved from cytosine deamination, the most frequent damage observed in ancient DNA (18, 19). The cave bear sample from La Balme à Collomb was also analyzed for a highly variable fragment of the control region (13), in which it displays two differences with Chauvet *Urs18*. This supports the notion that the two cave bear specimens correspond to different haplotypes.

The length of the cave bear mitochondrial genome (16,810 bp) is in the range of those reported for extant bear genomes, which vary between 16,723 (*Ursus maritimus*) and 17,044 bp (*Ursus thibetanus formosanus*). The length differences between the bear genomes mostly come from the control region, which displays a highly variable number of repeats for a 10-bp motif. This specific domain of the control region could not be retrieved through a single PCR from the Chauvet-Pont d'Arc cave bear sample. We

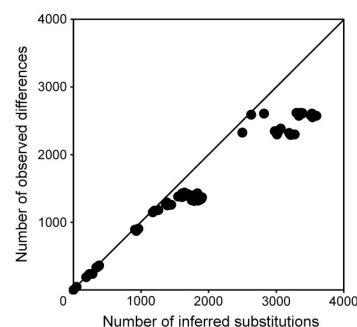


Fig. 3. Mutational saturation analysis of the complete mitochondrial genome dataset. The y axis shows the observed number of differences between pair of species sequences. The x axis shows the inferred number of substitutions between the same two sequences in a Maximum Parsimony tree determined using Patristic software. The straight line represents the case for which there is no saturation, with no reversion occurring in the sequences.

therefore used two primer pairs to separately target its 5' and 3' ends, and assembled all fragments into a repeat region of 350 bp. This is likely a minimal estimate, since the same approach carried out on another cave bear sample yielded a 360-bp sequence for this domain. The G + C nucleotide content of the cave bear mitochondrial genome (40.5%) is quite similar to that reported (40.4 to 41.6%) for extant bears (20). The cave bear and extant bear mitochondrial genomes all contain 13 protein coding genes, 22 tRNA genes, and 2 rRNA genes. The 13 protein coding genes predict polypeptides of similar size in all bear species, except for ND5, in which three additional codons are present in *U. spelaeus* and *U. thibetanus formosanus*. For three protein coding genes (COX3, ND3, and ND4), the stop codon is absent in the cave bear genome, being created by polyadenylation. This phenomenon, widely present in vertebrate mitochondrial genomes, is observed on the same genes in all extant bear genomes.

Because the previously published *Ursus arctos* mitochondrial genome (21) clusters into the brown bear eastern lineage described by Taberlet *et al.* (22), it was essential for a comprehensive phylogeny to also make available a complete mitochondrial genome sequence for the brown bear western lineage. This was accomplished by analyzing a brown bear from a French Pyrenean site (Guzet, Ariège) (Table S2 and Fig. S2). To exclude the possibility of contaminations in future analysis, DNA extraction from the modern brown bear sample was performed in a building different from that where cave bears DNA are extracted and stored.

The *Ursidae* phylogeny was inferred using the newly obtained *U. spelaeus* and *U. arctos* sequences, 10 previously published mitochondrial genomes for extant bears, and the giant panda that served as an outgroup. To estimate the mutational saturation of this dataset, we plotted the genetic distance against the patristic distance for each pair of species (Fig. 3). These distances are almost equal, indicating that mutational saturation is weak. Hence, considering the low extent of homoplasy, these mitochondrial genomes convey an information that can securely be used to analyze phylogenetic relationships.

Using complete mitochondrial genomes, we obtained trees of similar topology for analysis performed with different reconstruction methods (Fig. 4). The transition/transversion ratio is 23:1 (Table S3), confirming that saturation is low (4). The alpha parameter calculated by PhyML and MrBayes are 0.20 (without invariable site) and 1.60 (with 57% of invariable sites), respectively. Albeit different, these values that are approximations of the same phenomenon, both indicate that rate heterogeneity among sites is important. As shown in Fig. 4, the cave bear

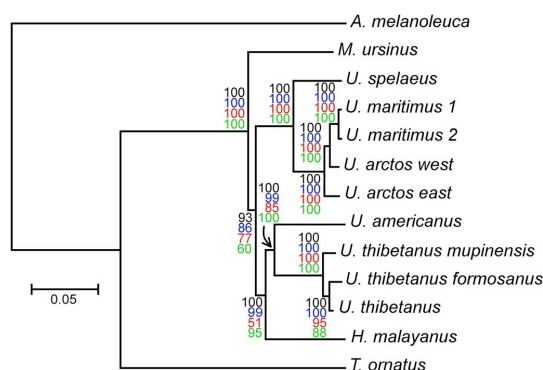


Fig. 4. Molecular phylogeny inferred from complete mitochondrial genome sequences. Tree construction was performed by MrBayes analysis, using the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) as an outgroup. The posterior probability value ($\times 100$) of each node is indicated in black, and the scale for genetic distance is shown at the bottom of the figure. The same tree topology was obtained using three other methods, and bootstrap values are indicated with colored characters for PhyML (blue), maximum parsimony (red), and neighbor joining (green) analysis. The *Ursus spelaeus* and *Ursus arctos* western lineage (west) sequences are from this study. GenBank accession numbers (from top to bottom) for the other sequences are as follows: EF196663, EF196662, AJ428577, AF303111, AF303110, AF303109, DQ402478, EF076773, EF196661, EF196664, and EF196665.

clusters with the brown and polar bears with maximal bootstrap and posterior probability values. Besides, the sequencing of a western brown bear mitochondrial genome confirms *Ursus arctos* as a paraphyletic taxon with respect to *U. maritimus* (23). However, the brown and polar bears group is not paraphyletic toward the cave bear, showing that the cave bear lineage appeared before the diversification within the brown bears. For other species, the topology is the same as the one reported by Yu *et al.* (20): The *Ursinae* form a monophyletic group, from which *M. ursinus* diverged early. Then *Ursinae* split into two branches, one leading to the *U. spelaeus*, *U. arctos*, and *U. maritimus* group, and the other leading to the *H. malayanus*, *U. americanus*, and *U. thibetanus* group. The analysis of the amino acid sequence of the concatenated protein-coding genes do not give exactly the same topology, but the sister group relationship between the cave bear and the brown and polar bears is still robustly supported (Fig. S3).

We also conducted a gene-by-gene strategy analysis (Figs. S4 and S5). The current and previously published (12) cave bear CYTB sequences cluster together. The topologies derived from individual genes vary in the branching of several species (especially *U. americanus*, *U. thibetanus*, *H. malayanus*, and *M. ursinus*). The sister group relationship between *U. spelaeus* and *U. arctos*–*U. maritimus* is found in every tree, the sole exception being the tree generated with ND6 sequence, a gene with weak phylogenetic information (20). It is worth emphasizing that bootstrap values are lower in the gene-by-gene analysis than in the whole genome tree. Only five genes give a 100% bootstrap value (16S rRNA, Cox1, ND2, ND4, and ND5) for the monophyly of the *U. spelaeus*, *U. arctos*, and *U. maritimus* group. Therefore, increasing the amount of data yields more robust trees, demonstrating the relevance of analyzing a complete mitochondrial genome.

The robust phylogeny obtained with complete mitochondrial genomes offers the opportunity of evaluating the divergence dates between species. To perform this analysis, we set the split between the giant panda and *Ursidae* to 12 MY (24). The split

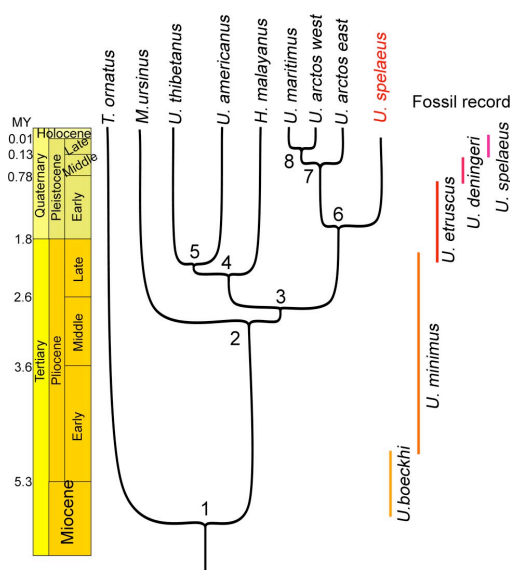


Fig. 5. Phylogeny and divergence times determined using the mitochondrial genome sequence of the cave bear and of eight extant bears. Divergence times were calculated using BEAST software with the splits between the giant panda and *Ursidae* and between *Ursinae* and *Tremarctinae* set to 12 and 6 million years (MY), respectively. Age for each node and 95% credibility intervals are as follows: 1, 6.3 MY (5.4–7.2); 2, 3.0 MY (2.2–3.8); 3, 2.8 MY (2.1–3.5); 4, 2.4 MY (1.7–3); 5, 2.1 MY (1.4–2.7); 6, 1.6 MY (1–2.1); 7, 0.6 MY (0.3–0.8); and 8, 0.4 MY (0.2–0.5).

between *Ursinae* and *Tremarctinae* was set to 6 MY, which corresponds to the most ancient fossil record for *Plionarctos*, i.e., the first tremarctine bear (25). Consistent with this calibration, the bayesian analysis returned a divergence date between *Tremarctinae* and *Ursinae* centered to 6.3 MY (Fig. 5), a few hundred thousand years before the appearance of *U. minimus boeckhi*, the first representative of the ursine lineage (26).

The radiation of the ursine bears (node 2 to 5) occurred in a brief lapse of time between 2 and 3 MY ago, thus explaining the difficulties in obtaining congruent phylogenetic relationships between these four species. This radiation occurred during the Pliocene when *U. minimus*, the assumed ancestor of the cave, brown and Asiatic black bears, was the most common bear species in Europe. We date the split between the arctoid and speleoid lineages back to 1.6 MY, during the Villafranchian stage. The divergence between eastern and western brown bear lineages occurred 550,000 years ago, probably during the Mindel glacial stage, and the split between the western lineage and the lineage leading to the polar bear occurred 350,000 years ago. A recent analysis conducted on northeastern European brown bears suggested that their last common ancestor is 174,000 years old (27).

To explore the robustness of the divergence times deduced from our data, we performed similar analyses using sequences of various lengths (Fig. S6). Strikingly, a sequence of 1 kb provides different node ages and much wider credibility intervals than those conveyed by longer sequences. Up to sequence stretches of 5 kb, the divergence date between the cave bear and arctoid lineages had not yet stabilized to the value of 1.6 MY obtained with the whole genome dataset.

The availability of a cave bear mitochondrial genome opens a wave of possibility. First, it is expected to help in the analysis of

species that preexisted to the cave bear, such as *Ursus deningeri*. The sequence information provided by extant bears may not be sufficient to efficiently design experiments aiming at the retrieval of DNA fragments from such an ancient species. Second, the cave bear mitochondrial genome makes feasible to better explore archeological specimens ascribed to this species. Such a possibility was evaluated for Chauvet-Pont d'Arc bear samples that failed to yield any DNA when queried for the control region. Targeting another portion of the mitochondrial region with primers designed from the current cave bear genome (Fig. S7) rescued a series of samples for genetic analysis, providing successful amplification for 48% instead of 17% of the 23 Chauvet-Pont d'Arc samples analyzed so far. Together with the observation that cave bear intrusions extended from at least 37,000 to 29,000 years B.P. (28), these samples indicate that exploring genetic diversity and variation through time is feasible at Chauvet-Pont d'Arc.

In conclusion, we provide a mitochondrial genome sequence for the extinct cave bear. This mitogenomic analysis definitely assesses the cave bear as a sister taxon to the brown bear and polar bear clade, and displays the tempo of bear history during the Pliocene and Pleistocene. Our study also demonstrates the feasibility of retrieving complete mitochondrial genomes from the subterranean milieu, an environment that contains remains for a variety of extinct species, and points to the painted cave of Chauvet-Pont d'Arc as a reservoir for paleogenetic investigations.

Methods

DNA Sequence Authentication. To guarantee the authenticity of the cave bear mitochondrial sequence, we followed previous recommendations for works performed on ancient DNA (18, 19). First, to avoid contaminations from previous and current analyses, pre-PCR steps (i.e., DNA extraction and set-up of PCRs) were carried out in a building where no other molecular work on bear DNA had been performed previously, and handling of amplified products was done in a different building. Second, negative controls included mock extracts and PCR blanks (where water was added instead of DNA), which always failed to yield any amplification product. Third, we selected oligonucleotide primers that display weak homology with non-bear DNA sequences and checked by BLAST analysis that the best hit for each DNA fragment was a recorded cave bear sequence (when available in GenBank) or a sequence for another *Ursidae*. Fourth, we observed an expected molecular behavior for the ancient DNA extracts, with successful amplifications mainly for short (< 180 bp) DNA fragments, whereas sequences >200 bp were exceptionally obtained (4.2% of attempts). Fifth, reproducibility was assessed using the same and a second DNA extract. Sixth, we systematically designed PCR primers generating overlapping fragments. This strategy allowed us to read 8,498 nt (50.6% of the genome) from DNA fragments obtained with different PCR primers. As outlined in refs. 4, 18, and 19, this procedure allows to conclude that numts are unlikely to be present in our sequence. Seventh, to detect errors induced by DNA damage and deduce a reliable consensus sequence, we cloned each PCR fragment and systematically sequenced at least 12 clones on both strands. As a whole, the redundancy achieved through PCR replicates, overlaps between fragments and sequencing of multiple clones provided a mean number of 93 reads for each nucleotide of the cave bear mitochondrial genome. Eighth, DNA extracts obtained in each team (i.e., Saclay and Marseille) and analyzed by different investigators, using their own batch of reagents yielded the same cave bear DNA sequence, which demonstrated that the results could be independently replicated. Finally, to prevent from cross-contaminations, the brown bear sample was handled in a building different from those where the cave bear DNA had been extracted and analyzed, and experiments on the brown bear DNA were initiated once those on the cave bear samples have been completed.

DNA Extraction. DNA was extracted from the bone cortex. One gram of bone powder was incubated 40 h at 42°C under constant agitation in 10 ml of extraction buffer consisting of 0.45 M EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1% SDS, 65 mM DTT, and 0.5 mg/ml proteinase K. After centrifugation, the supernatant was recovered, extracted once with one volume of phenol, once with a phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1) mixture, and once

with chloroform. The aqueous phase was then concentrated using Centricon YM-30 (Millipore), and the column was washed five times with distilled water. The DNA extract was subsequently recovered as a $\approx 200\text{-}\mu\text{l}$ sample volume.

Primer Design. PCR primers were designed with the help of Oligo 6.0 software (Medprobe). For experiments on cave bear DNA, we aligned the *Ursus arctos* and *U. maritimus* mitochondrial genomes and selected 147 primer pairs targeting conserved sequences. Sixty-four (44%) of these pairs were successfully used in PCR experiments that yielded 7.2 kb of the cave bear mitochondrial genome. We subsequently used this sequence information to iteratively design new series of primer pairs to generate PCR fragments that allowed to fill the gaps. As expected, these subsequent series of primers increased the success rate, with 181 of 250 pairs (72.4%) allowing the amplification of cave bear mitochondrial DNA fragments. For experiments carried out on brown bear DNA, we used 52 primer pairs to retrieve a complete mitochondrial genome sequence.

DNA Amplification and Analysis. PCR was performed in a 50- μl reaction volume containing mock or ancient DNA extracts, 300 pM sense and antisense primers, 200 μM dNTP, 2.5 mM MgCl_2 , 2.5 μg of T4 gene 32 protein (USB), 5 μl of GeneAmp 10X PCR buffer II, and 2.5 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems). The amount of DNA to be used was tested in initial experiments and consisted of 0.2–0.4 μl and 0.1 μl of the cave bear and brown bear DNA extracts, respectively. An equivalent volume of water was substituted to the DNA sample in PCR blanks. After an activation step (95°C, 8.5 min), a single round of 45 PCR cycles (95°C for 15 s, 50–60°C (according to primers *Tm*) for 20 s, and 70°C for 1 min) was performed in 9600, 7000 or 7300 Applied Biosystems thermal cyclers. The full reaction volume was loaded onto an 8% polyacrylamide gel. To increase the sensitivity of our PCR assay, we used Sybr Green I (Invitrogen) instead of ethidium bromide to stain the gel. PCR amplicons were eluted from the gel and inserted into pCR4-TOPO (Invitrogen). Plasmid miniprepations of the clones were sequenced on ABI 377XL or 3130 XL DNA sequencers, using BigDye 3.1 terminator chemistry (Applied Biosystems). We systematically analyzed a minimum of 12 colonies for each cloned fragment and sequenced both DNA strands using M13 forward and T3 primers.

Phylogenetic Analyses. The complete mitochondrial genomes of *Ursidae* and of the giant panda were aligned using ClustalW with the default parameters. The domain of the control region containing the 10-bp repeat motif was removed before all analyses. Phylogenetic analyses were carried out on different datasets: complete mitochondrial genomes, concatenated nucleotide sequences of protein-coding genes, amino acid sequences of individual proteins, concatenated tRNA genes, and rRNA genes. All of the genes were aligned individually before concatenation. As some of them are overlapping, a few nucleotides are duplicated in our concatenations. Phylogenetic trees were constructed from these datasets with Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP), and Neighbor-Joining (NJ) methods, using PhyML (29, 30), MrBayes 3.1.2 (31), and Mega 3.1 (32) program packages, as appropriate.

For nucleotide analysis, PhyML and MrBayes were used with the general time reversible (GTR) + 4I + I model, and, for the NJ method, we used the Tamura 3-parameter and the gamma-distribution shape parameter estimated with PhyML and MrBayes. For amino acid, PhyML and MrBayes analyses were conducted with a gamma substitution rate model and a mammalian mitochondrial model of substitutions (MtMam), and NJ analysis was performed using a gamma substitution rate model and a Jones–Taylor–Thornton (JTT) matrix of substitution. Bayesian analyses were run using four Metropolis coupled Markov Chain Monte Carlo for at least 1 million generations, sampling trees every 100 generations. MP analyses were run with the Mega 3.1 default parameters.

To estimate the robustness of the phylogenetic inferences, we used the bootstrap method (2,000 replicates for NJ and MP, 500 replicates for PhyML). For Bayesian analyses, posterior probabilities of the nodes in the consensus tree were estimated. To evaluate possible bias introduced by saturation, we tested the substitution saturation for the complete mitochondrial genome dataset, using Patristic 12.0.0 software (33).

Divergence times were estimated using complete mitochondrial genomes with BEAST software (34). We used as calibration points the divergence between the giant panda and *Ursidae* and between *Ursinae* and *Tremarctini*, set at 12 ± 1 MY (24) and 6 ± 0.5 MY (25), respectively, considering a normal distribution. We chose a GTR + 4I + I substitution model, a relaxed uncorrelated lognormal molecular clock, and a Yule process of speciation (35). We performed two independent chains that each consisted of 10,000,000

points. Data were collected every 1,000 points, and the burn-in was set to 10,000.

To test the impact of sequence length on estimated divergence times, we randomly created alignments of various length from whole mitochondrial genome sequences, and calculated node ages using the parameters described above.

Note Added in Proof. This work was under review and in the publication process when a cave bear mitochondrial genome sequence was obtained from a bone sample found in Gamssulzen Cave, Austria (36). The Chauvet and Gamssulzen cave bear mitochondrial genome sequences are highly homologous and locate at similar positions in a phylogenetic tree. The divergence

dates between ursine lineages deduced from the two studies display however a number of differences.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank D. Baffier for giving us the authority to collect cave bear samples, M.-C. Gaillard for help in initiating the project, J. L. Orenge for the brown bear sample, all investigators of the Chauvet scientific team for fruitful discussions, A. Martel for bioinformatics support, M. Azéma and N. Kidman for artwork, P. Legrain for encouragement and helpful suggestions for an early version of the manuscript. This work was supported by grants from the Commissariat à l'Energie Atomique and the French Ministère de la Culture et de la Communication. C.B. received PhD funding from the Commissariat à l'Energie Atomique.

- Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC (1984) DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312:282–284.
- Cooper A, et al. (2001) Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. *Nature* 409:704–707.
- Rogaev EI, et al. (2006) Complete mitochondrial genome and phylogeny of Pleistocene mammoth *Mammuthus primigenius*. *PLoS Biol* 4:e73.
- Krause J, et al. (2006) Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. *Nature* 439:724–727.
- Rohland N, et al. (2007) Proboscidean mitogenomics: Chronology and mode of elephant evolution using mastodon as outgroup. *PLoS Biol* 5:e207.
- Poinar HN, et al. (2006) Metagenomics to paleogenomics: Large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science* 311:392–394.
- Gilbert MT, et al. (2007) Whole-genome shotgun sequencing of mitochondria from ancient hair shafts. *Science* 317:1927–1930.
- Gilbert MT, et al. (2008) Paleo-Eskimo mtDNA genome reveals matrilineal discontinuity in Greenland. *Science* 320:1787–1789.
- Noonan JP, et al. (2005) Genomic sequencing of Pleistocene cave bears. *Science* 309:597–599.
- Kurten B (1976) *The Cave Bear Story: Life and Death of a Vanished Animal* (Columbia Univ Press, New York).
- Hänni C, Laudet V, Stehelin D, Taberlet P (1994) Tracking the origins of the cave bear (*Ursus spelaeus*) by mitochondrial DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12336–12340.
- Loreille O, et al. (2001) Ancient DNA analysis reveals divergence of the cave bear, *Ursus spelaeus*, and brown bear, *Ursus arctos*, lineages. *Curr Biol* 11:200–203.
- Orlando L, et al. (2002) Ancient DNA and the population genetics of cave bears (*Ursus spelaeus*) through space and time. *Mol Biol Evol* 19:1920–1933.
- Hofreiter M, et al. (2002) Ancient DNA analyses reveal high mitochondrial DNA sequence diversity and parallel morphological evolution of late pleistocene cave bears. *Mol Biol Evol* 19:1244–1250.
- Valladas H, et al. (2001) Palaeolithic paintings. Evolution of prehistoric cave art. *Nature* 413:479.
- Clottes J (2001) *Chauvet Cave: The Art of Earliest Times* (Seuil, Paris).
- Fosse P, Philippe M (2005) Fauna in the Chauvet Cave: Paleobiology and anthropozoology. *Bull Soc Prehist Fr* 102:89–102.
- Pääbo S, et al. (2004) Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 38:645–679.
- Willerslev E, Cooper A (2005) Ancient DNA. *Proc Biol Sci* 272:3–16.
- Yu L, Li YW, Ryder OA, Zhang YP (2007) Analysis of complete mitochondrial genome sequences increases phylogenetic resolution of bears (Ursidae), a mammalian family that experienced rapid speciation. *BMC Evol Biol* 7:198.
- Delisle I, Strobeck C (2002) Conserved primers for rapid sequencing of the complete mitochondrial genome from carnivores, applied to three species of bears. *Mol Biol Evol* 19:357–361.
- Taberlet P, Bouvet J (1994) Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Proc Biol Sci* 255:195–200.
- Talbot SL, Shields GF (1996) Phylogeography of brown bears (*Ursus arctos*) of Alaska and paraphyly within the Ursidae. *Mol Phylogenet Evol* 5:477–494.
- Wayne RK, van Valkenburgh B, O'Brien SJ (1991) Molecular distance and divergence time in carnivores and primates. *Mol Biol Evol* 8:297–319.
- Tedford RH, Martin J (2001) Plionarctos, a tremarctine bear (Ursidae: Carnivora) from western North America. *J Vertebrate Paleontol* 21:311–321.
- Olive F (2006) Evolution of Plio Pleistocene larger Carnivores in Africa and Western Europe. *L'Anthropologie* 110:850–869.
- Saarma U, et al. (2007) Mitogenetic structure of brown bears (*Ursus arctos* L.) in northeastern Europe and a new time frame for the formation of European brown bear lineages. *Mol Ecol* 16:401–413.
- Bocherens H, Drucker DG, Billiou D, Geneste JM, van der Plicht J (2006) Bears and humans in Chauvet Cave (Vallon-Pont-d'Arc, Ardèche, France): Insights from stable isotopes and radiocarbon dating of bone collagen. *J Hum Evol* 50:370–376.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696–704.
- Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O (2005) PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* 33:W557–559.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574.
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5:150–163.
- Fourment M, Gibbs MJ (2006) PATRISTIC: a program for calculating patristic distances and graphically comparing the components of genetic change. *BMC Evol Biol* 6:1.
- Drummond AJ, Rambaut (2007) A BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7:214.
- Drummond AJ, Ho SY, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol* 4:e88.
- Krause J, et al. (2008) Mitochondrial genomes reveal an explosive radiation of extinct and extant bears near the Miocene-Pliocene boundary. *BMC Evol Biol* 8:220.

Supporting Information

Bon et al. 10.1073/pnas.0806143105

SI Methods

Amino Acid Racemization Analysis. Because it has been reported that archeological samples containing authentic ancient DNA display a specific pattern of amino acid racemization (1), we measured the D/L ratio for aspartic acid and alanine. Amino acids were derivatized as described in ref. 2, resolved by high-pressure liquid chromatography (HPLC), using a HyPURITY C18 column (Thermo Electron), and measured through fluorescence detection. The HPLC elution gradient consisted of a mixture of 50 mM sodium acetate and methanol (gradient, 0–10 min: 0% methanol; 10–11 min: 0–30% methanol; 11–30 min: 30% methanol). The extent of racemization caused by the experimental procedure was measured using commercial BSA, and yielded D/L ratios of 0.02 and <0.01 for aspartic acid and alanine, respectively. For the Chauvet cave bear *Us18* sample, we obtained D/L ratios of 0.06 (aspartic acid) and 0.01 (alanine). This pattern is consistent with that described for a series of

archeological samples from which ancient DNA could be recovered (1).

Radiocarbon Dating by Accelerator Mass Spectrometry (AMS). The samples underwent standard chemical pretreatment for removal of contaminants (3), and collagen was extracted using the method of Longin (4). The collagen was combusted into CO₂. CO₂ was cryogenically trapped using an automatic device (5), transformed into graphite, and analyzed for ¹⁴C by the Groningen AMS facility (6). The ¹⁴C activities in the graphite were measured, relative to a standard radioactivity, corrected for isotopic fractionation using the stable isotope ratio ¹³C/¹²C to $\delta^{13}\text{C} = -25\text{‰}$, and calculated using the conventional half-life (7). They are reported in years before present (B.P.). The errors quoted are all 1-sigma. For samples relatively old on the ¹⁴C time scale, the exponential decay law of radioactivity conveys asymmetric errors for the reported ages (8).

1. Poinar HN, Höss M, Bada JL, Pääbo S (1996) Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* 272:864–866.
2. Nimura N, Kinoshita T (1986) o-phthalaldehyde-N-acetyl-L-cysteine as a chiral derivatization reagent for liquid chromatographic optical resolution of amino acid enantiomers and its application to conventional amino acid analysis. *J Chromatogr* 352:169–177.
3. Mook WG, Streuerman HJ (1983) Physical and chemical aspects of radiocarbon dating. *PACT* 8:31–55.

4. Longin R (1971) *Nature* 230:241–242.
5. Aerts-Bijma AT, van der Plicht J, Meijer HAJ (2001) Automatic AMS sample combustion and CO₂ collection. *Radiocarbon* 43:293–298.
6. van der Plicht J, Wijma S, Aerts AT, Pertuisot MH, Meijer HAJ (2000) Status report: The Groningen AMS facility. *Nuclear Instr Methods Phys Res B* 172:58–65.
7. Mook WG, van der Plicht J (1999) Reporting ¹⁴C activities and concentrations. *Radiocarbon* 41:227–239.
8. Olsson IU (1989) The ¹⁴C method - its possibilities and some pitfalls. *PACT* 24:161–177.

For Figs. S1 and S2, please see page 14 of the Supporting Information.

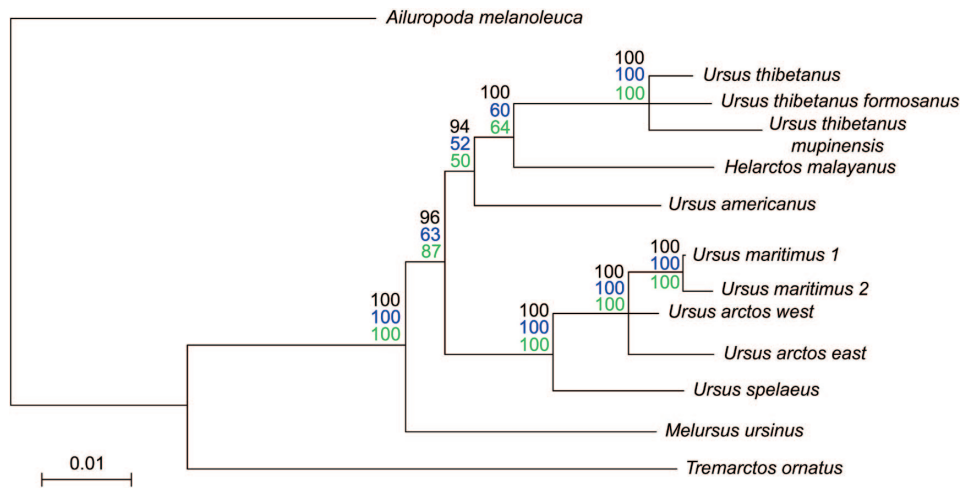


Fig. S3. Phylogeny based on the amino acid sequence of all 13 proteins encoded by the mitochondrial genome. Tree construction was performed using the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) as an outgroup. The topology is supported by MrBayes, PhyML, and neighbor joining analysis; the corresponding support values for each node are indicated in black, blue, and green characters, respectively. The scale bar depicts the genetic distance relevant for MrBayes analysis. The *Ursus speleus* and *Ursus arctos* western lineage (west) sequences are from this study. GenBank accession numbers for the other sequences are indicated in Fig. 4.

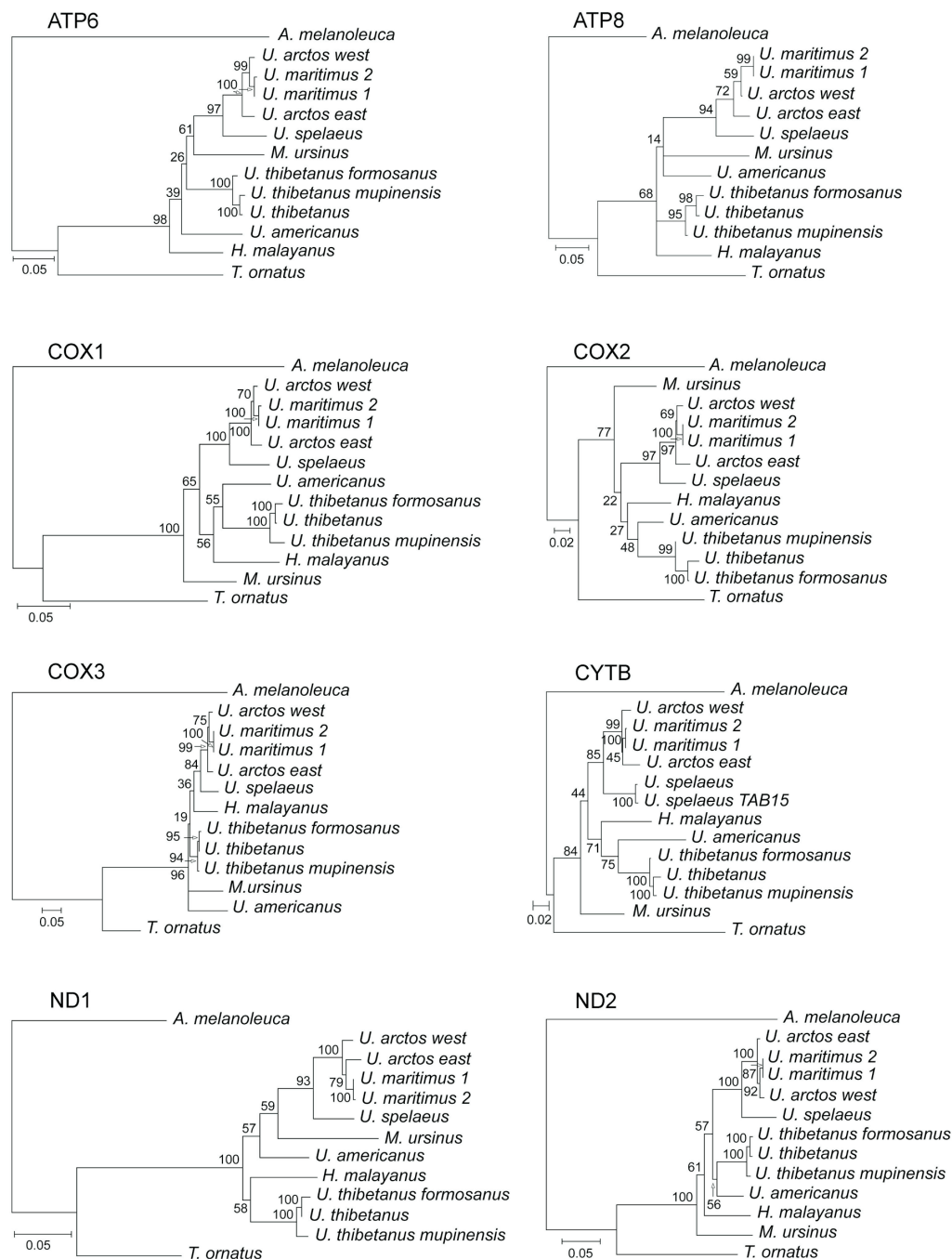


Fig. S4. Phylogeny based on individual mitochondrial coding genes. The nucleotide sequence of each protein coding gene was used to infer phylogenetic relationships by PhyML analysis, with the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) serving as an outgroup. Bootstrap values for each node and the scale for the genetic distance are indicated. The *Ursus spealeus* and *Ursus arctos* western lineage (west) sequences are from this study. GenBank accession numbers for the other sequences are indicated in Fig. 4.

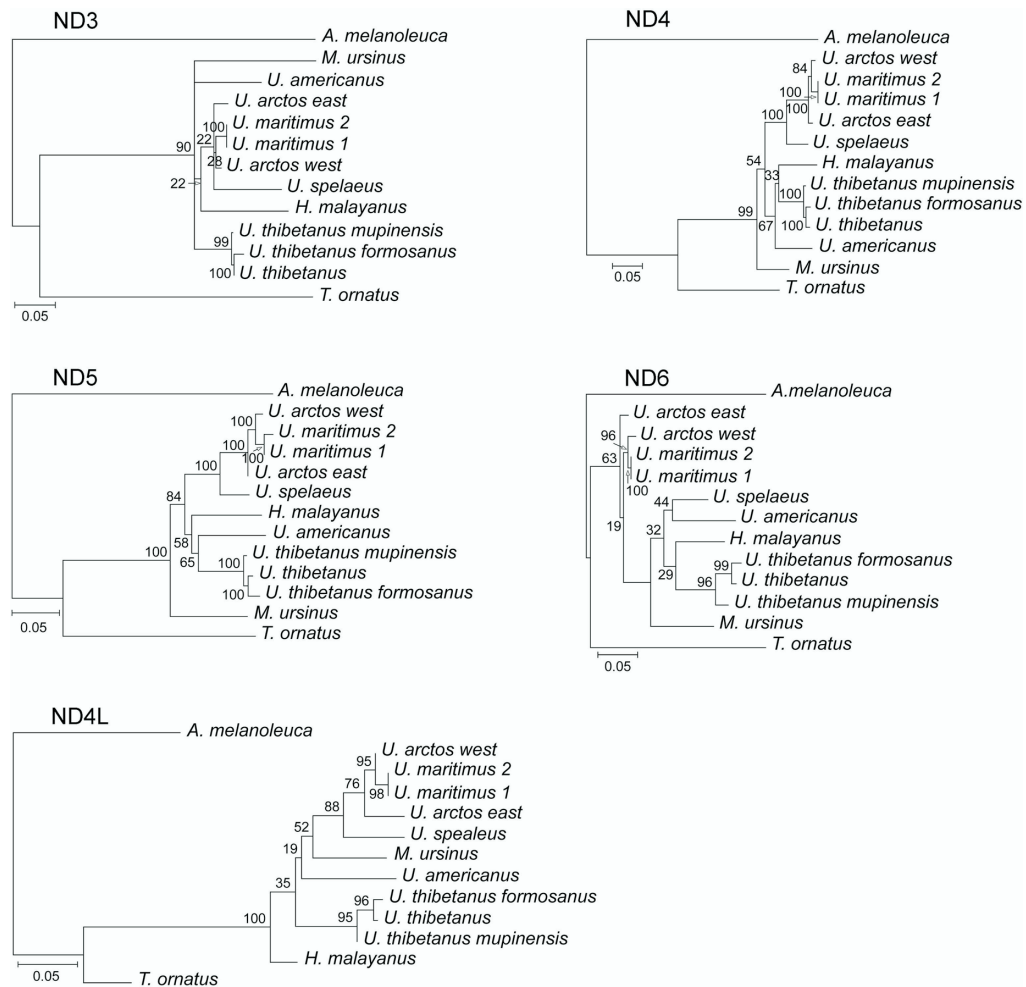


Fig. S4 (continued).

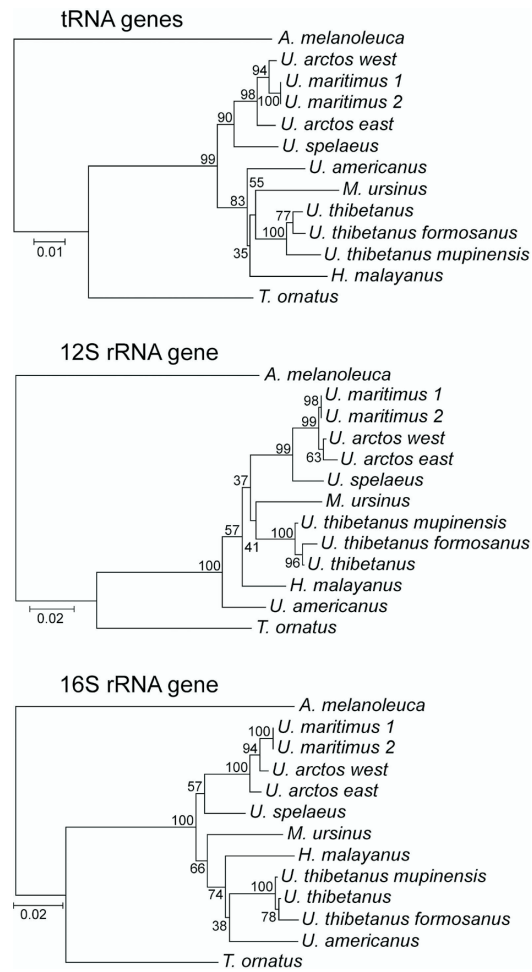


Fig. S5. Phylogeny based on mitochondrial tRNA and rRNA genes. PhyML analysis was performed on tRNA, 12S rRNA, and 16S rRNA genes, using the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) as an outgroup. The tRNA genes sequences were concatenated as a single string of data to perform the analysis. Bootstrap values for each node and the scale for the genetic distance are indicated. The *Ursus spealeus* and *Ursus arctos* western lineage (west) sequences are from this study. GenBank accession numbers for the other sequences are indicated in Fig. 4.

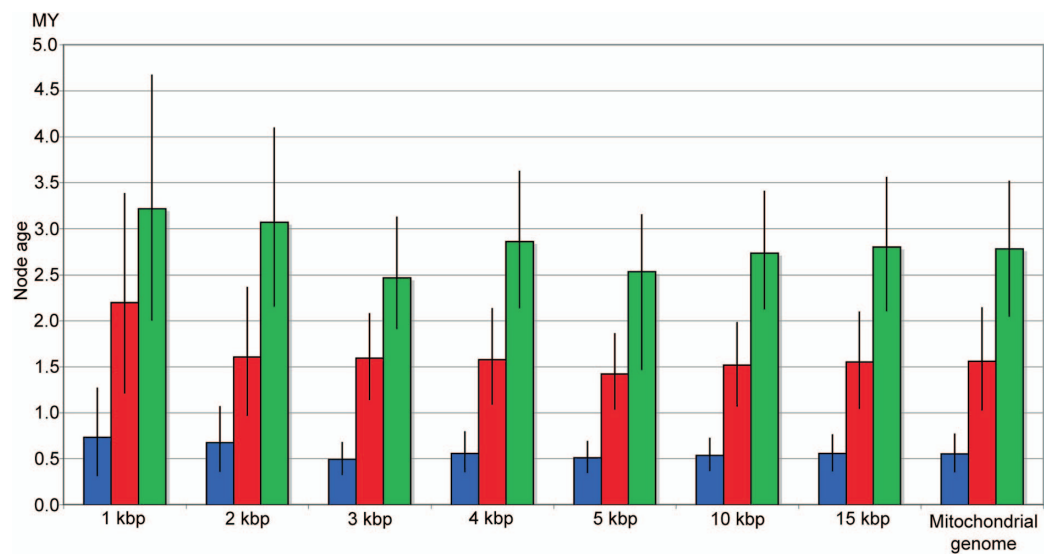


Fig. S6. Comparison of the divergence dates obtained for dataset of various lengths. Only node 3 (blue), 6 (red) and 7 (green), as defined in Fig. 5, are shown. Black bars represent posterior densities (95% credibility interval) of nodal age estimates.

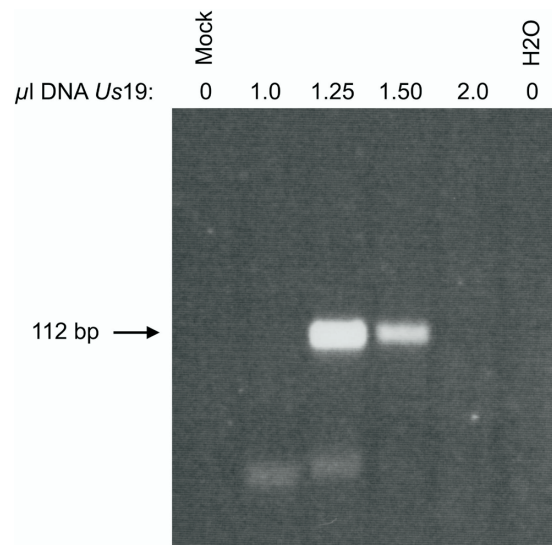


Fig. S7. Amplification of a fragment of the cave bear 16S ribosomal RNA gene. Variable amounts of the Chauvet-Pont d'Arc *Us19* DNA extract were amplified using primer pair 46, yielding a 112-bp DNA fragment. The total reaction volume was electrophoresed through an acrylamide gel stained with SYBR Green I. Negative controls included reactions carried out on a mock extract (Mock) or in the absence of any extract (H_2O). Sequencing analysis of the cloned PCR products confirmed that they correspond to cave bear DNA.

Table S1. Oligonucleotide primers used for PCR amplification of cave bear mitochondrial genome fragments

Primer pair	Primer position	Forward primer	Reverse primer	Amplicon, bp
1	83F 206R	AAAGGTCGTCGCAGTCA	GCGTCGTTGTTTCGATTTA	142
2	83F 207R	AAAGGTCGTCGCAGTCAA	TGCGTCGTTGTTTCGATT	143
3	170F 267R	TCAATGGTCGCAGGACATATAGTA	TGCGTACACGTGCGTACAC	106–256
4	201F 267R	GCCACTAAATCGAACGAACA	TGCGTACACGTGCGTACAC	205–265
5	546F 592R	CGTGTACGCACGTGTACG	GGGGGTTTGATTAAAGCTAAGTT	148–228
6	546F 644R	CGTGTACGCACGTGTACG	GGCAAGACAACCATAAATGTG	119–239
7	546F 657R	CGTGTACGCACGTGTACG	TTTGGGGTTTGCAAGAC	119
8	572F 705R	CGCACGCGTTTTAGATA	GTGGGATTTTGGATATGATAGC	155
9	599F 730R	CTTAATCAAACCCCTTACC	TATTTGGCTGGGAATTTAGCTTAT	156
10	658F 829R	TCTTGCCAAACCCCAAAAA	GATAATAACGAAAAATCAATAGGA	196
11	758F 890R	ACTGTAATCATAGGCATGAGACTTT	GTTGGATTTGGGGATTGTGA	152
12	862F 1021R	GGCCACGAGCTTTTACTAGAT	CGGAGACTTGCATGTGTAAT	179
13	862F 1024R	GGCCACGAGCTTTTACTAGAT	GCGGAGACTTGCATGTGT	180
14	997F 1163R	GCCTTCCCATTTAGCTACTAACA	CTTTCGTTTCATGGCTTAATTTT	189
15	1060F 1163R	TTTGGAATCTTAAAGCGATTGA	CTTTCGTTTCATGGCTTAATTTT	126
16	1143F 1273R	CCACGGGATACAGCAGTG	TTTTCTTTCACACGCTTTACG	151
17	1238F 1358R	GGTTATACGATTGACCCGAGTT	GAGAGCATTAAAGTCACTTTCGTAGC	146
18	1317F 1467R	TTTAATCCAGCTGTAAAAAGCTATC	GCTAGTAGTTCTCTGGCGAATAA	173
19	1422F 1599R	CCCCATCTGCTTAGCCTTAAA	TTGCTGAAGATGGCGGTATG	197
20	1429F 1576R	ATGCTTAGCCTTAAACATAAATAAT	AGACTGAATTAGCAAGAGGTGG	169
21	1554F 1663R	CGATAAACCCCGATAGACC	ATGGGTTACACCTTGACCTAAGT	133
22	1637F 1743R	AGTAAGCACAATCATCTCGCATA	AATCCACCTTATGTTTTAGTTTCAT	132
23	1699F 1799R	AATGGGCTACATTTTCTATTCAAG	CATGCTTCATTGCCTTATTCA	121
24	1767F 1899R	TTTAGTAGTAAATCAAGAATAGAGAG	ATGCTTACCTTGTTACGACTT	153
25	1768F 1903R	TTAGTAGTAAATCAAGAATAGAGAGC	CAGTATGCTTACCTTGTTACG	156
26	1877F 2001R	CAAATAAAACGCAAGAGGAGAC	CTAGCTCTGGGTTCAAAGTGG	145
27	1882F 2033R	AAAACGCAAGAGGAGACAAG	AATTGGTTTATGGTAGTTTGGTTAGT	177
28	1971F 2094R	GCTTACACCCAGAGGATTTCA	AGCTCCGATTAAGAATTTCTATCT	149
29	2009F 2168R	AACCCAGAGCTAGCCAGATAA	AGGAGGGGTAATCTTCTGCTTT	181
30	2009F 2168R	AACCCAGAGCTAGCCAGATAA	AGGTAGAAGGGATAATCTTTGCTGTT	185
31	2022F 2166R	CCCAGATAACAATAACCAAACTA	GAAGGGATAATCTTGTCTGTTA	167
32	2134F 2275R	GCAAGGGAATGATGAAAGATTAC	GAGTTTACCCAGTGGATTGT	162
33	2182F 2300R	TCCCTTCTACCTTTTGCATAAT	TCTTCTCACTATTTTGCAGAT	140
34	2250F 2398R	CCGAAACCAGACGAGCTACC	AATTTTAAAGTTTGTAGGCAAGTT	173
35	2271F 2360R	ATGAACAATCCATGGGGTAAA	CTATTCTGGGCAACCAAGCTA	109
36	2365F 2521R	GGTTGCCAGAATAGAATTTT	TTAATTGATGGCTGCTTCTAGG	178
37	2467F 2635R	GAATCAAGGATACAGCCTTACTT	TTACTCATATTAGCATTGTTGCTTCT	194
38	2470F 2627R	TCAAGGATACAACCTTACTTAGAGAG	TTAGCATTGTTGCTTCTATATTTAA	182
39	2600F 2721R	CCTAATATAATAACTGGGCTAATCT	TGTTGGATTATTTCTACGTTGTTG	145
40	2693F 2856R	ACAGCAACGGATAACCACTGA	GGGAATGCTGGAGGTGATG	182
41	2818F 2973R	GAACCTCGGCAACACAAAC	CGTGTGGCCTTTCATACAA	174
42	2835F 2964R	ACCCCGCCTGTTTACCAA	GTGGCCTTTCATACAAGTCCCTATT	154
43	2935F 3061R	GCAAGGTAGCATATAATCATTGTTCT	GCTCATAGGGTCTTCTGCTCTTA	150
44	3037F 3210R	CGTGAAGAGGCGGGAATA	GTGAGCATTTTGACTGGTACGCTCA	198
45	3038F 3155R	GTGAAGAGGCGGGAATAAAAT	TCGCCCCAACCTAAATTG	135
46	3129F 3215R	AACAACATATTCCTCCATGAGC	AAGTAAGTGAGCATTTTGACTGGTAC	112
47	3183F 3330R	CAAAATAACCTCCGAGTGATATTA	ATCCAACATCGAGGTGCTAA	167
48	3303F 3420R	TTTAAGAGTCCATATCGACAATAGGG	CTGGATTGCTCCGGTCTGAACT	139
49	3392F 3542R	TTCAACGATTAAAGTCTACGTGAT	TGGGGGTAGACTTACTAGGTTTAG	174
50	3515F 3609R	CGCCTTAAGACCAATAGATG	AAAGGTTTAAAGTTTATGCAATCAC	119
51	3575F 3692R	AAGAGACAGGGCCTTGTTAG	CGAGGAGAATGGGTACGACTA	138
52	3576F 3736R	AGAGACAGGGCCTTGTTAG	AGCCAGTACTTTTCGTTT	179
53	3586F 3746R	CTTTGTTAGGGTGGCAGAG	ACGAAGTTGTATATAGCCAGTA	183
54	3606F 3735R	CCGGTGATTGCATAAAACTT	ATAGCCCACTACTTTTCGTTCT	151
55	3711F 3840R	CGCCGTAGCCTTCTTAACA	AGTGGGCGCAAGGGTCT	147
56	3712F 3840R	GCCGTAGCCTTCTTAACA	AGTGGGCGTAAGGGTCT	146
57	3735F 3822R	AGAACGAAAAGTACTGGGCTATA	GGGTTCTTTGGTAAAAAGTTTATA	112
58	3807F 3981R	ACCTATCGCAGATGCTACAAA	TACAGCTAAGCTTGATATTGCTAAT	199
59	3815F 3974R	CAGATGCTATAAAACTTTTACCA	TAAGCTTGATATTGCTAATATAAACA	185
60	3926F 4051R	TTCTCTACCAATGCCATA	GCTCTAGAGCTCCAATTAG	145
61	3950F 4136R	TTGTCAACATAAACCTTGGAGTA	GTAGAAAAGTGTAATGAGCCAT	208
62	4025F 4175R	GATGGGCTTCAAACTCAAAATAC	GGGAAAATTAGTCAGAGGTGCT	172
63	4104F 4272R	AGCCATTATTCTCTATCAGTCCTAC	AACCTGAGACTAATTCTGACTCTCT	194
64	4114F 4244R	CTCCTATCAGTCTACTAATGAATG	CAAAGGGGCTCGGTTAG	148

Primer pair	Primer position	Forward primer	Reverse primer	Amplicon, bp
65	4218F 4397R	ATGATTTATCTCCACTCTAGCAGAA	GGGGCTGTGAAATGCTC	196
66	4364F 4492R	TAATAAATGCCCTCACGACTATCC	TCGGAATCGGGGGTATGA	146
67	4459F 4593R	CTCCTAACAGCTTCTTCTATGA	AGGAGGAATGCTTGTGTGATA	156
68	4541F 4695R	ATTTCTACCCCTCACACTG	TTAAGATTAGGTTTCGATTCTATAA	179
69	4668F 4812R	GAGGTTAAAACTCTTATTTCTAG	GTACGGGAAGGGGATGAA	162
70	4791F 4910R	CCCATACCCCGAAAAATGTT	TTCAAAGCCAATTACAGATTATGAG	143
71	4886F 5007R	ATCGTTCTATTAGCTCCCACTG	CGGTGGCTTGTGTGAGGAAAT	142
72	4977F 5123R	ATCCACGGGCCATAGAAAG	TGCTAGGGCAATGGTGAT	164
73	5102F 5254R	AATCCAATCGCATCAACTGT	TGGATGGTGAAATTTGATATAGG	175
74	5228F 5317R	TGACAAAAAATCGCACCTCTAT	GTCCTCTCAGCCTCCTACTAAT	112
75	5228F 5337R	TGACAAAAAATCGCACCTCTAT	TCGGAGTTGAGTTTGGTTAGTC	132
76	5313F 5467R	CCGTATTAGTAGGAGGCTGAG	ACATGAATAGTATAAATGTCCTAGA	180
77	5345F 5455R	CAAACTCAACTCCGAAAAATC	AAATGTCCCTAAAGTTATTATGATG	135
78	5439F 5575R	TCAACCTCACAATCTACATCATAATA	GAGGCCGCTAGTGATAGT	155
79	5541F 5691R	TACCACTAATTGCCTCACTAATC	CGCATGTAGAAATAAAGGTTTAATA	175
80	5541F 5699R	TACCACTAATTGCCTCACTAATC	TAGGCGCATGTAGAAATAAAG	179
81	5666F 5813R	CCCATTATCATAGCCATCACAGC	GTATGTTGATGCTACGATTAGAGG	172
82	5720F 5881R	GCATACGCTACAGCACTAACAAAT	GCCCTGTGCTATTTTAGCCTA	183
83	5796F 5892R	AAATAATCTTCTACCCCTCTAA	CTTTGAAGGCCCTTGGTC	114
84	5824F 5980R	AGCATCAACCATACTTCTCACTAA	AGCGGTTGTTTTGCGTTCA	175
85	5949F 6085R	TAAGGACTGCAAGAGCATATCTCA	GCGGCGGGAGAAGTAGATT	155
86	6059F 6204R	GCTAAAAACCCCAACAAAC	TGTAAATCTAAGAATAGAGGTCAAGT	171
87	6059F 6224R	GCTAAAAACCCCAACAAAC	GGCTGATAAAAGTATTAGACTGTAAA	191
88	6179F 6318R	CACCACAGAGCTTGGCAAAAA	GGCTCATGCACCGAACAGA	158
89	6237F 6420R	GCTTTTATCAGCCATTTTACCT	ATGGGCAAGTTACGATTACATTG	205
90	6296F 6398R	AAGACATTGGCACCCCTTACC	ATCTGATCATCCCCAACA	121
91	6394F 6529R	GCCCTGTTGGGGGATGAT	ATTTATTCGAGGGAACGCTATGTC	159
92	6498F 6630R	CTGATTAGTGCCTTAATGATCG	GGGGGTAGACAGTTTATCCA	152
93	6592F 6766R	CTTCTGGCCTCCTCTATGGTA	TTGCAGGGGGTTTCATGTT	193
94	6610F 6722R	GTAGAACGACGTCGAGGAA	AATAGCTCCAGATAAGAGA	135
95	6649F 6762R	CCTCTAGCGGGAATCTG	GGGGGCTTCATGTTAATA	131
96	6732F 6883R	TCTGGGAGCTATTAATTTTCATCA	GTGTTAAGGTTTCGATCTGTAAGTAG	177
97	6857F 6995R	CAGTCTTAGCAGCTGGGATTACTAT	CCGAACCCAGGAAGGATTA	157
98	6857F 7007R	CAGTCTTAGCAGCTGGGATTACTAT	TGTGAGAGATCATTCCGAACC	171
99	6969F 7124R	CTTCGACATCCTGAGGTTTACA	ACCTACGTAACATGTGGTGAG	178
100	6969F 7145R	CTTCGACATCCTGAGGTTTACA	AAGCTCGTGTGTCAACGCTCTATAC	200
101	7095F 7254R	CATTGGATTCTTAGGATTATCG	TCATAGCGGGAGATCATTTA	179
102	7234F 7387R	ACTCTGCACGGAGGGAATA	TCCCATTGATAACACATAGTGAAA	177
103	7360F 7508R	CATGACACGTACTATGTGGTAGC	GAATGTCATGTTAACTCCAATGAATA	174
104	7468F 7616R	ACACTTAACAACACATGAGCAAAAAAT	TGAAATGAATGAGCCTACAGAAGATA	174
105	7552F 7657R	GGCCTGTGAGGAATACCTC	TCCCAAATCATGAAATTTATCAG	128
106	7624F 7775R	ATAGGCTCATTTATTTCACTAACAG	TTAGTGTGACGTAGGCAGGTTCTT	175
107	7624F 7775R	ATAGGCTCATTTATTTCACTAACAG	TATAACGTAGGCGGGTTCTT	171
108	7751F 7887R	GCCTCTCATATCATACATT	AACCTGACAAAGTTATGTAATTTT	162
109	7832F 7991R	TGGTTTCAAGCCAATATCATAAC	CATGAAAATGCAGAAGTTCCTCTAT	184
110	7965F 8101R	GCCTCAAGACGCAACTTCTC	CTTCTGTGCGTCCATTGTACTT	159
111	8071F 8211R	AACTATACTAACCAAAATTAACA	TTTACAGTTAGTGAGGGATTATTGA	165
112	8107F 8211R	AATGGACGCACAAGAGTAGAG	TTTACAGTTAGTGAGGGATTATTGA	129
113	8175F 8323R	TCCCATCACTACGGATCCTCTAT	CGCAATTCTCCAGGCTTTAGT	169
114	8191F 8334R	CCTCTACATGATGGATGAAGTCAATA	TCTACTTCTAATAGCCGAGTTCTC	168
115	8296F 8393R	TGACTCTTATATGATTCCGACACAA	TCTTCTGACGAGATCAGCATACG	120
116	8298F 8394R	ACTCTTATATGATTCCGACACAA	ATCTTCTGACGAGATCAGCATAC	119
117	8298F 8452R	ACTCTATATGATTCCGACACAA	CCTGGGATTGCATCAGTTTTT	175
118	8363F 8513R	CGAGTAGTGCTGCCCATAGAAA	TGAGCATTGGCCGTAATATAG	171
119	8492F 8641R	CTTATAGCCATGCGACCCAG	AACTTAAAAGGTTAACGCTATGTTA	174
120	8601F 8763R	AAGAATGATCCGCTTCAATACT	TTTGAGACTTTTAACTGGAGAATAAT	188
121	8611F 8757R	CGCCTCAATACTATAGAATCATTA	GACTTTTAACTGGAGAATAATAAATA	173
122	8687F 8842R	CTCCTTAATGAAGATGCCACAATA	TCATTTTCTTCTCAAGGCACAA	178
123	8731F 8876R	TTACAATTCTATCCATAGCTCTAACA	TGGGGTGATAAAAGAGGTAAA	166
124	8847F 8994R	CCTTGAGAAGAAAAATGAACGAAAA	AGCCGAACCTAGTCACTGTTGAA	169
125	8953F 9080R	TCCTTCTCCGAGTCGATTGA	TTGAGCCAATAAATAGGATTAGTGA	152
126	9053F 9202R	GGACAAACCTGGGCACTAATA	GGTCTTGATCGGAATCCAGTA	171
127	9125F 9276R	CCGCACTATTACACCTAC	TGTTTCGATAATTACGAGCATTG	174
128	9180F 9337R	CCTTGTTGGCAGGTACAGTC	GCCTGCAGTAATATTAGCGGTTAGT	182
129	9232F 9335R	CCTGGCTCACTTTACCTCAA	GCAGTAATATTAGCGGTTAGTCG	126

Primer pair	Primer position	Forward primer	Reverse primer	Amplicon, bp
130	9300F 9404R	TTAGCCTATTTATCCAACCTATG	AGGCTGTAATAGTGCTAATACTTGT	129
131	9325F 9492R	CTTGCCCGTGCGACTAAC	CTTACTAGCAGGGTAAAGACGTAGG	192
132	9379F 9492R	AATTGGGGGAGCTACCTTG	CTTACTAGCAGGGTAAAGACGTAGG	138
133	9379F 9533R	AATTGGGGGAGCTACCTTG	ATGTGTTTGGTGAGTCATTAAGTGTT	180
134	9468F 9591R	AGTTCGCTGTAGCCCTCATT	GCTGAGAGGGCTCCTGTTAGT	144
135	9468F 9595R	AGTTCGCTGTAGCCCTCATT	GGCTGAAAGGGCTCCTGT	145
136	9572F 9721R	TCAATCCAAGCCCATGAC	CCTTGAAATGTACTCTCTCGAATAAT	175
137	9573F 9703R	CAATCCAAGCCCATGACC	GTCCCGCCACCATTTGATA	148
138	9573F 9717R	CAATCCAAGCCCATGACC	GAAATGTACTCTCTCGAATAATGTCC	170
139	9685F 9839R	ACCAATATACTTACCATGTATCAATG	GCTAGGCTTGAGTGATAAAAAAG	176
140	9720F 9845R	CATTATTCGAGAGAGTACCTTTCAG	GTAGGTGCTAGGCTTGAGTGAT	147
141	9815F 9943R	TCTTCTTTCGAGGATTCTTCTG	CCGGATGCAAGAAGTACTGA	148
142	9889F 10019R	CCGCCACAGGTATTACTC	GAGATAGTAATGAATAGGGCCTGAA	155
143	9910F 10040R	CTGAATCCGCTAGAAGTGC	AGTGTGAAGTATACGCCTAGAGAGA	155
144	10000F 10108R	GGAAGCCGCAAGCACATA	AAAGTTGAGCCATAGACTCCATC	131
145	10082F 10228R	ACTATGAGGCATCTTCACTATT	CAAAGCCGAAATGGTGACT	165
146	10165F 10263R	ATCATTGGCTCAACTTTTCTCAC	GTCATACGACATCTACGAAGTGCAA	124
147	10170F 10313R	TGGCTCAACTTTTCTCACAGT	TAAAGAAGCAGGACCTCATC	164
148	10242F 10396R	CTTTGAAGCAGCAGCATGAT	GGTGAATAGTGCTAGGATTAAGTTG	179
149	10248F 10377R	AGCAGCAGCATGATATTGACACTTC	AAGTTGATTGCTTCTTCTGGAGCTG	154
150	10374F 10528R	GCGCAGTCCAGAAAGAAGCAA	GAAAAAGGGAGGCGTGCCGAT	175
151	10494F 10645R	CAAGCCCTATGAATGCGGGTTT	ACGCTATGGTGAGTATCGTTATT	174
152	10605F 10755R	TACTCTCCCTCTTCCCTGAGCA	AGTCGAAATCACTGTGTTTGTT	173
153	10725F 10871R	TAGAATGGGCGCAATATGATA	GGATATTAGATGGGATCGATAAA	169
154	10834F 10937R	TTCTTAGCATTCTTGTATCCCTAAT	ATTGTTTAAAACTGTTACTGTTAGCA	129
155	10907F 11041R	TAGAGGGTATAGTGCTATCCTTATTC	CCGTAAGTGTTGGAGACTATTACTAG	160
156	10907F 11046R	TAGAGGGTATAGTGCTATCCTTATTC	GTTCGTAAGTGTTGGAGACTATT	163
157	11017F 11092R	GAGGCAGCACTAGGACTGTC	AAGATGATTTTTAGCATTGTAAGAG	100
158	11017F 11092R	GAAGCAGCACTAGGACTGTC	AAGATGATTTTTAGCATTGTAAGAG	100
159	11065F 11196R	GGAACCTGACTATGTACAAAACCTC	TACGTCAAACCTGATGAGACTAATAAG	157
160	11156F 11290R	GCCCAATATAATTTGGATCAATA	CATGTTGTGAGGGCTAATAGAG	156
161	11156F 11294R	GCCCAATATAATTTGGATCAATA	GTAGTCATGTTGTGAGGGCTAAT	161
162	11157F 11290R	CCCAATATAATTTGGATCAATACA	CATGTTGTGAGGGCTAATAGAG	155
163	11263F 11394R	TATTCCTTACCGACTCCCTATCAG	TCAGGAGTAATTTGAGGAGCTATAG	156
164	11355F 11516R	AAGGAACTCTGACCCGAAAG	CCGCTTTAGTCGTTCTGTT	181
165	11481F 11594R	CCCACTCTGGTTATTATCACTCG	AGCCTAGATTTATTTGGGTGTGT	136
166	11569R 11693R	CTTTGCCATTACTAATTGCACTAC	TTTTACCATAAATGCCATTATACAC	149
167	11657F 11818R	GCCAACTCCTGATCCAGTATCT	TGTAATTCGTATCATGCCGTAGC	184
168	11665F 11818R	CCTGATCCAGTATCTTCTATGACT	ATTCGTATCATGCCGTAGC	172
169	11793F 11918R	GCTGCCGTACTCTAAAACCTA	TTGGCGTAGGCAGATAGAA	144
170	11878F 11993R	CCTTCATAACTCTCGCTATGG	GGGGTTTGGATTAATACTGGTACA	139
171	11970F 12101R	GTCAGTCACATGGCCCTAGT	CGGCTATGGATTCTGTTCA	149
172	12075F 12211R	CTATTCGTCTTGCAAACCTCAACT	TTCTCCGATAAGGTTGATGGTAG	159
173	12181F 12305R	TAGCAAGTCTCACTAACCTAGCAC	GTAGAGGGAGTAGAGGGCAGTA	146
174	12274F 12358R	CCATCACTCTAATAGGAACCAACAT	GGTTTAATACTTTTGACGTGGTCTG	109
175	12318F 12438R	TCCCTCTACATACTAATCACCACACA	GAATTATTTGGGGTTAAGGGATAG	145
176	12392F 12538R	ACGAGAAAAACGCCCTGATAG	CTTGCGTACTTTTTCGGTAAATAA	170
177	12392F 12542R	ACGAGAAAAACGCCCTGATAG	GTTCCTGCGTACTTTTTCGGTAA	173
178	12511F 12622R	AATCTAATAATAAAAGCCCAAGTC	GGTCTCTAAGACCAATGGATTACT	135
179	12590F 12754R	AATCATGGGCTTTTCAACTTTTA	TGTGGGTAGGATTATTTTGTG	187
180	12705F 12874R	AACCTTGCTCATATTAACGATACC	TTAGGGTTTGAATAGTTATTCAATG	194
181	12830F 12962R	TGATATTCCTTACTCAGGGCAAGA	GAAAAATCCATGATTGATCATGTGA	157
182	12942F 13095R	CATGCCAGTAGCCCTGTTT	TCCTTCTCAGCCGATGAAT	172
183	12946F 13082R	CCAGTAGCCCTATTCGTACA	CAGCCGATGAATAGTTGAAATAGAT	161
184	13066F 13192R	CTAGTGACCGCAAATAATCT	TCTCCGATGCGATTGTATAG	146
185	13154F 13277R	GACGAATAGACGCCAACACAG	GGTTTTCATGTTCAATTGCAAAGA	147
186	13169F 13351R	ATACAGCCGCTCTACAAG	TGGATGAAGGCCGAATTG	200
187	13249F 13351R	AATACAAATGCATGAGACTTCCAACA	TGGGTGAAGGCCGAATTG	120
188	13326F 13482R	CCTAGCAGCACTGGAAAAT	GGCTGTTTGGATAGTCTTGTTG	178
189	13330F 13482R	GCAGCCAATGGAAAATCA	GGCTGTTTGGATAGTCTTGTTG	174
190	13441F 13627R	GGGGTATTTCTCTAATCCGATTTT	TGCTAGGTGAGGCTGATTAATTCC	210
191	13459F 13618R	CGATTTTACCCCTTGATAGAAC	GGCTGGTTAATTCCAATTGTTAC	182
192	13594F 13760R	TCAAGCCAGCTAGGACTAATAATCG	GGTAAGTGGCAGGGCTTTGAATA	189
193	13598F 13760R	GCCAGCTAGGACTAATAATTGTAACA	GGTAAGTGGCAGGGCTTTGAATA	185
194	13732F 13832R	GAACAAGACATCCGAAAAATAG	TTAGGTCCTTAGAGTAGAATCCTGTTA	127

Primer pair	Primer position	Forward primer	Reverse primer	Amplicon, bp
195	13803F 13927R	AGCTCTAGCACTCACAGGCATAC	GAGTACTGTAGGCAGCGGTTAT	146
196	13891F 14001R	GCCTGAGCCCTACTAACAACTCT	AGGAGAGGGTTATTCTCGTTGATA	134
197	13892F 14002R	CCTGAGCCCTACTAACAACT	AGAGGGTTATTCTCGTTGAT	130
198	13892F 14058R	CCTGAGCCCTACTAACAACT	TTAGGTATCCTGCGAAAAATA	186
199	13966F 14077R	CTTCTAGGACAACCTCGCTTTA	TAGTGGGTGTAATATTGTGGAAGAT	136
200	14049F 14201R	TCTAGGAAGTATTTTCGAGGATAC	TGTGGGTAGTCAAGTTTGAGAGTTT	177
201	14163F 14300R	AGGTTTTATCCTGGCATTAGAA	CCATTTTTGGCTTATTGATA	158
202	14274F 14396R	TCACCGCTCTGCCAATAATG	GTCCTTTCTGGTTAGAGACTGTGATTG	149
203	14336F 14479R	ACGCAATCTGACTAGAAAATGTACT	GGAAGTCACTCGTGAAATTAAG	166
204	14369F 14552R	CTATCTCTATTTCCAAATAAAATCT	GGCTTTATACAGTTATGGAACCTGA	208
205	14471F 14565R	TCTTTGTACTTAATTTCCACGAGTGA	TAGGGATTGCGGCTTTATACAG	116
206	14517F 14610R	CCAATAAGAAGAGATCACCCAGTG	TAATTTATGATACGGGGGATTC	115
207	14585F 14725R	TATGGCTTCCTCACTAAAAAAC	AGCTGTATTAGGTGCATTTATCG	163
208	14693F 14844R	ACAGGCAATCAATAGCTCAGACAAT	TGGGGGGTCTTTTTAGGTTTAAT	175
209	14693F 14846R	ACAGGCAATCAATAGCTCAGACAAT	TTGGGGGGTCTTTTTAGGTTTA	176
210	14812F 14953R	CAAGTATCCCAACCCCAATAAACTA	ACTATCTTTGTGATGGGTTTGTAG	166
211	14886F 14998R	CACCCAAACCCCCCACTA	GACTCCATGTGAGAATAATGATAATGT	139
212	14886F 15039R	CACCCAAACCCCCCACTA	AAGTACAACGGTGATTTTTCATGTC	178
213	14888F 14998R	CCCAACACCCCCCACTAAT	GACTCCATGTGAGAATAATGATAATGT	137
214	14949F 15081R	AACCTTACAAAACCCATCACAA	GTTTTTCGGATGTTGGTCAT	152
215	15039F 15135R	GACATGAAAAATCACCGTTGTACTT	TGATGGTGTGGGAGGTCAAT	117
216	15081F 15224R	ATGACCAACATCCGAAAAAC	TAGTGTATGGCTAGAAACAGG	164
217	15159F 15297R	ATCTCAGCATGATGAAACTTTG	GGATAACTCAACCGTAGTGAAAC	160
218	15159F 15369R	ATCTCAGCATGATGAAACTTTG	AGTACAGGCCCCGTCTACGTG	232
219	15268F 15369R	TTTCATCAATCACCCATATTTGC	AGTACAGGCCCCGTCTACGTG	123
220	15331F 15448R	CAAAACGGAGCCTCCATATTCT	CTATGAATGCGGTGGCTATGA	138
221	15417F 15525R	TGAAACATTGGCATTATTCTCC	ATAGGGAATGGCCGATAGTAG	129
222	15475F 15626R	TCCTACCTGAGGCCAAATGTC	GATGATGAACGGGAGAATAAAG	173
223	15592F 15736R	ATAAGGCAACTCTAACACGATTCT	CTTAATTGTATAGTATGGGTGAAATG	170
224	15701F 15843R	CCCCTCTGGAATCCCATCTG	GGGTTTGGGGGGGTATAGTT	162
225	15808F 15926R	TCCTATTCTCGCTGACTTACT	TCCTCCTAGTTTGTAGGGATAAAT	143
226	15812F 15904R	ATTCTCGCTGACTTACTAGGA	CGTAGGATAGCGTAGGCCAAATA	114
227	15881F 16036R	CATCAAAACCCGAGTGGTACTT	TCAGAATAGGCATTGGCTTAGAG	178
228	15918F 16039R	ATCCTACGATCTATCCCTAACAAAC	AGTCAGAATAGGCATTGGCTTA	143
229	16003F 16174R	ACACATCCAAACAACGAGGAATGA	CAATAATTCCAGCGATGGGTATGA	195
230	16036F 16154R	CTCTAAGCCAATGCCTATTCTG	ATGAGTACTAGGGGGATTGTAAAG	142
231	16148F 16288R	TCTCTACTTTACAATCCCCCTAGT	GGAGCTGTTGCTTCTCCTTGAGT	164
232	16180F 16332R	CCATCGCTGGAATTATTGAA	CCAGGGAATAGTTTAAGTAGGACAT	177
233	16305F 16477R	CAGCTCCACTATCAGACCCAAAGC	GGGCACGCCATTAATGCACG	192
234	16337F 16477R	CTACTTAACTATTCCTGGTACATAC	GGGCACGCCATTAATGCACG	160
235	16409F 16529R	TGTACTGTACCATCATAGTATGTCC	TTTTGAGATGTAAGTCCTCATGTAAGA	147
236	16488F 16584R	GGCGTGCCCCATGCATAT	CCCGGACTAAGTGAAATACAT	117
237	16492F 16592R	TGCCCCATGCATATAGGC	TAAGCTCCCGGACTAAGTG	119
238	16492F 16650R	TGCCCCATGCATATAGGC	CCGGAGCGAGAAGAGGTACAC	179
239	16546F 16679R	CATCTCAAAGTTTATTCAAGTGTA	AACATAGAAACCCCCACATT	153
240	16597 F 16679 R	AGTCCGGGAGCTTAATCAC	AACATAGAAACCCCCACATT	102
241	16597F 16721R	AGTCCGGGAGCTTAATCAC	CATGGCCCTGAGGTAAGA	142
242	16679F 42R	AATGTGGGGGTTTCTATG	AGTCCCCCCTAAAAAT	191
243	16696F 29R	GTTGAACTATACCTGGCATCTG	CCCCTAAAAATTAAGATACCAA	167
244	16696F 36R	GTTGAACTATACCTGGCATCTG	TCCCCCCTAAAAATTAAG	171
245	16802F 125R	TCAGCCCATGATCACATATA	CCCGACCCGTGAAAGATA	151

The position of each forward (F) and reverse (R) primer is numbered according to the *Us18* mitochondrial genome sequence.

Table S2. Oligonucleotide primers used for PCR amplification of brown bear mitochondrial genome fragments

Primer pair	Primer position	Forward primer	Reverse primer	Amplicon, bp
1	170F 600R	TCAATGGTCGACGACATATAGTA	GGCAAGACAACCATAAATGTG	451
2	555F 686R	CTTAATCAAACCCCTTACC	TATTTGGCTGGGAATTTAGCTTAT	156
3	614F 785R	TCCTGCCAAACCCCAAAAA	GATAATAACGGAAAAATCAATAGGA	196
4	555F 1117R	CTTAATCAAACCCCTTACC	CTTTCGTTTCATGGCTTAATTTTT	585
5	614F 1311R	TCCTGCCAAACCCCAAAAA	GAGAGCATTAAAGTCACTTTCGTAGC	723
6	951F 1117R	GCCTTCCCATTAGCTACTAACAA	CTTTCGTTTCATGGCTTAATTTTT	189
7	951F 1420R	GCCTTCCCATTAGCTACTAACAA	GCTAGTAGTTCTCTGGCGAATAA	492
8	1270F 1420R	TTTAATCCAGCTGTAAAAAGCTATC	GCTAGTAGTTCTCTGGCGAATAA	173
9	1270F 1553R	TTTAATCCAGCTGTAAAAAGCTATC	TTGCTGAAGATGGCGGTATA	303
10	1270F 1617R	TTTAATCCAGCTGTAAAAAGCTATC	ATGGGTTACACCTTGACCTAACTT	371
11	1270F 2122R	TTTAATCCAGCTGTAAAAAGCTATC	AGGAGGGGTAATCTTGTCTGT	874
12	1963F 2475R	AACCCAGAGCTAGCCAGATAA	TTAATTGATGGCTGCTTCTAGG	534
13	2421F 2927R	GAATCAAGGATACAGCCTTACTT	CGTGTGGCCTTTCATACAA	525
14	2772F 3284R	GAACTCGGCAACACAAAC	ATCCAACATCGAGGTCGTAA	532
15	2883F 3164R	GACCGTGCAAAGGTAGCATAA	GTGAGCATTTTGACTGGTACGTCTA	306
16	3133F 3599R	AGTACAAAATAAAGCTCCGAGTGAT	CATAGTGTTAGGGAGAGGATTGAA	491
17	3257F 3794R	TTTAAGAGTCCATATCGACAATAGGG	AGTGGGCGCAAGGGTTCT	555
18	3761F 4226R	ACCTATCGCAGATGCTACAAA	AACCTGAGACTAATTCTGACTCTCCT	491
19	4202F 4864R	CCGAGCCCCCTTTTGACCTA	TTCAAAGCCAATTGAGATTATGAG	686
20	4745F 5271R	CCCATACCCCGAAAAATGTT	GTCCTCTCAGCCTCTACTAAT	549
21	5182F 5835R	TGACAAAAAATCGACCTCTAT	GCCCTTGGTCTATTTAGCCTA	674
22	5750F 6373R	AAATAATCTTCTACCCCTCTAA	ATGGGCAAGTTACGATTACATTG	645
23	6346F 6947R	GGCTCTGTTGGGGGATGAT	CCGAACCCAGGAAGGATTAG	621
24	6922F 7508R	CTTCGGACATCCTGAGGTTTACA	GCCGAGGTATTCTGACAG	605
25	7463F 7839R	TTTCATCGGGGTTAATATGAC	CCCTGACAAAGTTATGTAATTTTAA	401
26	7785F 8405R	TGGTTTCAAGCCAATATCATAAC	CTGGGATTGCATCAGTTTTT	641
27	8316F 8947R	CGAGTAGTGCTGCCATAGAAA	AGCCGAAGTACTGCTGTTGAA	653
28	8684F 9155R	TTACAATTTATCCATAGCTCTAACA	GGTCTTGATCGGAATCCAGTA	493
29	9130F 9550R	TTCCCTTATGGGCAGGTACA	GAGGGCTGAGAGGGCTCT	439
30	9529F 10068R	CCCCAGCCCATGACCACTA	TATGAAAAAAGTTGAGCCGTAGA	562
31	10035F 10708R	ACTATGAGGCATCCTTCACTATT	AGTCGAAATCACTGTTTTGGTT	696
32	10678F 10922R	TAGAATGGGCGCAATATGATA	GATAGGAGCTATATTAGCCAGTGT	268
33	10785F 11547R	TTTTCTTAGCCTTCATTGTATCC	AGCCTAGATTATTTGGGTGTGT	785
34	11487F 12148R	GGGCCTTTACTTTCTGTTTTA	TGGTAGGAGGGAGTGATAGATT	683
35	12110F 12575R	CACCTATGGCAGCTTGATGAC	GGTTCCTAAGACCAATGGATTACT	489
36	12464F 12707R	AATCTAATAATAAAAGCCCAAGTC	TGTGGGTAGGATTTATTTTGTG	266
37	12464F 12827R	AATCTAATAATAAAAGCCCAAGTC	TTAGGGTTTGAATAGTTATTCAATG	388
38	12464F 12932R	AATCTAATAATAAAAGCCCAAGTC	GTGTGTATGTATCAAAATGGAAAACTC	494
39	12464F 13145R	AATCTAATAATAAAAGCCCAAGTC	TCTCCGATGCGATTGTATAG	701
40	12543F 13304R	AATCATGGCTTTTTCACTTTTA	TGGATGAAGGCCGAATTG	779
41	12658F 12827R	AACCTTGCTCATATTAACGATACC	TTAGGGTTTGAATAGTTATTCAATG	194
42	13279F 13571R	CCTAGCAGCCACTGGAAAAAT	GGCTGGTTAATTCCAATTGTTAC	315
43	13279F 14004R	CCTAGCAGCCACTGGAAAAAT	GGTATCCTGCGAAAAATACTTCTA	749
44	13811F 14349R	ATTATCGAAACCGCCAACACG	GTCTTTCTGGTTAGAGACTGTGATTG	565
45	14227F 14797R	TCACCGCCTCTGCCAATAATG	TGGGGGGTCTTTTTAGGTTTAA	594
46	14662F 15112R	TCAGATAATAGACCCACGATAAATG	CAAAGTTTCATCATGCTGAGAT	472
47	14992F 15478R	GACATGAAAAATCACCGTTGTACTT	ATAGGGAATGGCCGATAGTAG	507
48	15333F 15836R	GGGCTGTACTATGGCTCATA	AGAAAGTACCACTCGGGTTTGA	525
49	15654F 16241R	CCCCTCTGGAATCCCATCTGAC	GGAGCTGTTGCTTCTCTGAGT	611
50	16133F 16527R	CCATCGCTGGAATTATTGAA	CCCGGACTAAGTGAAATACAT	415
51	16258F 16593R	CAGCTCCACTATCAGCACCCAAAGC	CCGGAGCGAGAAGAGGTACAC	356
52	16435F 207R	TGCCCCATGCATATAAGC	TGCGTCGTTCTGTCGATT	544

The position of each forward (F) and reverse (R) primer is numbered according to the Guzet *Ursus arctos* mitochondrial genome sequence.

Dataset	PhyML	MrBayes
ND2 (1,041 nt)		
ln(Likelihood)	−3521	
α parameter	0.31	
Proportion of invariant	0.14	
Transition vs. transversion	26.2	
ND3 (345 nt)		
ln(Likelihood)	−1324	
α shape parameter	0.54	
Proportion of invariant	0.33	
Transition vs. transversion	23.9	
ND4 (1,377 nt)		
ln(Likelihood)	−5064	
α parameter	2.98	
Proportion of invariant	0.56	
Transition vs. transversion	34.5	
ND4L (294 nt)		
ln(Likelihood)	−1150	
α parameter	0.44	
Proportion of invariant	0.19	
Transition vs. transversion	4.48	
ND5 (1,827 nt)		
ln(Likelihood)	−7024	
α parameter	0.27	
Proportion of invariant	0	
Transition vs. transversion	22.8	
ND6 (525 nt)		
ln(Likelihood)	−1980	
α parameter	3.62	
Proportion of invariant	0.52	
Transition vs transversion	2.04	

The table displays statistical results obtained from analyses with PhyML and MrBayes. Gene by gene analyses were only conducted with PhyML. The size of each dataset in nucleotides (nt) or amino acids (aa) is indicated.

Other Supporting Information Files

[Fig. S1.](#)

[Fig. S2.](#)

1.3. Comparaison avec les autres séquences d'ours anciens

Un autre génome mitochondrial complet d'ours des cavernes a été déposé dans la banque GenBank quelques mois après celui de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc et publié la même année. L'échantillon étudié provient d'une grotte autrichienne (Gamssulzen) et a été daté à 44 000 ans BP (Krause *et al.*, 2008). En parallèle, cette équipe a également étudié une autre espèce ursine disparue, l'ours à face courte, *Arctodus simus*, grâce à un calcaneum âgé de 22 000 ans, provenant de Eldorado Creek au Canada.

Leur approche a été différente de la nôtre car les auteurs ont choisi d'amplifier l'ADN ancien par deux étapes de PCR multiplex. La séquence obtenue sur l'ours des cavernes de Gamssulzen est très proche de celle de Chauvet-Pont d'Arc. En excluant la région composée d'un motif répété dans la région de contrôle mitochondrial, les deux séquences ne diffèrent qu'à 221 positions, ce qui est dû au fait que les deux ours appartenaient à des lignées différentes.

L'ours des cavernes et l'ours à face courte ne sont pas les seuls Ursidés à avoir été étudiés en ADN ancien. En effet, une mâchoire d'ours polaire, conservée dans le permafrost, a également fourni un génome mitochondrial complet (Lindqvist *et al.*, 2010). Cet échantillon est daté, sur des critères stratigraphiques à environ 110 000 à 130 000 ans, soit peu de temps après la séparation supposée de cette espèce des autres lignées d'ours bruns. Le génome mitochondrial a été séquencé en utilisant la méthode 454 de séquençage, avec une profondeur moyenne de lecture de 14.

Six génomes mitochondriaux d'ours bruns et polaires actuels supplémentaires ont été séquencés lors de cette étude pour connaître précisément les relations phylogénétiques au sein de ce clade.

Nous avons donc utilisé ces nouvelles séries de données (Krause *et al.*, 2008; Lindqvist *et al.*, 2010) pour vérifier si les conclusions auxquelles nous étions parvenus dans notre article étaient toujours valides.

Pour comparer la position phylogénétique des deux ours des cavernes, nous avons aligné les séquences mitochondriales d'ours actuels et éteints, disponibles dans la banque de données GenBank *nt*. Un arbre phylogénétique a été reconstruit par une méthode de maximum de

vraisemblance et une méthode bayésienne, en utilisant les paramètres décrits dans (Bon *et al.*, 2008)

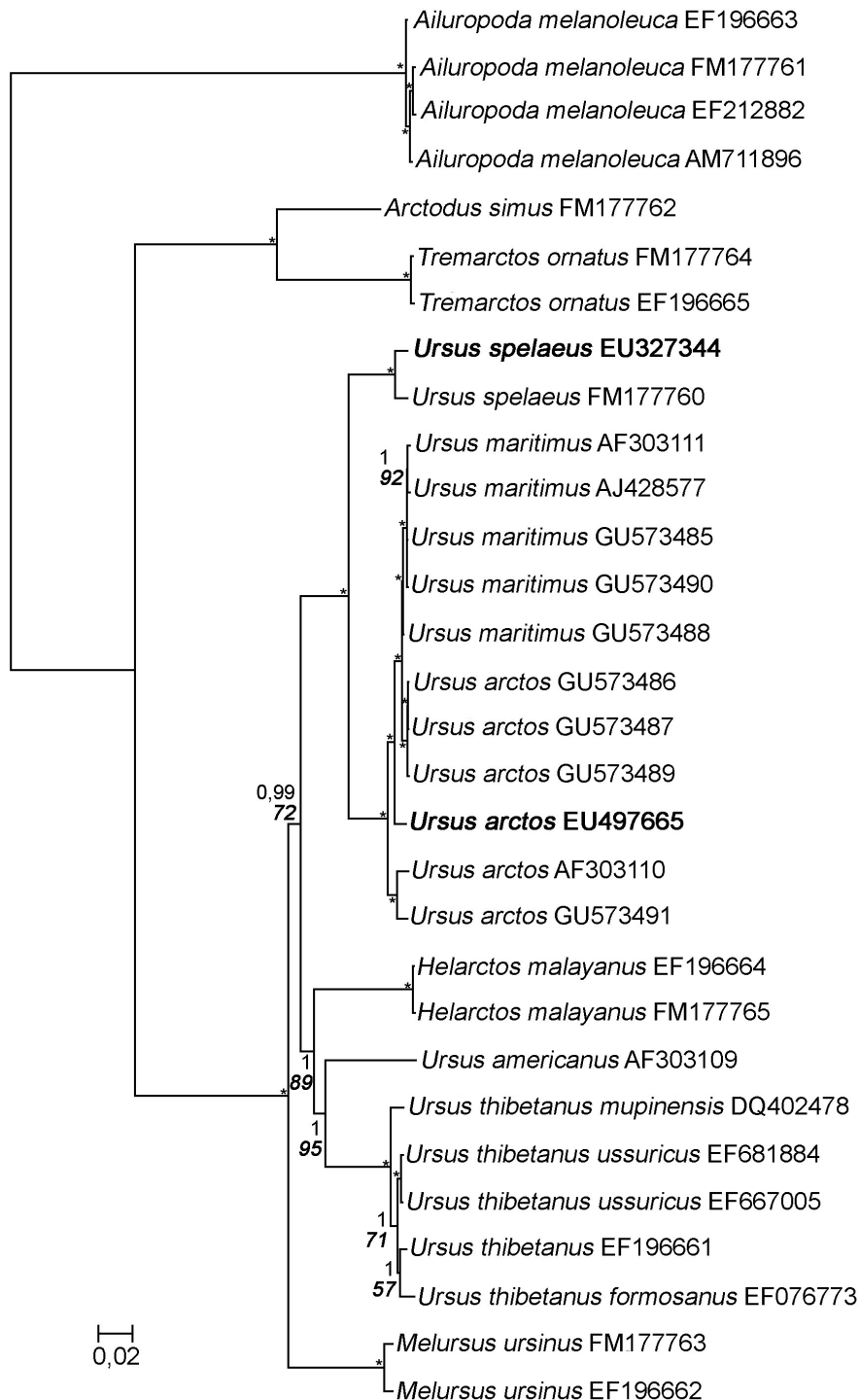


Figure 26 : Arbre phylogénétique utilisant les génomes mitochondriaux complets d’Ursidés actuels et éteints, enraciné avec les séquences de génomes mitochondriaux de panda. Les valeurs de probabilité a posteriori et de bootstrap maximales sont indiquées par une astérisque. Les caractères en gras indiquent les séquences publiées dans Bon et collaborateurs. (Bon *et al.*, 2008)

Cet arbre phylogénétique (Figure 26) montre que les deux séquences d'ours des cavernes sont proches, et forment un groupe monophylétique. Les ours bruns et les ours polaires sont également associés, avec *U. arctos* formant une espèce paraphylétique par rapport à *U. maritimus*. Les deux lignées spéléoïdes et arctoïdes sont sœurs, mais clairement différenciées. Cet arbre valide donc les conclusions que nous avons obtenues dans (Bon *et al.*, 2008) en utilisant moins de séquences.

Les génomes mitochondriaux permettent de calculer les dates de divergence entre les différentes espèces d'Ursidés. Nous avons proposé que la divergence entre les lignées spéléoïdes et arctoïdes remontait à 1,6 million d'années (Bon *et al.*, 2008). La date de divergence entre *U. spelaeus* et *U. arctos* a également été étudiée par l'équipe de M. Hofreiter, en utilisant la séquence obtenue à partir de l'échantillon d'ours des cavernes de Gamssulzen. Bien que cette séquence soit très proche de celle décrite pour le spécimen de Chauvet-Pont d'Arc, les résultats obtenus pour les dates de divergence entre les lignées spéléoïdes et arctoïdes sont différentes. En effet, Krause (Krause *et al.*, 2008) suggère que cette divergence a lieu il y a 2,75 Ma (2,1 – 3,6). Il propose également que la radiation des Ursinés s'est produite il y a environ 5 Ma, à la limite entre le Miocène et le Pliocène. Nous trouvons que cette radiation a eu lieu autour de 3 Ma.

La principale divergence entre l'approche de Krause et collaborateurs et la nôtre réside dans le choix des nœuds pour calibrer l'horloge moléculaire. Alors que nous avons sélectionné la divergence entre le panda et les autres Ursidés (12 Ma +/- 1 Ma) et entre les Trémarchtinidés et les Ursinés (6 +/- 0,5 Ma) (Wayne *et al.*, 1991), ils ont choisi une divergence beaucoup plus ancienne, correspondant à la séparation des lignées menant aux ours et aux phoques (33,9 Ma). Ils ont de plus ajouté une datation minimale (4,2 Ma), qui correspond au plus ancien fossile attribué au genre *Ursus*, et une date maximale (7,1 Ma), qui correspond aux plus récents fossiles appartenant au genre *Ursavus*, pour borner l'apparition du genre *Ursus*. Ces résultats montrent l'importance du choix des nœuds et des dates de calibration dans le calcul des dates de divergences, car ils peuvent influencer fortement les résultats finaux.

Dans l'article qui décrit le séquençage du génome mitochondrial d'un ours polaire ancien, Lindqvist et collaborateurs (Lindqvist *et al.*, 2010) ont choisi une autre approche : ils ont calculé les dates des divergences en se fondant sur l'âge de leur échantillon (120 000 ans), et non sur un point de calibration fossile ancien. En utilisant une approche différente de la nôtre, ils obtiennent des dates de divergences voisines. En effet, la séparation entre la lignée

conduisant aux ours bruns et polaires, et celle conduisant aux ours des cavernes est datée à 1,4 (1,0-1,9) Ma, et la radiation des Ursinés à 2,6 (1,9-3,42) Ma.

1.4. Conclusion

Le séquençage du génome mitochondrial complet d'un ours des cavernes de Chauvet-Pont d'Arc a été permis par la préservation exceptionnelle de l'ADN dans certains échantillons de cette cavité. Grâce à cette séquence, nous avons pu reconstituer la phylogénie de l'ours des cavernes et proposer la date de divergence entre les lignées spéléoïdes et arctoïdes. La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature met en évidence l'impact que peut avoir le choix des nœuds et l'ancienneté qui leur est attribué dans le calcul des dates de divergences des espèces en utilisant les données moléculaires. La date de divergence proposée par Krause et collaborateurs (Krause *et al.*, 2008) n'est pas validée par une approche indépendante (Lindqvist *et al.*, 2010) et n'est plus retenue par les auteurs eux-mêmes (Hofreiter & Stewart, 2009).

La qualité de la préservation de l'ADN dans la Grotte Chauvet-Pont d'Arc nous a conduit à envisager une analyse à plus grande échelle de la diversité des haplotypes mitochondriaux chez les ours de cette cavité, et plus généralement des Gorges de l'Ardèche.

2. ANALYSE GENETIQUE DES POPULATIONS D'OURS DES CAVERNES DE LA VALLEE DE L'ARDECHE

2.1. Introduction

À partir du moment où un fragment du génome mitochondrial a été connu pour l'ours des cavernes, des questions portant sur la diversité géographique et temporelle des populations d'ours ont pu être abordées. Deux approches sont utilisées.

La première consiste à étudier des échantillons issus d'un grand nombre de sites en Europe et en Asie. Cette approche a permis de montrer que les haplotypes mitochondriaux d'ours des cavernes forment plusieurs lignées, considérées comme des haplogroupes, nommés de A à D (Orlando *et al.*, 2002), ou considérés comme des espèces ou sous-espèces, appelées *U. spelaeus*, *U. ingressus* et *U. deningeri kudarensis* (Knapp *et al.*, 2009; Stiller *et al.*, 2009; Stiller *et al.*, 2010). Les analyses ne portant que sur le génome mitochondrial, elles ne permettent pas de savoir si ces clades correspondent à des populations différenciées, ou si la séparation ne concerne que la lignée maternelle.

Cette approche a pu montrer que les divisions effectuées sur des critères morphologiques entre les ours des cavernes de petite taille et de grande taille ne correspondaient pas à des individus provenant de lignées maternelles différentes (Hofreiter *et al.*, 2002). L'étude génétique d'un échantillon d'*U. spelaeus deningeroides* provenant de la Grotte d'Azé montre que la séquence mitochondriale qu'il possède appartient à l'un des haplogroupes d'*U. spelaeus*, ce qui renforce l'hypothèse paléontologique qui fait d'*U. spelaeus deningeroides* l'ancêtre d'*U. spelaeus* (Orlando *et al.*, 2002).

L'analyse génétique de spécimens provenant de grottes éloignées a également montré que des flux de gènes pouvaient se produire à très grande distance. En effet, des haplotypes mitochondriaux identiques sont retrouvés dans des grottes parfois éloignées de plusieurs centaines de kilomètres (Hofreiter *et al.*, 2002; Orlando *et al.*, 2002; Hofreiter *et al.*, 2004a; Hofreiter *et al.*, 2007).

La seconde approche consiste à analyser un nombre important d'échantillons de chaque site, pour mieux appréhender la manière dont évolue une population au cours du temps et les relations entre les différentes populations d'ours d'une même région.

Les échantillons peuvent provenir soit d'une seule cavité, comme la grotte Scladina dont des échantillons retrouvés dans des couches archéologiques datées de 130 000 à 40 000 ans ont été analysés (Orlando *et al.*, 2002), soit de deux ou trois cavités, situées dans la même région. Ainsi, vingt échantillons issus de trois sites de la même vallée (HohleFels, Geißenklösterle et Sirgenstein) et seize échantillons provenant de deux grottes (Ramesch et Gamssulzen) des Alpes autrichiennes éloignées de 10 km (Hofreiter *et al.*, 2004a) ont été analysés dans cette optique (Hofreiter *et al.*, 2007). Cette dernière étude montre que deux populations d'ours des cavernes hibernant dans des cavités voisines pouvaient ne pas se croiser durant plusieurs millénaires.

Cette approche a également permis d'étudier les facteurs pouvant affaiblir les populations d'ours des cavernes. La population de Scladina connaît une diminution de la diversité génétique durant les périodes froides, alors que celle-ci augmente durant les périodes plus chaudes (Orlando *et al.*, 2002). Dans la Vallée d'Ach, où se trouvent les sites de HohleFels, Geißenklösterle et Sirgenstein, un haplotype mitochondrial présent depuis des milliers d'années est remplacé brutalement par un autre, il y a 28 000 ans BP. Or, c'est à cette date que remontent les plus anciennes traces d'occupation humaine, ce qui conduit les auteurs à supposer une intervention de l'homme dans la disparition de la première lignée d'ours des cavernes (Hofreiter *et al.*, 2007).

Ces résultats permettent d'envisager plusieurs causes de la disparition de l'ours des cavernes.

Plus sensible que l'ours brun aux climats froids, il aurait pu mal supporter les variations importantes de températures de la fin du Pléistocène (D'Errico *et al.*, 2001). Il aurait également pu se trouver en compétition avec les hommes pour l'occupation des cavités durant l'hiver.

Les nombreuses données concernant la génétique des ours des cavernes permettent d'estimer la taille de la population effective au cours du temps, et de la comparer avec celle de l'ours brun, toujours présent (Stiller *et al.*, 2010). La taille de la population effective a été calculée par inférence du taux de coalescence des lignées au cours du temps pour les deux espèces. Elle montre que la population effective de l'ours des cavernes diminue, alors que celle de l'ours brun reste constante. Cependant, cette diminution commence il y a environ 50 000 ans.

Cette analyse semble mettre hors de cause l'homme moderne dans la diminution de la diversité génétique de l'ours des cavernes.

Afin d'étendre les informations publiées dans notre premier article et notamment de s'intéresser à la diversité génétique régionale de l'ours des cavernes, nous nous sommes tournés vers les ours présents dans les grottes de Chauvet-Pont d'Arc et des Deux-Ouvertures. Ces deux grottes sont en effet considérées par les paléontologues comme des grottes à ours, ayant servi de tanière pour hiberner à de nombreuses reprises. Elles ont également été occupées par les hommes, qui ont orné leurs parois. Ces deux sites permettent donc d'étudier la population ursine dans un contexte de compétition possible avec l'Homme pour l'utilisation des ressources naturelles.

Les ours des cavernes de la Grotte Chauvet ne peuvent pas être étudiés par les paléontologues, car les manipulations des échantillons sont limitées. L'analyse génétique et la datation d'échantillons des deux grottes permettent de vérifier si ces deux populations sont proches génétiquement et temporellement, et si les conclusions obtenues sur les spécimens de la Grotte des Deux-Ouvertures peuvent être étendues à ceux de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc.

2.2. *Résultats : Article 2*

Article n°2 :

LOW REGIONAL DIVERSITY OF LATE CAVE BEARS MITOCHONDRIAL DNA AT THE TIME OF CHAUVET AURIGNACIAN PAINTINGS. Bon C., Berthouaud V., Fosse P., Gély B., Maksud F., Vitalis R., Philippe M., van der Plicht J., Elalouf J.-M. Journal of Archaeological Science 38:1886-1895, 2011.

Low regional diversity of late cave bears mitochondrial DNA at the time of Chauvet

Aurignacian paintings

Céline Bon^a, Véronique Berthoud^a, Philippe Fosse^b, Bernard Gély^c, Frédéric Maksud^d, Renaud Vitalis^e, Michel Philippe^f, Johannes van der Plicht^{g, h}, and Jean-Marc Elalouf^{a,*}

^aInstitut de Biologie et Technologies de Saclay, Service de Biologie Intégrative et Génétique Moléculaire, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France; ^bCNRS UMR 5608, Université Toulouse le Mirail, 31058 Toulouse cedex 1, France; ^cService régional de l'archéologie, DRAC Rhône-Alpes, 69283 Lyon, France; ^dService Régional de l'Archéologie, 32 rue de la Dalbade, BP811 31080 Toulouse cedex 6, France; ^eCNRS-INRA UMR CBGP (INRA—IRD—CIRAD—Montpellier SupAgro), Campus International de Baillarguet, CS 30016, F-34988 Montferrier-sur-Lez Cedex, France; ^fCentre de Conservation et d'Étude sur les Collections, 13A rue Bancel, 69007 Lyon, France; ^gRadiocarbon Laboratory, Groningen University, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, Netherlands; ^hFaculty of Archaeology, Leiden University, P.O. Box 9515, 2300 RA Leiden, Netherlands.

*Address correspondence to:

Jean-Marc Elalouf

Institut de Biologie et Technologies de Saclay, Service de Biologie Intégrative et Génétique Moléculaire, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France

jean-marc.elalouf@cea.fr

Tel: (33) 1 69088022

Fax: (33) 1 69084712

Key words: ancient DNA; Chauvet-Pont d'Arc Cave; Deux-Ouvertures Cave; mitochondrial D-loop; radiocarbon dating; *Ursus spelaeus*

Abbreviations: AMS, accelerator mass spectrometry; bp, base pair; BP, Before Present; GrA, Groningen laboratory code; numts, nuclear copies of mitochondrial sequences.

Data deposition footnote: The cave bear nucleotide sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank database (accession numbers AY616447, AY836000, DQ398002 and HQ540348-HQ540359).

Abstract

The Chauvet-Pont d'Arc and Deux-Ouvertures caves, located along the Ardèche river (France), contain abundant remains of the extinct cave bear (*Ursus spelaeus*). Because they also display a variety of Palaeolithic anthropogenic evidences, such as the earliest charcoal drawings recorded to date (Chauvet-Pont d'Arc), and delicate engravings (Deux-Ouvertures), they offer the opportunity of studying the interaction between animals and human beings during a key period for Pleistocene species extinctions. We characterised cave bear specimens from these two sites by radiocarbon dating, stable isotopes, and mitochondrial DNA analysis. In Chauvet-Pont d'Arc, we obtained radiocarbon ages that ranged between 29,000 and 37,300 years before present (BP). The Deux-Ouvertures cave bear specimens clustered to the bottom of this time frame, returning radiocarbon ages of 27,440 to 30,220 years BP. Cave bear nitrogen isotope values were all compatible with a vegetarian diet. Mitochondrial DNA analysis, carried out on a highly variable domain of the control region, evidenced only two cave bear haplotypes, including a new haplotype, and a common one which largely predominated. We detected both haplotypes in Chauvet-Pont d'Arc, but only recorded the predominant one in the Deux-Ouvertures Cave. Our data put forward the surprising observation that cave bears inhabited Ardèche over a short period of time, from about 37,000 to 27,400 years BP. They were notably present during the first (Aurignacian) phase of human intrusions in Chauvet-Pont d'Arc, 30,000 to 32,000 years BP. This points to the possible competition for cave sites, presumably on a seasonal scale considering the cave bear habit for hibernation. During this time period, the small number of haplotypes is at variance with the extensive genetic diversity reported elsewhere for much more ancient specimens.

1. Introduction

The cave bear (*Ursus spelaeus*) is one example of megafaunal species that, together with other carnivores (cave lion, cave hyena) and herbivores (woolly rhinoceros), became extinct during the late Pleistocene (Kurtén, 1976; Martin and Steadman, 1999; Stuart and Lister, 2007, 2010). Contrasting to other representative large Pleistocene mammals such as the woolly mammoth and giant deer, that were able to survive in limited areas up to 4,000-7,000 years BP (Stuart et al., 2004; Vartanyan et al., 1993), the cave bear mainly confined to Europe and was no longer present during the Holocene. The *Ursus spelaeus* diet is largely based on plant consumption, as shown by dental morphology (Kurtén, 1976) and stable isotope analysis of bone collagen, which most often yielded $\delta^{15}\text{N}$ values in the range of those found for vegetarian species (Bocherens et al., 1994). Occasional evidence of omnivory have been obtained from dental microwear analysis (Peigne et al., 2009) and unusually high $\delta^{15}\text{N}$ values of bone collagen (Richards et al., 2008), suggesting that the cave bear was more or less carnivorous depending on available resources and seasonality.

The fossil record indicates that *Ursus spelaeus* gradually evolved from *Ursus deningeri*, and abundant remains are available between 150,000 and about 28,000 years ago. Palaeontological data also indicate that the cave bear and the brown bear (*Ursus arctos*) belong to different lineages, a notion which is further substantiated by ancient DNA analysis (Hänni et al., 1994; Loreille et al., 2001). Molecular dating analysis carried out using complete mitochondrial genomes of ancient and extant bears evaluated the divergence between the cave bear and brown bear lineages to 1.4-1.6 million years ago (Bon et al., 2008; Lindqvist, et al., 2010).

The cave bear has long been considered to survive until the last millennia of the Pleistocene (Kurtén, 1976), a notion that has been questioned by Pacher and Stuart (Pacher and Stuart, 2009). These authors, who listed all available direct radiocarbon dates reported for *Ursus spelaeus* between 1971 and 2008, concluded that dates younger than 24,000 years BP were unreliable because of specimens misidentification (i.e. confusion between *Ursus arctos* and *Ursus spelaeus*) or technical pitfalls in the radiocarbon dating procedures. However, the possibility that the cave bear survived ten additional millennia is still considered and promoted a new series of studies in alpine refuges (Philippe et al., 2010). Thus, the exact timing of cave bear extinction is still a matter of debate. Consequently, the causes responsible for cave bear extinction are unclear and call for further studies.

In the present study, we focused on two sites of south-eastern France (Fig. 1) that both display a large number of cave bear remains and evidences of Palaeolithic human intrusions. One site corresponds to the Chauvet-Pont d'Arc Cave and contains the earliest rock art picture ever found, with charcoal drawings dating back to the Aurignacian period, 30,000 to 32,000 years BP (Valladas et al., 2001). Preservation of ancient DNA in this cave was demonstrated through the recovery of a complete cave bear mitochondrial genome from a 32,000-year-old specimen (Bon et al., 2008). The Deux-Ouvertures Cave is located 15 km downstream of Chauvet-Pont d'Arc along the Ardèche river. Rock art pictures in the Deux-Ouvertures consist in engravings ascribed to the upper Solutrean (Gély and Porte, 1996; Gély, 2005). In 2007, excavations carried out near these pictures yielded charcoal fragments as well as abundant cave bear remains (Philippe et al., 2009). We report here on the comparative analysis of the Chauvet-Pont d'Arc and Deux-Ouvertures cave bears with results on radiocarbon ages, stable isotopes, and mitochondrial DNA.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

In the Chauvet-Pont d'Arc Cave, we collected 38 bone samples. Thirty four of them were located on the ground surface, and the four others originate from an excavation carried out in the Hillaire Chamber (Fig. 2). In the Deux-Ouvertures Cave, we collected five samples which all come from the excavated sector located at the Crossroad (Fig. 3).

2.2. DNA extraction

DNA was extracted from the bone cortex. One gram of bone powder was incubated 40 h at 42°C under constant agitation in 10 ml of extraction buffer consisting of 0.45 M EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 % SDS, 65 mM DTT, and 0.5 mg/ml proteinase K. After centrifugation, the supernatant was recovered, extracted once with one volume of phenol, once with a phenol-chloroform (50:50) mixture, and once with chloroform. The aqueous phase was then concentrated using Centricon YM-30 (Millipore, Billerica, MA), and the column was washed 5-times with distilled water. The DNA extract was subsequently recovered as a ~ 200-µl sample volume.

2.3. DNA amplification, cloning and sequencing

PCR primers were designed with Oligo 6.0 software (Medprobe, Norway). The different pairs of primers selected to target the mitochondrial control region are listed in Table 1. As expected with ancient DNA, successful amplification greatly varied from one sample to another. Consequently, depending on the samples, 5 to 10 overlapping primer pairs were

required to recover the control region fragment used for phylogenetic analysis. Since we previously observed that samples failing to yield DNA for the control region may be successfully amplified when queried for a fragment of the mitochondrial 16S gene (Bon et al., 2008), additional studies were performed by targeting this gene. They were carried out using the primers (Table 1) that were shown efficient to amplify a 112-bp fragment of the cave bear mitochondrial 16S gene.

PCR was performed in a 50- μ l reaction volume containing mock or ancient DNA extracts, 300 pM of sense and antisense primers, 200 μ M dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 5 μ l of GeneAmp 10X PCR buffer II, and 2.5 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). The amount of DNA to be used varied from one sample as well as one primer pair to another and ranged between 0.1 and 1.0 μ l of the bone extract. An equivalent volume of water was substituted to the DNA sample in PCR blanks. After an activation step (95°C, 8.5 min), a single round of 45 PCR cycles (95°C, 15 sec; 50-60°C (according to primers melting temperature), 20 sec; 70°C, 1 min) was performed in 7000 or 7300 Applied Biosystems thermal cyclers. The full reaction volume was loaded onto an 8 % polyacrylamide gel. To increase the sensitivity of our PCR assay, we used Sybr Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA) instead of ethidium bromide to stain the gel. PCR amplicons were eluted from the gel and inserted into pCR4-TOPO (Invitrogen). Plasmid minipreparations of the clones were sequenced on ABI 377XL or 3130 XL DNA sequencers using BigDye 3.1 terminator chemistry (Applied Biosystems). We routinely analyzed eight to twelve colonies for each cloned fragment, and sequenced both DNA strands using M13 forward and T3 primers.

2.4. DNA sequence authentication and contamination issues

To guarantee the authenticity of the cave bear mitochondrial sequences, we followed previous recommendations for works performed on ancient DNA (Pääbo et al., 2004; Willerslev and Cooper, 2005). First, to avoid contaminations from previous and current analyses, pre-PCR steps (*i.e.* DNA extraction and set-up of PCR reactions) were carried out in a building where no molecular work on modern DNA was performed, and handling of amplified products was done in a different building. Second, negative controls included mock extracts and PCR blanks (where water was added instead of DNA), which always failed to yield any amplification product. Third, we observed an expected molecular behavior for the ancient DNA extracts, with successful amplifications only for short (< 160 bp) DNA fragments. Fourth, reproducibility was assessed using the same and a second DNA extract. Fifth, to rule out the possibility that numts were retrieved by DNA amplification, we designed PCR primers generating overlapping fragments. Sixth, to detect errors induced by DNA damage and deduce a reliable consensus sequence, we cloned each PCR fragment, and systematically sequenced eight to twelve clones on both strands. The high number of PCR and reads allowed us to calculate the error rate of the sequences to 1.1% (sample range: 0.5-1.4%) . Seventh, experiments carried in another laboratory on a subset of three samples yielded the same DNA sequences (see GenBank accession numbers for US17 (AY616447 and HQ540351), US21 (AY836000 and HQ540354), US08 (DQ398002 and HQ540352), indicating that the data could be independently replicated.

2.5. Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis was performed on 253 nucleotides of the mitochondrial control region located between positions 16,364 and 16,623 of the published US18 complete mitochondrial genome (Bon et al., 2008). Being shorter, US735 sequence was not taken into account for the analysis. The sequences of the 11 remaining samples were aligned with 74 published cave bear sequences for which the same region of the mitochondrial genome is available. A phylogenetic tree was constructed from this dataset by Neighbor-Joining analysis with MEGA 4.0.2 software (Tamura et al., 2007) using maximum composite likelihood, heterogeneous pattern among lineages, and uniform rate among sites. The outgroup consisted of a set of actual polar and brown bear sequences. To estimate the reliability of the phylogenetic inferences, we used the bootstrap method and performed 1,000 replicates.

2.6. Assessment of genetic diversity

We computed the unbiased Nei's (Nei, 1978) gene diversity for each site, as:

$$H_e = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \right)$$

where n is the number of haplotypes, and p_i is the frequency of the i^{th} haplotype. In order to compare the level of genetic diversity among cave sites, we used a resampling approach by jackknifing over haplotypes within each site. We computed a 95% confidence interval from the sample variance (V) of the m jackknife pseudovalues, as: $\pm 1.96\sqrt{V/m}$ (Tukey, 1958).

For each site, we computed the maximum likelihood estimate of the parameter $\theta \equiv N\mu$ (where N is the effective population size and μ is the mutation rate) using Ewens' (Ewens, 1972)

sampling formula, which gives the probability of a sample configuration. We used the NSolve function in Mathematica 7.0 software (Wolfram Research; Champaign, IL) to maximize the likelihood, and the 95% confidence intervals were computed from the likelihood ratio.

2.7. AMS radiocarbon dating and stable isotope analysis

The samples underwent standard chemical pretreatment for removal of contaminants (Mook and Streurman, 1983), and collagen was extracted using the method of Longin (Longin, 1971). The collagen was combusted into CO₂ by an Elemental Analyzer (EA), coupled on-line with a stable isotope Mass Spectrometer (MS). The EA is also used for purifying the CO₂ (Aerts-Bijma et al., 2001). The CO₂ gas was trapped cryogenically for further ¹⁴C analysis. The EA/MS system enables precise measurements of ¹³C/¹²C ratios, which are reported as δ¹³C-values in ‰ relative to the international standard (PDB). The CO₂ was reduced to graphite by a reaction under excess H₂ gas. This graphite was pressed into target holders which were placed in the ion source of the AMS. The Groningen AMS facility is based on a 2.5 MV accelerator, and measures the ¹⁴C/¹²C ratio in the graphite (van der Plicht et al., 2000). The results are reported in conventional Radiocarbon years (BP), which includes correction for isotopic fractionation and usage of the conventional half-life (Mook and van der Plicht, 1999).

In a separate run, the EA/MS was setup for nitrogen gas, and for a second collagen sample the isotope ratio ¹⁵N/¹⁴N was measured. This ratio is reported as δ¹⁵N value, in ‰ relative to the international standard (ambient air).

3. Results

3.1. *Location of samples and analytical success rate*

The entry of Chauvet-Pont d'Arc was sealed off by a rock fall some 20,000 years ago (Debard et al., 2002), preserving the cave from modern intrusions of humans and large animals up to its discovery in 1994. This unique archaeological site benefits from special care, which in turn essentially limits the material for research to small or broken postcranial skeletal elements scattered on the paleosurface. For the present study, 90 % of the samples analysed laid on the ground surface.

We performed DNA extraction on 38 samples, 22 of which were also processed for collagen extraction. Ten (26 %) DNA extracts enabled successful genetic analysis, and 14 (64%) of the 22 collagen extracts could be dated. Fig. 2 shows the location in Chauvet-Pont d'Arc of the samples that gave positive results. All cave sectors yielded informative samples.

The Deux-Ouvertures Cave includes an A-shape entry sector that has long been known, and a deep sector discovered in 1985 (Fig. 3). Palaeolithic engravings as well as the excavated zone locate in the deep sector, from which 667 cave bear samples were retrieved during the 2007 excavation campaign. Because all samples come from the same sector, the possibility that a large number of them belong to the same animal was considered. To guarantee analysing bone samples from different individuals, we selected five humerus that display anatomical features representative of young, subadult (two right humerus), adult, or adult massive animals, respectively. All five samples yielded sufficient DNA for genetic analysis and were subsequently successfully dated by radiocarbon.

It is worth mentioning that all samples successfully analysed for DNA content yielded sufficient collagen for radiocarbon dating, whereas the reverse was not true. Hence, the DNA screening procedure reliably evidenced organic material, supporting the notion that we retrieved authentic ancient DNA.

3.2. *Radiocarbon ages and stable isotopes*

The Chauvet-Pont d'Arc Cave bear samples yields radiocarbon dates ranging between 29,050 and 37,300 years BP, but most of them were younger than 32,000 years BP (Table 2). We therefore paid special attention to the oldest samples by analysing one in duplicate. The two extracts performed on US01 yielded values that did not significantly differ from each other, thereby corroborating different phases for cave bear occupancy.

Because it is conceivable that samples lying below the paleosurface are especially ancient, we analysed buried bones from the Hillaire Chamber (US54, US129, and US131). However, all three samples display ages that cluster within the bulk of the ^{14}C dataset. This suggests that the Hillaire Chamber underwent a rapid filling some 31,000 years BP, and thereafter stabilised to the current level. Interestingly, the excavated sector yielded a canine sample (CL130) that was also radiocarbon dated to 31,000 years BP.

Stable isotope values for cave bear were in the range of those generally reported for this species (Bocherens et al., 1994). Specifically, cave bear $\delta^{15}\text{N}$ varied between 2.2 and 5.1 ‰. The significantly higher $\delta^{15}\text{N}$ value of the canine sample (10.5 ‰) illustrates the different diets of the two animal species.

In the Deux-Ouvertures Cave, we obtained radiocarbon ages that partly overlapped those found in Chauvet-Pont d’Arc. However, two samples (US299, and US735) were dated to 28,000 years BP, showing slightly later occupancy in the Deux-Ouvertures than in the Chauvet-Pont d’Arc Cave.

3.3. *Mitochondrial DNA analysis*

The cave bear samples were analysed for two regions of the mitochondrial genome. First attempts were carried out on a highly variable domain of the control region. These experiments evidenced DNA in seven Chauvet-Pont d’Arc and five Deux-Ouvertures samples (Fig. 4). Comparison of each sequence with those recorded in the GenBank nucleotide database always demonstrated that the best alignment was obtained with cave bear mitochondrial sequences.

Considering that both brown and cave bear remains have been recorded in the Chauvet-Pont d’Arc Cave (Fosse and Philippe, 2000), we further tested samples that failed to yield control region DNA by targeting a region of the mitochondrial genome that can easily be amplified (Bon, et al., 2008). Located in the 16S gene (nucleotides 3,152 to 3,214), it allows differentiating cave and brown bear sequences through five substitutions. This second experimental series evidenced cave bear DNA in three additional Chauvet-Pont d’Arc samples (Table 2). By contrast, brown bear sequences were never recorded.

Phylogenetic reconstruction was carried out using sequence data for the control region. One sample (US735, Deux-Ouvertures) which yielded a very short sequence was not considered for this analysis. Overall, the phylogenetic studies rest on seven Chauvet-Pont d’Arc and four

Deux-Ouvertures samples. They were compared to 74 published cave bear specimens without taking into account the variable number of thymine residues starting at position 16,453 of the genome. We observed two haplotypes consisting of a rare and an abundant one that differ from each other by three substitutions. As shown in Fig. 4 and 5, the rare haplotype is specific for Chauvet-Pont d’Arc where it is observed in US08 and US21. By contrast, the predominant haplotype is widely distributed, being present in five Chauvet-Pont d’Arc samples, in the Deux-Ouvertures specimens, as well as in samples retrieved from Arcy (France), Eiros (Spain), and Scladina (Belgium).

The low number of haplotypes detected in the Ardèche caves prompted us to compare cave bear genetic diversity in that region with that recorded elsewhere. We chose to compare the Ardèche and Pesteria co Oase Cave bear population because: (1) both have been studied for more than ten samples; and (2) they yielded samples for a comparable, 4,000 years time interval (Richard et al. 2008). Nei’s (Nei, 1978) gene diversity was significantly lower in the Ardèche bears population, with $H_e = 0.327$ [-0.007; 0.662], than in the Pesteria cu Oase population, with $H_e = 0.895$ [0.843-0.947].

The maximum likelihood estimate of the parameter θ , computed from Ewens’ (Ewens, 1972) sampling formula was 0.410 [0.021; 2.374] in the Ardèche bears population and 3.259 [1.079; 8.697] in the Pesteria cu Oase bears population. Assuming that the mutation rate is the same across populations, the Chauvet and Deux-Ouvertures effective population size was therefore almost an order of magnitude lower on average, than that of Pesteria cu Oase.

4. Discussion

This work demonstrates the limited genetic diversity of cave bears in the gorges of the Ardèche region through several millennia, 32,000 to 28,000 years BP. Our study was performed in caves where repeated human intrusions are documented during the same period, which might have had some influence on space occupancy by each species on a seasonal to multi-annual time scale. The mitochondrial DNA reported here consists of a rare haplotype that is specific for Chauvet-Pont d'Arc, and a common haplotype that was present in Ardèche and other European cave sites.

Previous studies identified a Chauvet-Pont d'Arc Cave bear specimen (US18) that was preserved enough for sequencing a complete mitochondrial genome (Bon et al., 2008). The present work provides DNA analysis for an additional series of samples, but none of them enabled retrieving a large set of sequence data. The overall success rate was 26 %, and the buried samples from the Hillaire Chamber did not yield DNA. By contrast, in the Deux-Ouvertures Cave, the buried samples were all successfully analysed. Thus, DNA conservation turned out to be better in the Deux-Ouvertures than in the Chauvet-Pont d'Arc Cave.

The two haplotypes recorded in Ardèche belong to a cave bear haplogroup that spread over a large geographic area. Specifically, the predominant haplotype, observed in both the Chauvet-Pont d'Arc and Deux-Ouvertures caves, was previously detected in Europe from Spain to Belgium. We provide here the first direct radiocarbon dating for this haplotype, which will be useful for future comparative studies. The second haplotype has never been recorded previously. It was present in Chauvet-Pont d'Arc during the time period when the common haplotype predominated, but was not detected in the Deux-Ouvertures Cave.

The detection of only two mitochondrial haplotypes suggests that cave bear genetic diversity was low in Ardèche some 28,000-32,000 years BP. By contrast, high genetic diversity was evidenced in Scladina, where samples are available from 40,000 to 130,000 year-old archaeological layers (Orlando et al., 2002). Diversity was also recorded in a much smaller time interval, from 43,000 to 47,000 year-old samples in Pesteră cu Oase (Richards, et al., 2008; Stiller et al., 2010). In this later cave, the 21 specimens analysed returned nine haplotypes (Fig. 5). Computation analysis demonstrates significantly lower genetic diversity in Ardèche sites than in Pesteră cu Oase, a result further supported by the ten-fold difference for the estimated effective population sizes. Strikingly, the Ardèche cave bears document a 15,000-year much more recent population. The low genetic diversity and effective population size for these late cave bear specimens is consistent with the genetic decline that began some 50,000 years BP (Stiller et al., 2010). These authors suggested that a complex of factors including human competition for cave sites led to cave bear extinction.

The present work, together with previous analyses carried out by Bocherens et al. (2006), makes available a dataset of 20 radiocarbon dates for Chauvet-Pont d'Arc cave bears. The two studies document the same time range, with 85 % of the samples yielding radiocarbon dates between 29,000 and 32,000 years BP (Fig. 6). Significantly older intrusions, previously established by a single date, are now strongly supported by two additional 35,000 to 37,000 year old samples, one of which was measured twice. Anthropogenic evidence, including dated charcoal paintings, hearth residues and torch rubbings, demonstrate an ancient (Aurignacian) and a more recent (Gravettian) period for human intrusions (Valladas, et al., 2001). Comparison of the cave bear data with this time frame (Fig. 6) shows that: 1) animal remains predate the earliest anthropogenic evidence; 2) cave bears were continuously present during

the Aurignacian phase of human intrusions; 3) cave bears were no longer present during the second, Gravettian series of human occupations. The large number of cave bear remains dating back to the Aurignacian suggests an alternating occupancy by humans and bears during this period, possibly on a seasonal scale since bears inhabited the cave during the hibernation period. We further suggest that cave bears already had disappeared from Ardèche during the Gravettian, which observation is supported by our data for the Deux-Ouvertures Cave. Initial radiocarbon dating of Chauvet-Pont d'Arc specimens yielded ages of 25,000 (Ly235, Ly1434oxa) and 19,000 (Ly1656oxa) years BP (Fosse and Philippe, 2005). Considering that all cave sectors are surveyed by our studies and those of Bocherens et al. (2006), it is quite surprising that such recent ages were not obtained again. The bulk of material from Chauvet-Pont d'Arc suggests that late cave bear specimens lived no later than 29,000 years BP, and the Deux-Ouvertures data only extend by one additional millennium the presence of *Ursus spelaeus* in the Ardèche gorges. This is of interest in view of the paucity of information on the cave bears depicted by red paintings in Chauvet Pont d'Arc, which cannot be dated by radiocarbon. Because painting an animal that is no longer present is hardly feasible, we propose that these red rock art pictures are indeed very ancient, dating back to the Aurignacian.

5. Conclusions

The present report provides new radiocarbon and DNA data for cave bears from Chauvet-Pont d'Arc, and broadens the analysis of this extinct species to the regional level through studies performed in the Deux-Ouvertures Cave. Striking observations of this work include: 1) the low genetic diversity recorded for Ardèche cave bears, and 2) the relatively short period of time (from 37,300 to 27,400 years BP) during which they could be repeatedly evidenced. Integration of these data with well-dated anthropogenic material from Chauvet-Pont d'Arc shows that cave bear intrusions predated the human ones, but predominated during the Aurignacian period (30,000 to 32,000 years BP) of human activity. In contrast, the presence of the cave bear during the Gravettian is weakly supported in Chauvet-Pont d'Arc, and only extends up to the Aurignacian-Gravettian transition in the Deux-Ouvertures Cave. The low genetic diversity of this cave bear population, together with human settlement which suggest competition for space resources, points to the striking occurrence of a combination of factors that might have lead to the withdrawal of cave bears from Ardèche during the late Aurignacian. Key issues that should be addressed in future studies include the accurate timing of cave bear extinction, which will provide a minimal age for bears painted in Chauvet-Pont d'Arc , and the thorough analysis of anthropogenic material in the Deux-Ouvertures Cave, such as charcoal fragments in the layers containing cave bear remains.

Acknowledgments

We thank D. Baffier for giving us the authority to collect cave bear samples in the Chauvet-Pont d'Arc Cave, J. Monney, N. Lateur and S. Stocchetti for their contribution to excavations carried out in the Deux-Ouvertures Cave, V. Feruglio and L. Cohen for artwork. This work was supported by grants from the Commissariat à l'Energie Atomique, the French Ministère de la Culture et de la Communication, and the Réserve Naturelle Nationale des Gorges de l'Ardèche. C.B. received PhD funding from the CEA.

Legend to figures



Fig. 1. Geographic localisation of the Chauvet-Pont d'Arc and Deux-Ouvertures caves.

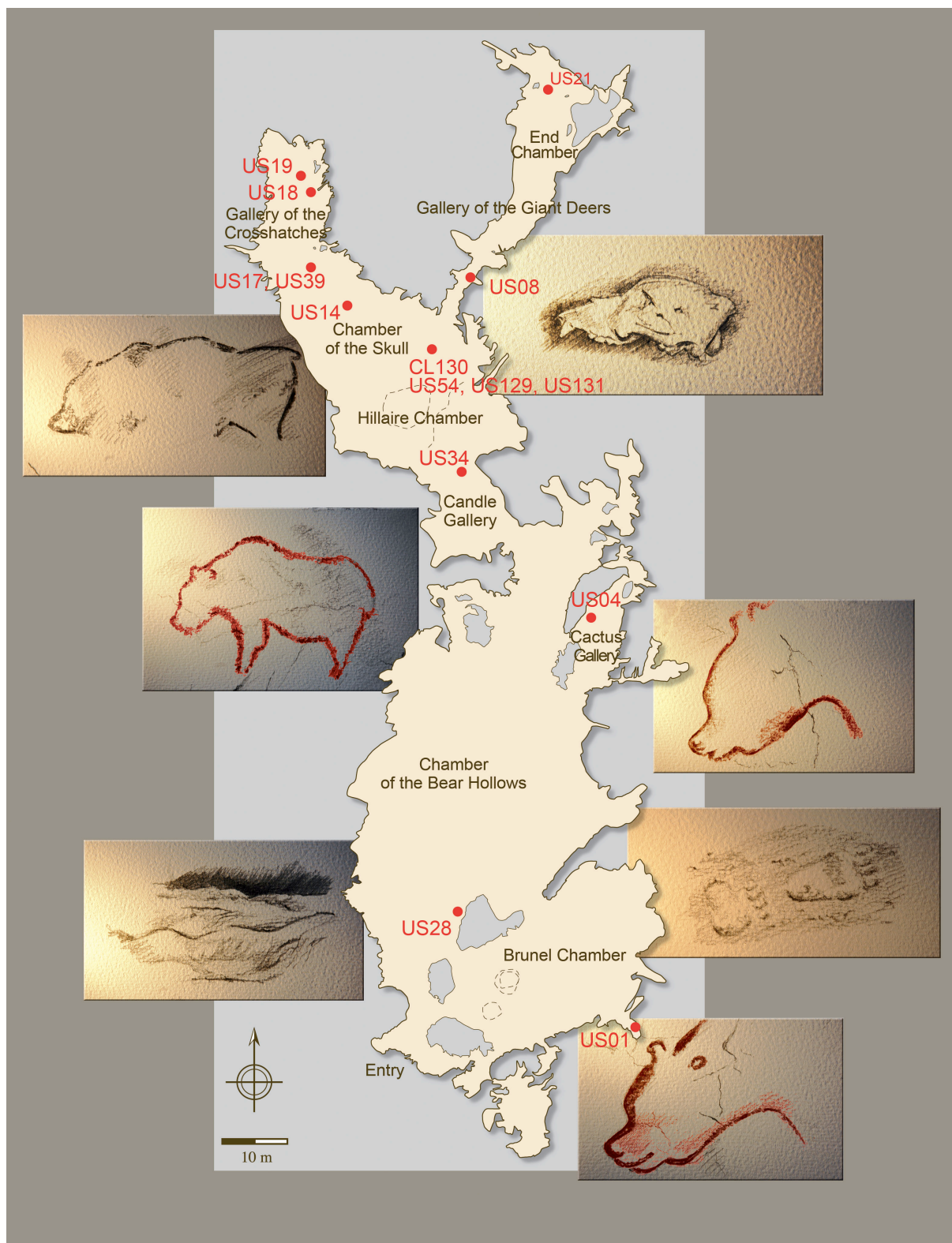


Fig. 2. Topography of the Chauvet-Pont d'Arc Cave and location of the samples successfully analysed. The figure also displays examples of painted cave bears, and (from left to right) cave bear wallows, cave bear footprints, and a cave bear skull.

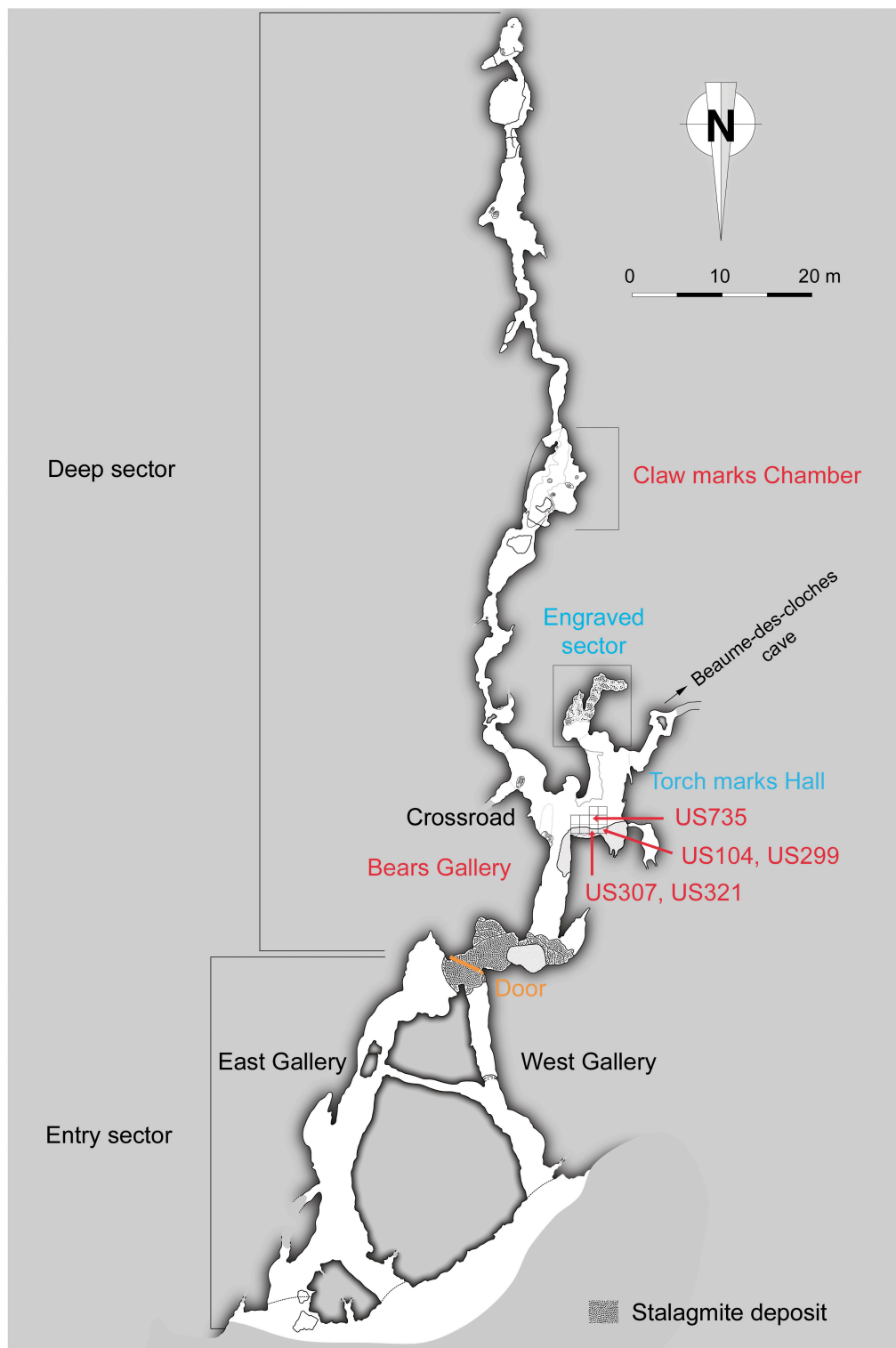


Fig. 3. Topography of the Deux-Ouvertures Cave and location of the cave bear samples in the excavated area.

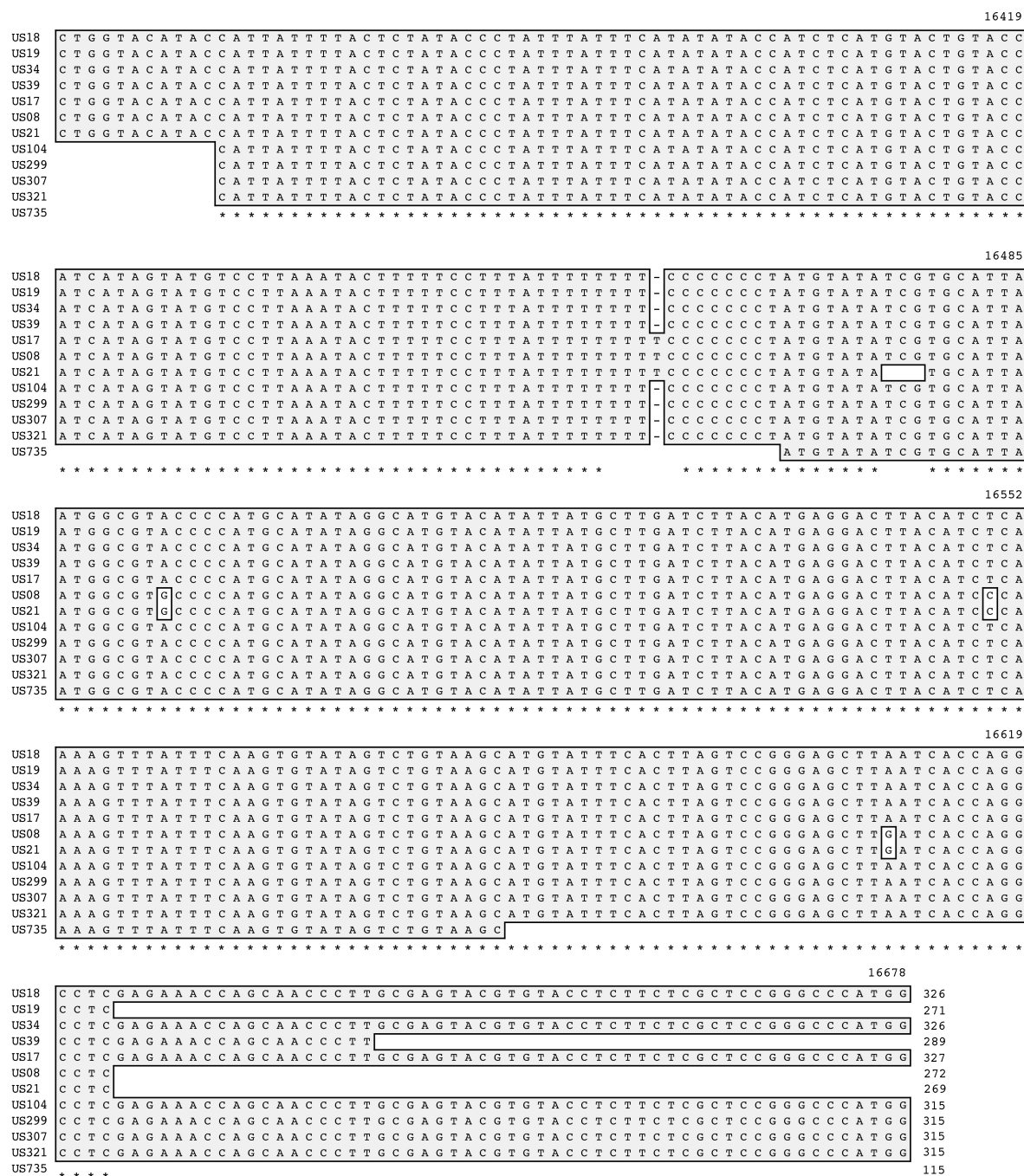


Fig. 4. Sequence data for the mitochondrial control region of the Chauvet-Pont d'Arc and Deux-Ouvertures cave bear specimens. Values at the bottom right indicate the length of the depicted sequences, and numbering above the lines refers to the complete sequence of the cave bear mitochondrial genome (Bon et al., 2008). Hyphens indicate residues absent at a given position, and blanks those that were not analysed in the corresponding sequence. Asterisks point the 253 nucleotides that were taken into account for the phylogenetic analysis.

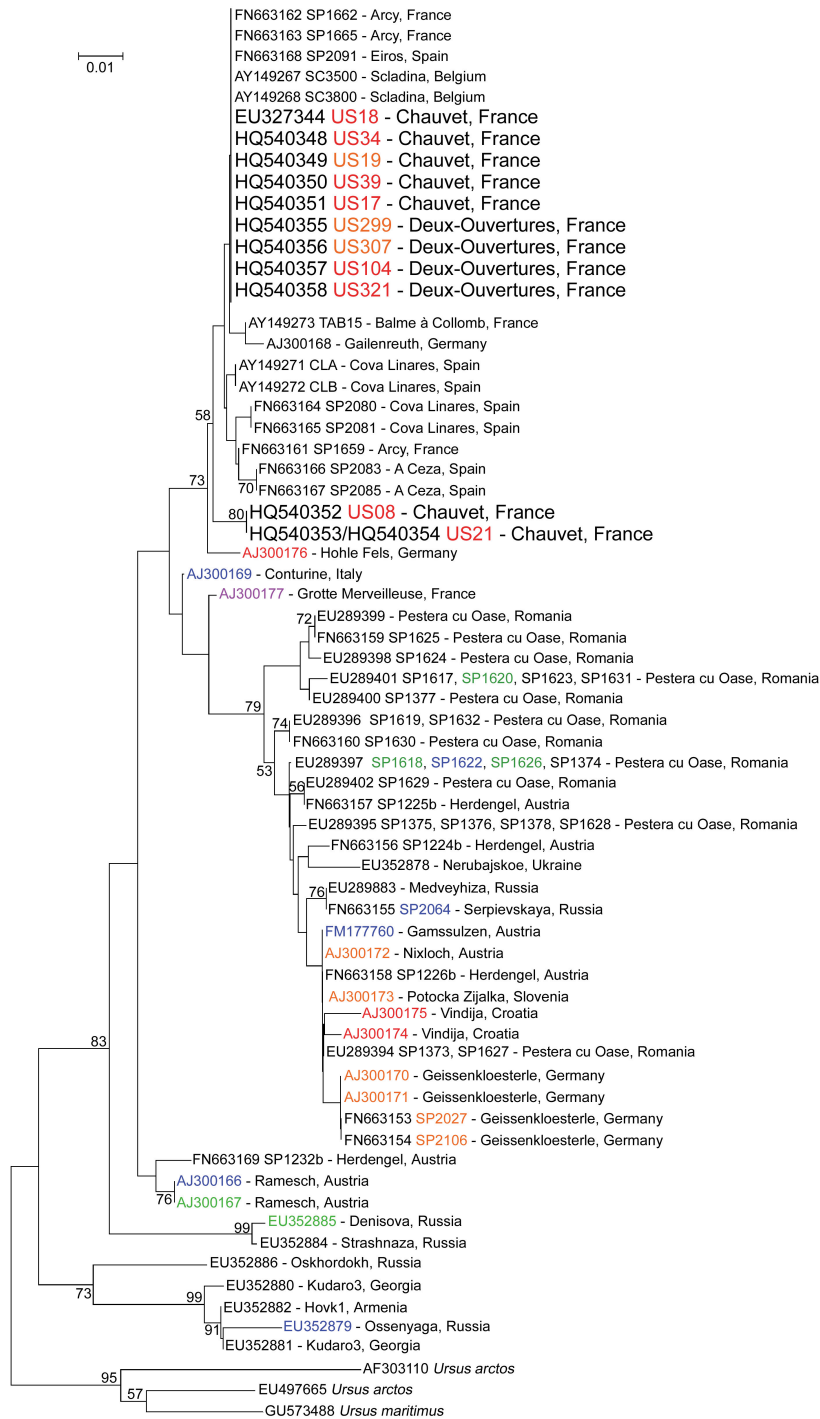


Fig. 5. Neighbor-Joining analysis of cave bear sequences. The phylogenetic tree was constructed using 253 sites of the mitochondrial control region, and rooted with sequences of actual brown (*Ursus arctos*) and polar bears (*Ursus maritimus*). Bootstrap values greater than 50% are displayed. Data are displayed according to the GenBank accession number, followed by the specimen(s) name (when available), cave, and country. Coloured characters indicate specimens that have been radiocarbon dated (kyr BP): green, 45-50; blue, 40-45; purple, 35-40; red, 30-35; orange, 24-30. The scale indicates the genetic distance.

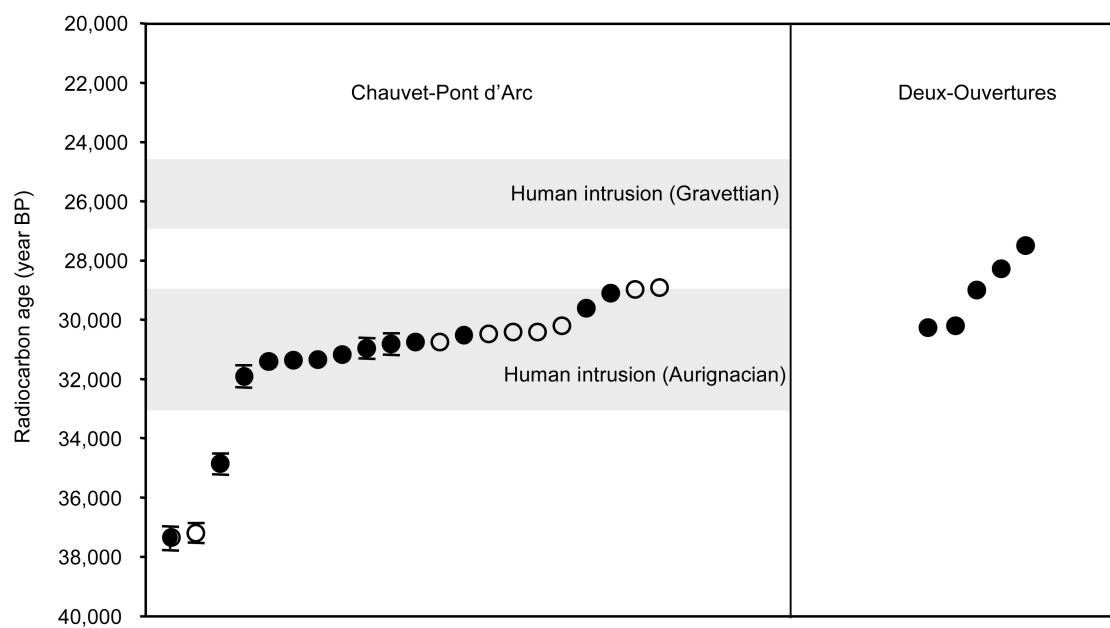


Fig. 6. AMS radiocarbon ages of Chauvet-Pont d'Arc and Deux-Ouvertures cave bear specimens. Black dots correspond to specimens of the present study, and white dots to results reported by Bocherens et al. (2006).

Table 1. Oligonucleotide primers used to amplify overlapping fragments of the cave bear mitochondrial control region

Primer pair	Forward primer		Reverse primer		Amplicon (bp)
	Position	Sequence	Position	Sequence	
1	16328	GCTGATGTCCTACTTAACTATTCC	16398	GATGGTACAGTACATGAGATGGTAT	95
2	16337	CTACTTAACTATTCCCTGGTACATAC	16477	GGGCACGCCATTAATGCACG	160
3	16360	ATACCATTATTTTACTCTATACCCTA	16440	ACTTTTTCTTTATTTTTTTTCC	103
4	16376	CTATACCCTATTTATTTTCATATA	16433	ATAAAGGAAAAAGTATTTAAG	78
5	16409	TGTACTGTACCATCATAGTATGTCC	16529	TTTTGAGATGTAAGTCCTCATGTAAGA	147
6	16455	TTTTTTCCCCCCCCTATG	16500	CATAATATGTACATGCCTATATGC	69
7	16455	TTTTTTCCCCCCCCTATG	16513	CTCATGTAAGATCAAGCATAATATGTA	85
8	16462	CCCCCCTATGTATATCGT	16513	CATGTAAGATCAAGCATAATATGTA	89
9	16488	GGCGTACCCCATGCATAT	16584	CCCGGACTAAGTGAAATACAT	117
10	16492	T AC CCCATGCATATAGGC	16592	TAAGCTCCCGGACTAAGTG	119
11	16552	AAAAGTTTATTTCAAGTGTATAGTCTG	16679	AACATAGAAACCCCCACATT	147
12	16552	AAAAGTTTATTTCAAGTGTATAGTCTG	16624	AGGGTTGCTGGTTTCTC	89
13	16562	TTCAAGTGTATAGTCTGTAAGCATGT	16679	AACATAGAAACCCCCACATT	137
14	16562	TTCAAGTGTATAGTCTGTAAGCATGT	16624	AGGGTTGCTGGTTTCTC	89

The position of the 5' end of each primer is numbered according to the cave bear mitochondrial genome sequence (Bon *et al.*, 2008). The bold character indicates a mismatch with this sequence.

Table 2. Overview of samples, DNA, stable isotopes, and radiocarbon data.

Cave, sample	Species	Bone	DNA, HT	C (%)	N (%)	C/N	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	^{14}C age (BP)	^{14}C Lab code
Chauvet, US28	<i>Ursus spelaeus</i>	rib	-	24.3	11.4	2.5	-21.2	2.2	37,300 ± 340	GrA-33650
Chauvet, US01	<i>Ursus spelaeus</i>	mandible	+	34.0	12.6	3.1	-20.8	2.4	35,160 ± 650	GrA-32815
Chauvet, US01	<i>Ursus spelaeus</i>	mandible	+	24.9	NT		-20.9	NT	34,790 ± 250	GrA-34333
Chauvet, US18	<i>Ursus spelaeus</i>	sternebra	+, HT1	45.2	15.9	3.3	-20.3	3.5	31,870 ± 300	GrA-28194
Chauvet, US34	<i>Ursus spelaeus</i>	rib	+, HT1	44.4	15.7	3.3	-20.8	4.6	31,360 ± 190	GrA-45941
Chauvet, US131	<i>Ursus spelaeus</i>	fibula	-	43.5	14.6	3.5	-20.8	4.9	31,320 ± 180	GrA-32595
Chauvet, US54	<i>Ursus spelaeus</i>	phalanx	-	42.5	15.1	3.3	-20.7	4.4	31,300 ± 180	GrA-32593
Chauvet, CL130	<i>Canis lupus</i>	metapodium	NT	41.2	14.2	3.4	-20.5	10.5	31,260 ± 190	GrA-32592
Chauvet, US129	<i>Ursus spelaeus</i>	radius	-	40.5	14.6	3.2	-20.5	4.4	31,130 ± 170	GrA-32596
Chauvet, US17	<i>Ursus spelaeus</i>	rib	+, HT1	42.6	14.1	3.5	-21.1	5.1	30,900 ± 270	GrA-28202
Chauvet, US21	<i>Ursus spelaeus</i>	vertebra	+, HT2	41.8	14.8	3.3	-20.3	3.7	30,760 ± 280	GrA-28195
Chauvet, US39	<i>Ursus spelaeus</i>	rib	+, HT1	41.8	15.3	3.2	-21.1	5.0	30,690 ± 180	GrA-45942
Chauvet, US08	<i>Ursus spelaeus</i>	rib	+, HT2	43.4	15.0	3.4	-21.0	4.2	30,460 ± 250	GrA-28198
Chauvet, US19	<i>Ursus spelaeus</i>	rib	+, HT1	40.1	14.7	3.2	-20.6	3.9	29,560 ± 160	GrA-32590
Chauvet, US04	<i>Ursus spelaeus</i>	cubitus	+	44.0	16.9	3.0	-20.6	4.5	29,050 ± 190	GrA-45998
Deux-Ouvertures, US321	<i>Ursus spelaeus</i>	right humerus	+, HT1	46.8	13.9	3.9	-20.7	4.1	30,220 ± 170	GrA-46165
Deux-Ouvertures, US104	<i>Ursus spelaeus</i>	right humerus	+, HT1	43.1	NT		-20.6	NT	30,180 ± 160	GrA-46163
Deux-Ouvertures, US307	<i>Ursus spelaeus</i>	right humerus	+, HT1	42.5	NT		-20.8	NT	28,950 ± 150	GrA-46174
Deux-Ouvertures, US299	<i>Ursus spelaeus</i>	left humerus	+, HT1	43.5	NT		-20.4	NT	28,230 ± 140	GrA-46164
Deux-Ouvertures, US735	<i>Ursus spelaeus</i>	left humerus	+, HT1	19.3	NT		-20.9	NT	27,440 ± 130	GrA-46180

HT, haplotype ; (+) and (-) indicate that cave bear DNA could and could not be evidenced by PCR amplification, respectively. The HT1 and HT2 haplotypes differ by three substitutions. In this table, the two cave bear samples that underwent partial characterization (Chauvet US21, and Deux-Ouvertures US735) are conservatively ascribed to the HT1 or HT2 haplotype according to the diagnostic substitutions they display.

References

- Aerts-Bijma, A.T., van der Plicht, J., Meijer, H.A.J., 2001. Automatic AMS sample combustion and CO₂ collection. *Radiocarbon* 43, 293-298.
- Bocherens, H., Drucker, D.G., Billiou, D., Geneste, J.M., van der Plicht J., 2006. Bears and humans in Chauvet Cave (Vallon-Pont-d'Arc, Ardèche, France): insights from stable isotopes and radiocarbon dating of bone collagen. *J. Hum. Evol.* 50, 370-376.
- Bocherens, H., Fizet, M., Mariotti, A., 1994. Diet, physiology and ecology of fossil mammals as inferred from stable carbon and nitrogen isotope biogeochemistry - Implications for Pleistocene Bears. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 107, 213-225.
- Bon, C., Caudy, N., de Dieuleveult, M., Fosse, P., Philippe, M., Maksud, F., Beraud-Colomb, E., Bouzaid, E., Kefi, R., Laugier, C., Rousseau, B., Casane, D., van der Plicht, J., Elalouf, J.M., 2008. Deciphering the complete mitochondrial genome and phylogeny of the extinct cave bear in the Paleolithic painted cave of Chauvet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 17447-17452.
- Debard, E., Delannoy, J.-J., Ferrier, C., Kervazo, B., Perrette, Y., Perroux, A.-S., 2002. Les études karstogéniques menées dans la grotte Chauvet. Premiers résultats et implications paléoenvironnementales. *Bull. Soc. Préhist. Ariège-Pyrénées* 62, 24.
- Ewens, W., 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theor. Popul. Biol.* 3, 87-112.

Fosse, P., Philippe, M., 2005. La faune de la grotte Chauvet : paléobiologie et anthropozoologie. Bull. Soc. Préhist. Fr. 102, 82-102.

Gély, B., Porte, J.-L., 1996. Les gravures paléolithiques de la grotte des Deux-Ouvertures à Saint-Martin-d'Ardèche. Bull. Soc. Préhist. Ariège-Pyrénées LI, 81-98.

Gély, B., 2005. De Chabot à Chauvet ; 130 années de découvertes d'art paléolithique dans les gorges de l'Ardèche. Cahiers scientifiques - Muséum d'histoire naturelle de Lyon HS3, 117-122.

Hanni, C., Laudet, V., Stehelin, D., Taberlet, P., 1994. Tracking the origins of the cave bear (*Ursus spelaeus*) by mitochondrial DNA sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12336-12340.

Kurtén, B., 1976. The cave bear story : life and death of a vanished animal. Columbia University Press, New York.

Lindqvist, C., Schuster, S.C., Sun, Y.Z., Talbot, S.L., Qi, J., Ratan, A., Tomsho, L.P., Kasson, L., Zeyl, E., Aars, J., Miller, W., Ingolfsson, O., Bachmann, L., Wiig, O., 2010. Complete mitochondrial genome of a Pleistocene jawbone unveils the origin of polar bear. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 5053-5057.

Longin, R., 1971. New method of collagen extraction for radiocarbon dating. Nature 230, 241-242.

- Loreille, O., Orlando, L., Patou-Mathis, M., Philippe, M., Taberlet, P., Hanni, C., 2001. Ancient DNA analysis reveals divergence of the cave bear, *Ursus spelaeus*, and brown bear, *Ursus arctos*, lineages. *Curr. Biol.* 11, 200-203.
- Martin, P.S., Steadman, D.W., 1999. Prehistoric extinctions on islands and continents, in: MacPhee, R.D.E. (Ed.), *Extinctions in near time: causes, contexts and consequences*, Kluwer Academic/Plenum, New York, pp. 17-55.
- Mook, W.G., Steurman, H.J., 1983. Physical and chemical aspects of radiocarbon dating. *PACT publications* 8, 31-55.
- Mook, W.G., van der Plicht, J., 1999. Reporting ^{14}C activities and concentrations. *Radiocarbon* 41, 227-239.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583–590
- Orlando, L., Bonjean, D., Bocherens, H., Thenot, A., Argant, A., Otte, M., Hanni, C., 2002. Ancient DNA and the population genetics of cave bears (*Ursus spelaeus*) through space and time. *Mol. Biol. Evol.* 19, 1920-1933.
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Despres, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L., Hofreiter, M., 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.* 38, 645-679.

Pacher, M., Stuart, A.J., 2009. Extinction chronology and palaeobiology of the cave bear (*Ursus spelaeus*). *Boreas* 38, 189-206.

Peigne, S., Goillot, C., Germonpre, M., Blondel, C., Bignon, O., Merceron, G., 2009. Predormancy omnivory in European cave bears evidenced by a dental microwear analysis of *Ursus spelaeus* from Goyet, Belgium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 15390-15393.

Philippe, M., Argant, J., Argant, A., 2010. Un programme d'inventaire, de datations et de données paléo-environnementales concernant les grottes à ossements fossiles du massif de Chartreuse. Actes du colloque sur le Patrimoine Géologique, 7èmes Rencontres du Patrimoine scientifique en Rhône-Alpes, 24-24 novembre 2009. Muséum d'Histoire naturelle de Grenoble édit., p. 37-42.

Philippe, M., Monney, J., Argant, J., Chauvet, J.-M., Debard, E., Gély, B., Lateur, N., Stocchetti, S., 2009. La grotte ornée Paléolithique des Deux-Ouvertures (Saint-Martin-d'Ardèche) en tant que "grotte à ours des cavernes". *Ardèche Archeol.* 26, 3-12.

Richards, M.P., Pacher, M., Stiller, M., Quilès, J., Hofreiter, M., Constantin, S., Zilhao, J., Trinkaus, E., 2008. Isotopic evidence for omnivory among European cave bears: Late Pleistocene *Ursus spelaeus* from the Pestera cu Oase, Romania. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 600-604.

Stiller, M., Baryshnikov, G., Bocherens, H., d'Anglade, A.G., Hilpert, B., Munzel, S.C., Pinhasi, R., Rabeder, G., Rosendahl, W., Trinkaus, E., Hofreiter, M., Knapp, M., 2010.

Withering away-25,000 years of genetic decline preceded cave bear extinction. *Mol. Biol. Evol.* 27, 975-978.

Stuart, A.J., Kosintsev, P.A., Higham, T.F.G., Lister, A.M., 2004. Pleistocene to Holocene extinction dynamics in giant deer and woolly mammoth. *Nature* 431, 684-689.

Stuart, A.J., Lister, A.M., 2007. Patterns of Late Quaternary megafaunal extinctions in Europe and northern Asia. *Courier Forschungsinstitut Senckenberg* 259, 287–297.

Stuart, A.J., Lister, A.M., 2010. Extinction chronology of the cave lion *Panthera spelaea*. *Quaternary Sci. Rev.* doi:10.1016/j.quascirev.2010.04.023.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.

Tukey, J.W., 1958. Bias and confidence in not-quite large samples. *Ann. Math. Statist.* 29: 614

Valladas, H., Clottes, J., Geneste, J.M., Garcia, M.A., Arnold, M., Cachier, H., Tisnerat-Laborde, N., 2001. Palaeolithic paintings. Evolution of prehistoric cave art. *Nature* 413, 479.

van der Plicht, J., Wijma, S., Aerts, A. T., Pertuisot, M. H. & Meijer, H. A. J., 2000. Status report: The Groningen AMS facility. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 172, 58-65.

Vartanyan, S.L., Garutt, V.E., Sher, A.V., 1993. Holocene dwarf mammoths from Wrangel Island in the Siberian Arctic. *Nature* 362, 337-340.

Willerslev, E., Cooper, A., 2005. Ancient DNA. *Proc. Biol. Sci.* 272, 3-16.

2.3. Résultats complémentaires sur la Grotte des Deux-Ouvertures

Outre les cinq humérus présentés dans l'article, onze autres échantillons de la grotte des Deux-Ouvertures ont été étudiés suivant le même protocole. Deux échantillons ont été récoltés sur le sol : l'un provenait du Réseau Profond et l'autre d'un effondrement situé à l'entrée de la Seconde Partie de la cavité et causé par les pluies de Septembre 2002. Ce dernier échantillon avait été daté à 28 600 ans BP (Lyon-4535, SacA-9004). Les neuf échantillons restants étaient enfouis et font partie du corpus de 667 ossements d'ours des cavernes collectés en 2007 dans la lentille fossilifère située à proximité du Carrefour.

Nom	Os	Secteur	Âge radiocarbone (années BP)	Taille de la séquence obtenue (pb)
USRP28	fémur	Réseau Profond - locus n° 28		-
Ly4535 (Lyon-4535)	calcaneum	Entrée - locus n° 3	28600 ± 400	-
US103	côte	Sondage - carré N6		78
US106	phalange 1	Sondage - carré N6		78
US124	vertèbre thoracique	Sondage - carré O6		78
US179	côte	Sondage - carré N6		78
US217	Fémur gauche	Sondage - carré N6		-
US227	sternèbre	Sondage - carré N6		78
US254	fibula gauche	Sondage - carré N6		78
US270	mandibule	Sondage - carré O7		315
US278	côte	Sondage - carré O6		78

Tableau 2 : Listes des échantillons de la Grotte des Deux-Ouvertures analysés, en plus des cinq humérus présentés dans (Bon *et al.*, 2011). Les 78 nucléotides correspondent aux positions 16 506-16 583 et les 315 nucléotides aux positions 16 364-16 678.

L'ADN de ces onze échantillons a été extrait suivant le protocole présenté dans (Bon *et al.*, 2011). Il a ensuite été amplifié et séquencé entre les positions 16 506 et 16 583 du génome mitochondrial de l'ours des cavernes. Pour un seul des échantillons, DO270, une séquence

plus longue, correspondant à 315 pb, a été étudiée (16 364-16 678). Ces échantillons présentent tous le même haplotype, identique à l'haplotype majoritaire chez les ours des cavernes de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc. Comme ils ont tous été retrouvés dans la même lentille fossilifère, et qu'il n'est pas possible de certifier qu'ils proviennent de spécimens différents, dans l'article, nous avons préféré fonder notre raisonnement sur les cinq humérus provenant avec certitude de spécimens indépendants.

2.4. Discussion

2.4.1. Conservation des échantillons

Cette liste confirme que les échantillons des Deux-Ouvertures sont bien conservés, car 88% (14/16) d'entre eux possèdent encore de l'ADN amplifiable. Il est intéressant de noter que les échantillons enfouis sont plus propices à la conservation de l'ADN que ceux présents en surface. Cette différence ne peut pas être attribuée à l'âge des échantillons car l'âge de Ly4535 est compris dans la série de datations obtenues pour les cinq humérus enfouis.

Par conséquent, l'enfouissement semble avoir été un facteur favorable à la conservation de l'ADN ancien dans la Grotte des Deux-Ouvertures.

En revanche, cette observation n'explique pas la conservation différentielle de l'ADN entre la Grotte des Deux-Ouvertures et la Grotte de Chauvet-Pont d'Arc. En effet, les échantillons récoltés dans le carré de fouilles de la Salle Hillaire de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc n'ont pas permis d'amplifier de l'ADN, alors qu'environ un quart (10/38) de ceux récoltés en surface étaient suffisamment riches pour autoriser une amplification d'ADN.

L'histoire taphonomique des échantillons que l'on peut récolter dans les cavités ne peut pas être extrapolée d'un site à l'autre.

2.4.2. Comparaison des populations d'ours des Grottes Chauvet-Pont d'Arc et des Deux-Ouvertures

Les datations radiocarbone montrent que les populations d'ours de Chauvet-Pont d'Arc et des Deux-Ouvertures sont à peu près synchrones. En effet, à Chauvet-Pont d'Arc, les ours sont datés de $29\,000 \pm 190$ ans BP à $35\,160 \pm 650$ ans BP, alors qu'ils sont très légèrement plus jeunes dans la Grotte des Deux-Ouvertures, de $28\,230 \pm 130$ ans BP à $30\,180 \pm 160$ ans BP.

Un échantillon de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc (US28) a donné une date plus ancienne ($37\,300 \pm 340$ BP), et un échantillon de la Grotte des Deux-Ouvertures (US735) une date plus récente ($27\,440 \pm 130$ BP). Cependant, nous émettons des réserves sur ces dates. En effet, le pourcentage de carbone est deux fois plus faible que pour les autres échantillons. De plus, ces deux échantillons donnent peu (US735) ou pas (US28) d'ADN. La matière organique y est donc mal conservée et la précision de la mesure pourrait en être affectée.

L'haplotype largement majoritaire à Chauvet-Pont d'Arc est le seul présent au Deux-Ouvertures. Cette observation peut être expliquée par deux hypothèses : les populations des deux grottes pouvaient connaître de fréquents échanges de femelles conduisant à une uniformisation génétique ; ou bien les deux populations se sont séparées relativement tardivement, ce qui n'a pas permis aux deux lignées maternelles d'accumuler suffisamment de mutations pour être différenciées.

Une étude ostéologique et ostéométrique des ours des cavernes de la Grotte des Deux-Ouvertures est envisagée afin de pallier le manque d'information concernant les spécimens de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc (Philippe *et al.*, 2009). Nos résultats en faveur d'une très grande proximité génétique et temporelle entre les populations des deux grottes montrent l'intérêt de cette approche.

2.4.3. Apports sur les causes de la disparition des ours des cavernes en Ardèche et sur la connaissance du site

L'estimation de la diversité génétique de la population d'ours des Gorges de l'Ardèche montre que celle-ci était très faible. La population effective était donc de petite taille. Par comparaison, ces deux paramètres montrent des valeurs beaucoup plus élevées chez les ours

de la Grotte de Pestera cu Oase. Ces ours sont plus anciens d'environ 15 000 ans (43 000 ans BP – 47 000 ans BP). La diminution de diversité génétique pourrait donc être le reflet de la perte plus générale observée par (Stiller *et al.*, 2010).

Ce phénomène général aurait pu être accentué par la présence humaine dans la région. Les datations dans la Grotte Chauvet-Pont d'Arc font remonter les premières intrusions humaines dans cette cavité à 32 000 ans BP, soit approximativement à la date des plus anciens échantillons d'ours des cavernes pour lesquels nous avons obtenu une séquence génétique pour la région de contrôle. Il est regrettable que les échantillons plus anciens (US28 et US01) n'aient pas permis d'amplifier de l'ADN, car cela aurait pu donner une information génétique sur l'ours des cavernes avant la fréquentation humaine de la grotte.

Les gravures de la Grotte des Deux-Ouvertures sont attribuées au Solutrén ancien, mais des charbons de bois présents dans l'unité stratigraphique ayant livré des ossements d'ours des cavernes sont en faveur d'intrusions humaines bien plus anciennes, remontant à au moins 28 000 ans BP.

Ce programme de datation des ours des cavernes de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc avait été autrefois afin de dater le moment à partir duquel les gros animaux ne pouvaient plus rentrer dans la Grotte Chauvet-Pont d'Arc. En effet, la fermeture de la cavité a été progressive et elle était complète il y a 5800 ans BP (Genty *et al.* 2004). Un os de bouquetin, daté à $22\,860 \pm 110$ ans BP (GrA-23146) (Bocherens *et al.*, 2006), indique que les animaux de grande taille pouvaient encore pénétrer dans la cavité à cette époque. Cette date est donc la date minimale pour le début de fermeture de la cavité

A cette époque, les ours des cavernes avaient déjà disparu des Gorges de l'Ardèche depuis près de 5000 ans. Ils ne permettent donc pas d'étudier la manière dont la cavité s'est fermée. Cependant, ils sont représentés dans la cavité à plusieurs reprises (Clottes, 2001). Ces dessins étant faits à l'ocre, ils ne sont pas datables par la méthode du radiocarbone.

En montrant que les ours des cavernes disparaissent de la région il y a 28 000 ans, nos données permettent d'établir l'âge minimal des représentations d'ours de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc. Ces dessins rouges sont donc antérieurs à la dernière phase de fréquentation humaine.

Partie 3 :

Etude d'un paléoenvironnement à partir de coprolithes

1. INTRODUCTION

Les coprolithes sont des fossiles fréquents sur les sites paléontologiques. La comparaison morphologique avec les excréments produits par des espèces actuelles était jusqu'à présent la seule façon de les attribuer à une espèce productrice. Ainsi, un grand nombre de coprolithes découverts dans des grottes européennes sont considérés comme des déjections d'hyène des cavernes.

Cependant, ces échantillons méritent une caractérisation plus approfondie car leur composition, forcément hétérogène, peut fournir des informations de nature variée. Les excréments contiennent en effet de l'ADN de l'espèce qui les a produits, des aliments qu'elle a ingérés, de sa flore et de ses parasites intestinaux. L'épithélium intestinal étant un des tissus de l'organisme qui se renouvelle le plus vite (Sherwood, 2005), les excréments sont très riches en ADN des entérocytes. Chez l'homme, près de 100 millions de cellules épithéliales desquament chaque minute. Pour peu que la minéralisation ne soit pas complète, les coprolithes sont donc susceptibles de fournir des données sur le génome de plusieurs espèces et de définir un paléoenvironnement en termes de métagénomique.

L'ADN du producteur, appartenant au génome mitochondrial comme au génome nucléaire, peut être retrouvé dans ces échantillons. Ainsi, des fragments de quelques centaines de paires de bases des gènes mitochondriaux 12S et 16S du paresseux géant *Nothrotheriops shastensis*, ont pu être amplifiés à partir d'un échantillon de coprolite traité au N-PTB (Poinar *et al.*, 1998, Poinar *et al.*, 2003). Ces analyses ont également montré que les coprolithes sont très riches en ADN mitochondrial, car plusieurs milliers de copies du fragment d'ADN le plus court ont été retrouvées dans un milligramme de coprolithe.

L'ADN nucléaire est également présent dans des coprolithes de paresseux, qu'il s'agisse de gènes monocopies ou multicopies. Une portion du gène 28S a ainsi pu être amplifiée et séquencée, ainsi que des fragments de 54 à 132 pb du 28^{ème} exon du gène van Willebrand Factor. Ces échantillons montrent un comportement adéquat pour de l'ADN ancien, car les fragments les plus grands sont difficilement ou pas du tout amplifiables. Ainsi le fragment de 132 pb n'a pu être obtenu qu'à une seule reprise, tandis qu'une paire d'amorces faite pour amplifier 214 pb du 28^{ème} exon du van Willebrand Factor n'a jamais permis d'obtenir le fragment.

Des séquences portant des substitutions spécifiques des amérindiens ont également été retrouvés dans coprolithes humains, dont la datation radiocarbone a permis de reculer à 12 300 ans BP l'arrivée des hommes sur le continent américain (Gilbert *et al.*, 2008c).

Les échantillons de coprolithes donnent également des informations sur la diète de l'animal qui les a produits. Dans les coprolithes de paresseux, le gène *rbcL* a été amplifié et séquencé, indiquant la présence d'au moins sept végétaux différents (Poinar *et al.*, 1998).

Des approches ciblées ont également permis d'extraire l'ADN de parasites intestinaux humains. Des œufs d'*Ascaris* ont été récupérés dans des coprolithes retrouvés à Namur, (Belgique) sur un site datant du Moyen-Age. Un fragment du gène 18S ainsi qu'une portion du gène Cytochrome b mitochondrial ont été séquencés, mais n'ont pas permis d'identifier avec certitude l'espèce à laquelle ces échantillons appartenaient (Loreille *et al.*, 2001b).

A partir de coprolithes humains retrouvés dans des sites pré-colombiens d'Amérique du Sud, des séquences des gènes 5S et SL1 d'*Enterobius vermicularis*, un helminthe parasite du tube digestif humain ont pu être mises en évidence et éclaircir la manière dont le gène SL1 a évolué depuis cette époque (Iñiguez *et al.*, 2006).

Ces études ont montré que les coprolithes sont un matériel prometteur en paléogénétique et qu'ils permettaient de répondre à de nombreuses questions. Cependant, les approches ciblées induisent un biais lors de l'amplification. Si les amorces sont sélectionnées pour amplifier une espèce ou une famille en particulier et si l'hypothèse est erronée, on ne pourra pas mettre en évidence le résultat recherché. En revanche, l'utilisation de paires d'amorces plus généralistes requiert des séquences de grande taille, difficiles à trouver dans un échantillon archéologique. En effet, il faut des séquences suffisamment longues pour mettre en évidence les différences entre espèces et posséder des portions conservées sur lesquelles choisir les amorces. Ainsi, pour identifier les plantes trouvées dans un coprolithe de paresseux, l'amplification d'un fragment de 183 pb est nécessaire (Poinar *et al.*, 1998).

Pour éviter cet écueil, nous avons préféré nous tourner vers une approche de type métagénomique. En n'apportant aucune hypothèse *a priori* sur la composition génétique de l'échantillon, nous espérons pouvoir mettre en évidence l'espèce productrice du coprolithe, ainsi que l'espèce, ou les espèces, composant son alimentation.

Pour la mise au point préalable, nous nous sommes tournés vers la Grotte de Coumère. Cette cavité possède un grand nombre de coprolithes attribués à l'hyène des cavernes, ce qui nous permettait de prélever suffisamment d'échantillons pour la mise au point. De plus, des

analyses que nous avons faites sur des échantillons d'ossements d'ours des cavernes nous avaient montré que la conservation de l'ADN ancien sur ce site est excellente.

Nous avons prélevé neuf coprolithes de la Grotte de Coumère, établi les conditions permettant l'extraction de l'ADN et sélectionné deux d'entre eux pour effectuer un séquençage massif de leur contenu en ADN. Une fois cette mise au point effectuée, nous pourrions nous tourner vers des sites soumis à des demandes d'autorisation plus sévères, comme la Grotte des Deux-Ouvertures et la Grotte Chauvet-Pont d'Arc qui contiennent respectivement des coprolithes attribués à l'hyène des cavernes et au loup.

2. ETUDE DE COPROLITHES D'HYENE DES CAVERNES

2.1. Extraction d'ADN à partir de coprolithes

Pour chaque extraction, environ 1 g de coprolithe a été extrait du cœur de l'échantillon afin d'éviter toute contamination externe.

Le morceau a été réduit en poudre grâce au Mikro-dismembrator (Sartorius), en agitant 1 à 2 min à une fréquence 3000 battements par minute. La poudre obtenue a été incubée à 42°C pendant une nuit, dans 10 ml de tampon d'extraction. L'échantillon a ensuite été centrifugé à 1000 g, pendant 5 min. Trois extractions successives ont été réalisées, la première avec un volume de phénol, la seconde avec 0,5 volume de phénol et 0,5 volume de dichlorométhane et la dernière avec un volume de dichlorométhane.

Le surnageant purifié a été concentré par centrifugation sur une colonne Centricon YM30, afin d'aboutir à un volume final de 200 µl. Un blanc d'extraction a systématiquement été traité en parallèle afin de tracer les contaminations pouvant se produire lors de cette phase.

2.1.1. Rôle de l'EDTA

2.1.1.1. Matériels et Méthodes

Deux échantillons, CC1 et CC3, ont été extraits avec deux tampons d'extraction différents. Le premier tampon, qui contient peu d'EDTA, inspiré de celui utilisé pour extraire l'ADN de

coprolithes de paresseux (Hofreiter *et al.*, 2000). Le second tampon est identique à celui utilisé pour extraire l'ADN des os (Bon *et al.* 2008) et est très riche en EDTA (Tableau 3). Les deux tampons ont été testés avec ou sans N-PTB (cf. *infra*).

	Tampon 1	Tampon 2
NaCl (mM)	100	0
Tris-HI pH 8 (mM)	100	10
EDTA (mM)	25	450
SDS (%)	0,5	0,1
DTT (mM)	50	65
protéinase K (mg/ml)	0,5	0,5

Tableau 3 : Composition des deux tampons d'extraction utilisés.

Les différents extraits ont ensuite été traités comme décrit précédemment (Bon *et al.*, 2008). Une amplification par PCR a été effectuée, avec une paire d'amorces permettant d'amplifier 84 pb du gène Cytochrome b d'hyène des cavernes (Rohland *et al.*, 2005). De 0,5% à 0,05% d'extrait ont été utilisés pour les amplifications.

2.1.1.2. Résultats et discussion

Les extraits traités avec le tampon 1 n'ont permis aucune amplification par PCR, quelle que soit la quantité d'extrait utilisée. En revanche, les extraits effectués avec le tampon 2, riche en EDTA, ont permis une amplification, même en utilisant une très petite quantité d'extrait et jusqu'à la quantité maximale utilisée. Le meilleur alignement de séquences amplifiées sur la banque de données GenBank *nt* par BLAST est obtenu avec l'hyène des cavernes.

Ces coprolithes proviennent donc vraisemblablement d'hyène des cavernes, un carnivore qui ingère les os de ses proies, et dont les fécès sont très riches en calcium. Le calcium, qui favorise la fossilisation, est un obstacle à l'extraction d'ADN. Par conséquent, un tampon d'extraction riche en EDTA est nécessaire.

2.1.2. Rôle du N-PTB

Les coprolithes de paresseux contiennent beaucoup de produits de Maillard (Poinar *et al.*, 1998). Pour parvenir à extraire de l'ADN amplifiable, il est nécessaire de traiter ces

échantillons avec du N-PTB, une molécule connue pour cliver les liaisons entre les sucres et les protéines.

Afin de tester si cette molécule est nécessaire également à l'extraction d'ADN de coprolithes de carnivores, nous avons extrait l'ADN des échantillons CC2, CC3 et CC4 en présence et en absence de N-PTB.

2.1.2.1. Matériels et Méthodes

Les extractions ont été effectuées avec le tampon 2 décrit précédemment, en présence ou en absence de 10 mM de N-PTB, dissous dans du Phosphate de Sodium. Le reste de l'extraction, et l'amplification, ont été faits comme décrit (Bon *et al.*, 2008). Les seules différences résident dans le nombre de cycles de PCR (33) et dans les amorces utilisées (identiques à celle utilisées en 2.1.1.1.).

2.1.2.2. Résultats

Pour tous les échantillons, les extraits ont permis l'amplification d'ADN, que l'extraction ait été faite en présence ou en absence de N-PTB (Figure 27).

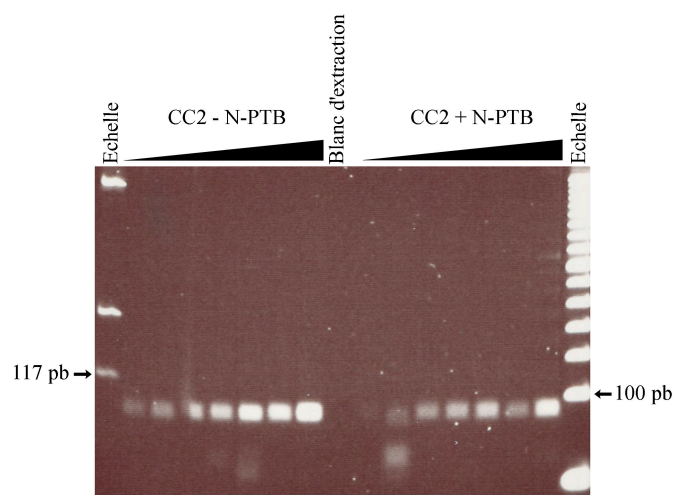


Figure 27 : Gel d'électrophorèse montrant les fragments d'ADN amplifiés par PCR, à partir des extractions effectuées sur l'échantillon CC2, en absence (à gauche) ou en présence (à droite) de N-PTB. La quantité d'extrait déposé varie de 0,005% à 0,05% de l'extrait total. Les amorces permettent d'amplifier un fragment de 84 pb du gène mitochondrial du Cytochrome b de l'hyène des cavernes ; trente-trois cycles de PCR ont été effectués.

L'amplification est possible dès les plus petites quantités d'extrait (0,005%) et ne présente pas d'inhibition lorsqu'une quantité plus importante d'extrait est utilisée. Par conséquent, la suite

des analyses a été faite avec des extraits obtenus sans N-PTB, pour limiter les risques de contamination par les réactifs.

2.1.2.3. Discussion

Contrairement à ce qui avait été suggéré dans (Poinar *et al.*, 1998), l'extraction d'ADN de coprolithes ne nécessite pas forcément l'ajout de N-PTB. Les coprolithes d'hyène des cavernes peuvent fournir de l'ADN, que l'extraction ait eu lieu ou non en présence de ce composé. Il semble donc que ces échantillons soient moins touchés que les coprolithes de paresseux par la réaction de Maillard.

2.1.3. Conclusion

Ces premières analyses reposant sur l'amplification d'un fragment du Cytochrome b plaident en faveur de l'attribution des coprolithes à l'hyène des cavernes. Ces échantillons sont très riches en ADN, car des amplifications sont possibles en utilisant de très faibles quantités d'extrait. Les coprolithes contiennent peu d'inhibiteurs, ce qui permet d'obtenir des amplifications en utilisant une quantité d'extrait variant sur deux ordres de grandeur. En revanche, ils sont très riches en carbonate et phosphate de calcium. Si le calcium participe probablement à l'excellente conservation du matériel génétique de ces échantillons, il rend nécessaire l'ajout d'EDTA pour solubiliser et extraire l'ADN.

Contrairement aux coprolithes de paresseux, l'utilisation de N-PTB n'est pas nécessaire à la bonne extraction du matériel génétique.

Les conditions d'extraction de l'ADN de coprolithes dépendent donc fortement de l'espèce productrice et vraisemblablement de la nature de son alimentation. Un régime riche en os induit une plus forte concentration en calcium, tandis que les coprolithes de paresseux présentent plus de produits de la réaction de Maillard.

2.2. Analyse métagénomique

2.2.1. Choix des échantillons

Afin d'obtenir une information non biaisée sur l'espèce productrice du coprolithe, ainsi que sur les espèces constituant son alimentation et son paléoenvironnement, nous avons décidé d'appliquer une méthode de séquençage global à des extraits d'ADN de coprolithes.

Nous avons extrait l'ADN de sept des dix échantillons avec le tampon 2, en l'absence de N-PTB, ciblant un fragment de 84 pb du Cytochrome b d'hyène des cavernes. Pour percevoir les différences entre échantillons, la PCR ne contient que 33 cycles. Nous avons sélectionné les échantillons dont le profil montre une grande quantité d'ADN et peu d'inhibiteurs (Figure 28).

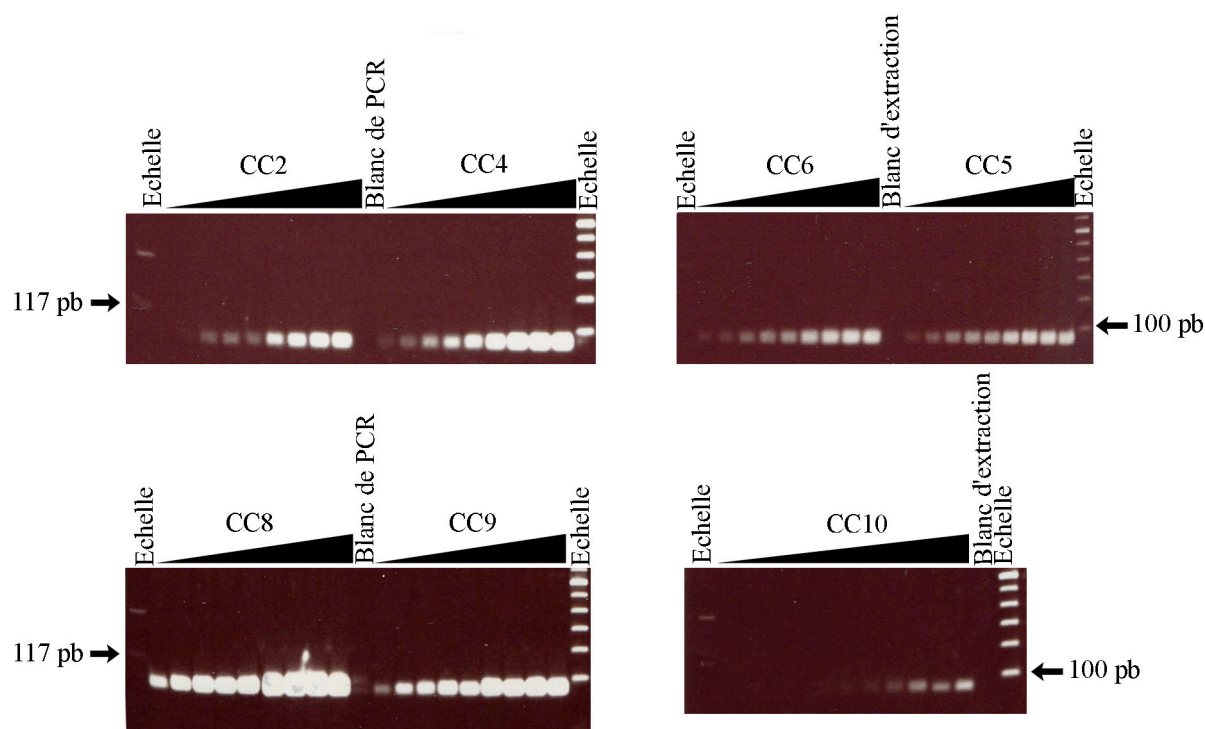


Figure 28 : Gels d'électrophorèse montrant les fragments d'ADN amplifiés par PCR à partir des extraits de sept coprolithes. La quantité d'extrait varie de 0,005% à 0,5% de l'extrait total. Les amorces permettent d'amplifier un fragment de 84 pb du gène mitochondrial du Cytochrome b de l'hyène des cavernes. Trente-trois cycles de PCR ont été effectués.

Afin de choisir les échantillons possédant les fragments d'ADN ancien les plus longs, nous avons enfin testé les échantillons CC5, CC8 et CC9 avec des amorces permettant d'amplifier

un fragment de 127 pb, et nous avons effectué comme précédemment 33 cycles de PCR (Figure 29).

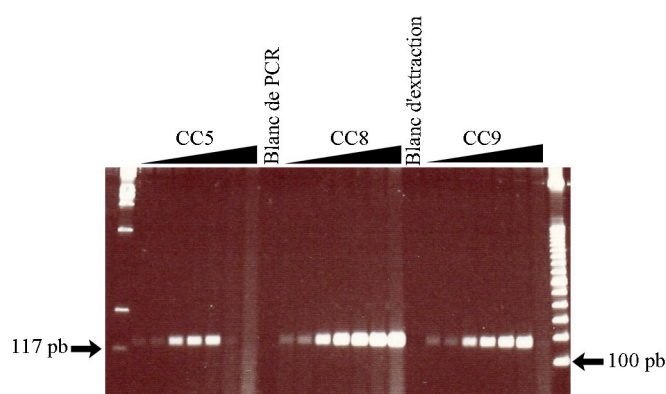


Figure 29 : Gels d'électrophorèse montrant les fragments d'ADN amplifiés par PCR à partir des extraits de trois échantillons de coprolithes. La quantité d'extrait varie de 0,005% à 0,5% de l'extrait total et le nombre de cycles de PCR est de 33. Les amorces permettent l'amplification d'un fragment de 127 pb du Cytochrome b d'hyène des cavernes.

Les deux échantillons choisis pour le séquençage global sont les échantillons CC8 et CC9, car ils présentent les profils les plus favorables.

2.2.2. Séquençage massif des deux banques d'extraits de CC8 et CC9

L'échantillon CC8 étant celui qui possède le plus d'ADN d'hyène des cavernes et qui montre le moins d'inhibition, nous l'avons choisi pour la première analyse. Nous avons construit huit banques d'ADN en utilisant le protocole Illumina, avec une quantité variable d'extrait (de 1 µL à 10 µL d'extrait). Une de ces banques ne contient que 5 µL de blanc d'extraction, et pas d'extrait de coprolithe, afin de vérifier l'absence de contamination. Une partie de chacune de ces banques a été clonée dans le vecteur pCR®4-TOPO®, puis le vecteur a été inséré dans une souche d'*Escherichia coli* chimio-compétente. De 50 à environ 200 clones ont été séquencés par séquençage Sanger.

Des séquences appartenant à des Carnivores, particulièrement à des Féliiformes, ont été observées dans toutes les banques, à l'exception de celle constituée du blanc d'extraction. La taille moyenne des séquences dans les différentes banques est comprise entre 30 et 35 pb.

La banque fabriquée à partir du blanc d'extraction ne contenait que des adaptateurs, ce qui montre que nos conditions expérimentales permettent de s'affranchir des contaminations.

La taille moyenne des fragments étant inférieure à 35 pb, nous avons donc choisi d'effectuer un séquençage Illumina, avec une profondeur de séquençage de 50 pb. Cependant, 15% des séquences étaient longues de plus de 50 pb. Pour séquencer la banque construite à partir de CC9, nous avons donc choisi une profondeur de séquençage plus importante, de 75 pb.

Par ailleurs, CC8 étant l'échantillon pour lequel l'ADN est le mieux préservé et qui contient le moins d'inhibiteur, c'est sur lui que nous avons fait porter la majorité de nos efforts. Nous avons donc effectué 67 millions de séquences sur cet échantillon, alors que nous n'avons séquencé que 25 millions de fragments pour CC9.

2.2.3. Résultats de l'analyse métagénomique : Article 3

A METAGENOMIC PERSPECTIVE ON PLEISTOCENE PREDATOR-PREY INTERACTIONS. Bon C., Berthonaud V., Maksud F., Labadie K., Poulain J., Artiguenave F., Wincker, P., Aury, J.-M., Elalouf J.-M. *en préparation*.

Biological Sciences/ Evolution

A metagenomic perspective on Pleistocene predator-prey interactions

Céline Bon^a, Véronique Berthonaud^a, Frédéric Maksud^b, Karine Labadie^c, Julie Poulain^c, François Artiguenave^c, Patrick Wincker^c, Jean-Marc Aury^c, Jean-Marc Elalouf^{ca,1}

^aInstitut de Biologie et Technologies de Saclay, Service de Biologie Intégrative et Génétique Moléculaire, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France; ^bService Régional de l'Archéologie, 32 rue de la Dalbade, BP811 31080 Toulouse cedex 6, France; ^cGénoscope, Centre National de Séquençage, CEA Evry, 2 rue Gaston Crémieux, 91006 Evry cedex, France.

¹Address correspondence to:

Jean-Marc Elalouf

Institut de Biologie et Technologies de Saclay, Service de Biologie Intégrative et Génétique Moléculaire, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France

jean-marc.elalouf@cea.fr

Tel: (33) 1 69088022

Fax: (33) 1 69084712

Key words: ancient DNA; Coprolite; Coumère Cave; *Cervus elaphus*; *Crocota crocuta spelaea*; mitochondrial genome

Data deposition footnote: The DNA reads of this study have been deposited at EBI under accession number ERA030882 and ERA030883. GenBank entries for annotated sequences are JF894376-JF894380.

Supporting information: 1 Supporting text (supporting methods, supporting references, and supporting Figure legends); 6 Supporting Figures; 3 Supporting Tables

Abstract

To gain a metagenomic insight into past events, we performed high-throughput sequencing of DNA from fossilized feces. The material surveyed consisted of ten coprolites from a French Pyrenean site, two of which were selected for deep sequencing and yielded more than 90 million DNA reads. These reads enabled deciphering complete mitochondrial genomes for the extinct cave hyena (*Crocota crocuta spelaea*) with a 35 to 158-fold coverage. Together with complete mitochondrial genomes for the spotted and striped hyena that we sequenced from extant specimens, the cave hyena sequences allow establishing a robust phylogeny of *Hyaenidae* that evidence extensive similarities between the cave and spotted hyenas. Searching for cave hyena nuclear DNA, we demonstrate that the high-throughput strategy yields sequence data for multicopy as well as for single-copy cave hyena nuclear genes, and that up to 42% of the coprolite DNA material can be ascribed to this predator species. Analyzing the data for additional mammalian species that may highlight the cave hyena diet, we only retrieved abundant sequences for the red deer (*Cervus elaphus*), and characterized its mitochondrial genome with a 3.5 to 3.8-fold coverage. We conclude that coprolites contain abundant animal DNA, and that metagenomic profiling allows unbiased identification of the defecator species. Furthermore, by depicting a predator-prey interaction, metagenomic sequencing of carnivore coprolites provides an ethologic perspective to ancient DNA analysis.

Introduction

Genomic sequencing of archeological remains yielded complete mitochondrial and nuclear genomes for thousands (1-3) to tens of thousands year-old (4-7) human and animal specimens. The field however is challenged by the paucity of endogenous DNA in bone and tooth samples, that typically range between less than 1% to 5% of the genetic material (7-9). To circumvent this limitation, analysis of well-preserved, permafrost-embedded specimens (1-2, 4-5) or privileged niches such as hair shafts (1-2, 5, 10) have been promoted, but this restricts the studies to specific species and burying conditions. Additionally, experimental procedures that consist in the targeted retrieval of specific DNA sequences (9, 11-12), or digestion with restriction enzymes to cut bacterial DNA that colonized bone samples *post mortem* (7) have been used. However, current DNA sequencing technologies deliver such large datasets that both the genome and metagenome could be simultaneously characterized and yield insights onto a species and its paleoenvironment, providing relevant specimens are identified. Coprolites, *i.e.* fossilized feces, are a promising source to achieve this goal, for they are expected to contain DNA of the defecator and of the animal or plant species it ingested. Analyzing all the genetic material of such samples should therefore help deciphering the genome and diet of a species. Furthermore, because coprolites cannot be readily identified through paleontological criteria, the global analysis of DNA content should provide an unbiased assay for their characterization.

Previous studies demonstrated that targeted amplification of small DNA fragments from Pleistocene coprolites is feasible. Poinar *et al.* (13) reported that ground sloth coprolites contain DNA sequences for this extinct species and for plant species that may have been part of its diet. Importantly, human coprolites have also been successfully analyzed for

mitochondrial genome fragments (14). However, the notion that coprolites accumulate products of the Maillard reaction that adversely affect the enzymatic manipulation of DNA (13) likely prevented the broad application of high-throughput sequencing to such material. Clearly, more specimens and a variety of species need to be analyzed to explore the relevance of new methodologies for characterizing DNA from fossilized feces. In the present study, we undertook the analysis of coprolites that are abundant in European cave sites. They are traditionally ascribed to the cave hyena (*Crocuta crocuta spelaea*), a species that withdrew from Europe by the end of the Pleistocene, although definite evidence supporting this identification has not been provided up to now. From a series of coprolites collected in a French Pyrenean site (Coumère Cave, Ariège), we evidence samples suitable for large-scale DNA sequencing. They provide molecular data on a predator species, and allow deciphering a predator-prey interaction.

Results and Discussion

We collected coprolites from the Coumère Cave (Fig. 1A, Fig. S1). The cave contains thirty such coprolites, provisionally ascribed to the extinct cave hyena (*Crocota crocuta spelaea*). It also displays abundant cave bear (*Ursus spelaeus*) remains, a cave hyena skull, and a single red deer (*Cervus elaphus*) tooth. We performed DNA extraction using a buffer containing N-phenacylthiazolium bromide (PTB) to cleave possible cross-links between macromolecules, a procedure that was shown essential to recover amplifiable DNA from ground sloth coprolites (13). When tested for DNA content with PCR primers targeting a fragment of the cave hyena mitochondrial cytochrome B gene, all coprolite extracts failed to yield any amplification product. This suggested that the DNA extraction procedure and/or PCR assay was inappropriate for these samples. We reasoned that carnivore coprolites contain high amounts of calcium originating both from the bones ingested and the fossilization process. We therefore performed new series of extraction using an EDTA-rich buffer. This allowed complete dissolving of the samples and obtaining amplifiable cave hyena DNA from most of them, irrespective of the presence or absence of PTB. Two samples (CC8 and CC9), which stood out from the others for the amount of DNA and were almost devoid of PCR inhibitors (Fig. 1B), were selected for further studies.

We prepared libraries of DNA fragments (Fig. 1C) in a dedicated laboratory where modern DNA had never been introduced. We slightly modified the Illumina procedure (15) for the purpose of analyzing ancient DNA, generated the libraries from 2.5-5% of the extracts, and sequenced them. Reads length were scaled to 50 or 75 nucleotides and yielded 67.3 million and 25 million of DNA sequences for CC8 and CC9 libraries, respectively. We obtained

libraries of high complexity (>96% unique fragments) which, as expected for ancient DNA, mostly contained very short fragments (Fig. 2).

Our data mining procedure rested both on the analysis of individual reads and contigs obtained by *de novo* assembly of the reads (16). We aligned the reads to the complete set of nucleotide sequences in GenBank *nt* and to the whole genome shotgun sequence entries in GenBank *wgs* using the program MEGABLAST (17). The largest number of hits (6.1% of the reads) corresponded to the domestic cat (*Felis catus*). This observation is consistent with PCR evidence of cave hyena DNA in the extracts, since the domestic cat is the closest species to the cave hyena (a *Feliformia*) for which a nuclear genome sequence is available. However, considering that these two species belong to different families (*Hyaenidae* vs *Felidae*) and that approximately 65% of the euchromatin cat genome sequence has been deciphered (18), the number of cave hyena sequences is likely underestimated by database search. Further evidence of abundant *Hyaenidae* DNA in the coprolites was obtained by *de novo* assembly of the reads, which yielded a series of contigs matching with high confidence the partially characterized mitochondrial genome of extant hyenas. The size of these contigs (up to 8.3 kb) strongly suggested that our dataset should enable recovering a complete mitochondrial genome for the cave hyena. However, since reconstructing this genome required a closely related sequence upon which the sequences could be assembled, we first characterized the complete mitochondrial genome of the extant spotted (*Crocuta crocuta*) and striped (*Hyaena hyaena*) hyenas. The best alignment was obtained with the spotted hyena and allowed merging the contigs into a provisional cave hyena sequence which was used to retrieve all sequence reads harboring a maximum of one mismatch and one indel. This strategy yielded complete mitochondrial genomes of 17,138-bp with an average unique read depth of 35^x (CC9) to 158^x (CC8) (Fig. 3A). This high redundancy, and the agreement rate between

individual reads and the consensus sequence (Fig. S2) ensure that we deliver reliable cave hyena mitochondrial genome sequences.

The current dataset increases by almost two orders of magnitude the amount of genetic information available for the cave hyena (19). The two cave hyena mitochondrial genome sequences differ from each other by two substitutions located in the repetitive motifs of the control region, which may be of little significance since such motifs are difficult to sequence and align in ancient specimens, and are not taken into account for phylogenetic analyses (10, 20). These two mitochondrial genomes, together with those for the extant spotted and striped hyena, were used to perform a comprehensive phylogeny of *Feliformia* (Fig. 3B). The topology of the tree was robustly supported, and unequivocally establishes the close evolutionary relationship between the spotted and the cave hyena. The cave hyena genomes display 115 differences with the spotted hyena sequence. Some of these were screened and systematically confirmed by PCR (Fig. S3), providing further support for the accuracy of the genome characterized by shotgun sequencing of coprolites.

The extensive coverage of the cave hyena mitochondrial genome indicated that it was relevant to quantitatively evaluate the number of nuclear DNA sequences for this species in coprolite samples. This was performed using the deepest sequenced specimen (CC8) for which we obtained 2.39 Gb. First, significant coverage of the cave hyena nuclear genome was established by analyzing the 18S gene, which displays approximately 200 copies in mammalian genomes (21). The full-length sequence of this gene (1869 nucleotides) was obtained by contigs assembly, and the individual reads revealed a 75-fold coverage (Fig. 4A). The ratio of the 18S read depth to the number of copies for this gene (75/200) provides an estimate of the genome coverage of 38%. Second, selecting a set of fourteen phylogenetically

informative genes that have been characterized in a number of *Feliformia* species (22), we searched for hyena sequences in the dataset. For all fourteen genes we obtained reads that, despite single-pass sequencing for most fragments, returned a relevant phylogeny (Fig. S4). The coverage for these genes averaged $32\pm 5\%$ (Fig. 4B), a value close to the one deduced from the 18S genes analysis. Assuming a genome size of 3 Gb, the $\sim 32\%$ coverage predicts that our reads provide about 1 Gb of cave hyena nuclear DNA. From the 2.39 Gb sequenced, we therefore anticipate that 42% ($1/2.39$) can be ascribed to the cave hyena. Hence, both mitochondrial and nuclear data points to the large amount of cave hyena DNA in coprolite extracts.

Besides providing genomic information on a predator, coprolites are of interest for paleodiet analysis. To gain a molecular insight into predator-prey interactions, we searched for DNA reads that may reliably highlight additional animal species. Mitochondrial genomes are well suited for this purpose, since there are available for a large number of extant and extinct species. By comparing the number of DNA reads that perfectly align to such genomes, we obtained differences that spanned two orders of magnitude from one species to another (Fig. 5A). The highest numbers of matches were obtained for the cave hyena and the red deer (*Cervus elaphus*). As outlined in *Methods*, hits for other species consisted of evolutionary conserved portions of mammalian mitochondrial genomes, and correspond to the background of the analysis. To better explore the prey sequences, we retrieved all DNA reads that aligned with one or the other of the available deer mitochondrial genomes, while discarding reads that reliably matched the genome of other taxons. These *Cervidae* sequences enabled the characterization of mitochondrial genomes with a $3.5\times$ (CC8) to $3.8\times$ (CC9) coverage. Phylogenetic analysis demonstrated that these mitochondrial sequences correspond to *Cervus*

elaphus DNA (Fig. 5B, Fig. S5). Thus, metagenomic sequencing of coprolites enables picturing a predator-prey association.

Direct dating of the coprolites was not feasible, but current evidence establishes that the cave hyena withdrew from Europe during the late Pleistocene, some 15,000 to 25,000 years BP (23), setting a minimal age for our samples. Up to now, Pleistocene animal specimens were held to contain very small percentages of endogenous DNA, with the exception of permafrost-trapped samples, notably hair shafts (10). Our study, which delivers a wealth of sequence data for the cave hyena and ancient red deer specimens, points to coprolites as an additional rich source of DNA for genomic studies of Pleistocene species.

Cave hyena coprolites are available from a variety of archeological sites and museum collections throughout Europe. We report here on libraries of DNA fragments that were generated from 25-50 mg of coprolite material. Screening a large number of coprolites from a wide range of locations is thus feasible without extensive damage to the samples. This should allow characterizing the diversity of cave hyena preys, with the possibility of obtaining DNA data on species barely studied, identifying eventual dietary preferences, and ultimately portray the paleoenvironment of a vanished animal.

Methods

DNA sequences authentication and contamination issues

To guarantee the authenticity of the DNA fragments retrieved from coprolites, we followed previous recommendations for works performed on ancient DNA (24-25). First, to avoid contaminations from previous and current analyses, initial steps (*i.e.* DNA extraction, generation of metagenomic libraries, and set-up of PCR reactions) were carried out in a dedicated laboratory located in a building where no molecular work on modern DNA was performed. Second, negative controls included mock extracts both for metagenomic studies and PCR experiments (Fig. 1B, Fig. 1C). Third, we observed an expected molecular behavior for the ancient DNA extracts, with the predominance of short DNA fragments (Fig. 2). Fourth, reproducibility of PCR experiments was assessed using the same and a second DNA extract. Fifth, the metagenomic libraries mainly contained DNA from wild (as opposed to laboratory) animal species that had not been previously analyzed by our group (Fig. 5A). To further analyze possible contaminants, we aligned reads matching the *Homo sapiens* mitochondrial genome to the nt/nr databank by BLAST, and confirmed that these reads belonged to evolutionary conserved portions of mammalian mitochondrial genomes. By contrast, reads matching the *Crocuta crocuta* or *Cervus elaphus* mitochondrial genome revealed genuine hyena and deer sequences (Fig. 3B, Fig. 5B). Sixth, to limit nucleotide misidentifications caused by post-mortem DNA damage, which mostly consist in cytosine to uracil deamination, we used Phusion DNA polymerase (that cannot replicate through uracil) to produce the libraries (2). The extensive coverage of the cave hyena mitochondrial genome (Fig. 3A) allowed calculating a sequencing accuracy >99% (Fig. S2). In addition, PCR

verification procedures included replicate samples, cloning and sequencing of both DNA strands from several clones to deduce a consensus sequence for each amplicon.

Coprolite samples and DNA extraction

We collected a total of ten coprolites from the Coumère Cave which is located at 680 m above sea level on the territorial division of Balaguères (Ariège, France). For DNA extraction, we used 0.8-1g of material retrieved from the coprolite core. The sample was ground to powder in a Mikro-Dismembrator S (Sartorius; Goettingen, Germany) set to a shaking frequency of 3,000 rpm for one minute, then transferred to 10 ml of DNA extraction buffer A or B supplemented or not with 10 mM (PTB).

Extraction buffer A (25 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 0.5% SDS, 50 mM DTT, 0.5 mg/ml Proteinase K) was used following the observation that a low-EDTA buffer is efficient to recover PCR-amplifiable ancient DNA from ground sloth coprolites, providing it is supplemented with PTB (13). Mock and coprolite samples were incubated 40 h at 42°C under constant agitation in extraction buffer A with or without PTB. We noticed that this protocol did not allowed dissolving the coprolite material. After centrifugation (3,000 g, 10 minutes), the supernatant was recovered, extracted once with one volume of phenol, once with a phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1) mixture, and once with chloroform. The aqueous phase was then concentrated using Centricon YM-30 (Millipore, Billerica, MA), and the column was washed 5-times with distilled water. The DNA extract was subsequently recovered as a ~ 200- μ l sample volume.

Because extractions carried out with buffer A failed to provide amplifiable DNA from all samples, we devised an alternative strategy which consisted of using an EDTA-rich buffer to

help dissolving coprolite samples. Extraction buffer B (450 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 % SDS, 65 mM DTT, 0.5 mg/ml proteinase K) is thus identical to the one successfully used to extract ancient DNA from fossilized bones (20). Mock and coprolite samples were incubated 40 h at 42°C under constant agitation in this buffer, which enabled dissolving the fossilized material near completion. Subsequent steps of DNA extraction were carried out as described above.

Selection of samples

Coprolite samples were screened by PCR using primers (Table S1) designed from the partial mitochondrial cytochrome B sequence of the cave hyena (19). First we used primer pair 1, which predicts the amplification of a 84-bp fragment, and performed a number of PCR cycles (45 cycles) high enough to detect trace amounts of DNA. Then, to better evidence differences between samples, we used primer pair 2, which predicts the amplification of a 127-bp DNA fragment, and performed a much lower number of PCR cycles (33 cycles).

Amplification was carried out in a 50- μ l reaction volume containing mock or ancient DNA extracts, 300 pM of forward and reverse primers (Table S1), 200 μ M dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 5 μ l of GeneAmp 10X PCR buffer II, and 2.5 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). After an activation step (95°C, 8.5 min), a single round of 33 or 45 PCR cycles (95°C, 15 sec; 53-56°C (according to primers *T_m*), 20 sec; 70°C, 1 min) was performed in a Veriti Applied Biosystems thermal cycler. The full reaction volume was loaded onto an 8 % polyacrylamide gel stained with Sybr Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA), the PCR amplicons were eluted from the gel and inserted into pCR4-TOPO (Invitrogen). Plasmid minipreparations of the clones were sequenced on a 3130 XL DNA

sequencer using BigDye 3.1 terminator chemistry (Applied Biosystems). We systematically analyzed eight colonies for each cloned fragment, sequenced both DNA strands using M13 forward and T3 primers, and deduced a consensus sequence for each PCR fragment from these 16 Sanger reads.

Generation of metagenomic libraries

Libraries of DNA fragments suitable for single-pass sequencing with the Illumina procedure (15) were generated following recommendations from the manufacturer (San Diego, CA), except for the following modifications that were introduced for the purpose of analyzing ancient DNA. First, the initial step of the procedure was omitted since it consists in the nebulization of DNA to produce fragments of less than 800 bp. This step is obviously useless for ancient DNA, which essentially consists of fragments shorter than 200 bp. In addition, by omitting the fragmentation step, high molecular weight modern DNA is unlikely to enter the sequencing pipeline, thus greatly reducing contamination sources. Second, the amount of adapter introduced in the ligation reaction was reduced three to ten times as compared to the one recommended for libraries generated from 5 μ g of modern DNA. Third, the adapter-ligated material was amplified using 40% of the ligation reaction and 12 PCR cycles. This number of PCR cycles favorably compares to that used for generating libraries from 0.5-5 μ g of modern DNA (range: 10-12 PCR cycles) and was found high enough to provide robust amplification.

Because generating libraries of DNA fragments involves multiple steps, we felt essential to control the entire process for possible contamination. We therefore treated in parallel mock and coprolite extracts, and only obtained robust PCR signals from the coprolite samples (Fig.

1C). This demonstrates that our laboratory procedures were stringent enough to avoid contamination from external sources, as well as cross-contamination between samples.

We generated a total of 10 libraries (2 from mock, and 8 from coprolite samples) using 0.5 to 5% of DNA extracts prepared without PTB, and four of them were selected for high-throughput DNA sequencing. They correspond to 3 libraries generated from 2.5% (two libraries) or 5% (one library) of the CC8 DNA extract, and one library produced from 2.5% of a CC9 extract.

Metagenomic sequencing

Metagenomic DNA sequencing was performed on the Illumina genome analyser IIx platform. For CC8 coprolite specimen, aliquots of the libraries were sequenced in 2-4 lines of the Illumina flow cell. The sequencing depth was set to 51 nucleotides, and data acquisition rested on SCS2.4/RTA1.4 softwares. Overall, the 8 cell lines of the flow cell returned 67.3 million of high quality DNA reads, which after clipping the adapter and removal of sequences <10 nucleotides provided 66.7 million unique fragments with an average length of 36.3 nucleotides. For CC9 specimen, a single line of the flow cell was analyzed, the read length was set to 76 nucleotides, and the platform was implemented with SCS2.6/RTA 1.6 softwares. This resulted in 25.0 million of high quality DNA reads, 24.2 million of which corresponded to unique sequences with an average length of 36.2 nucleotides. Data analysis was carried out using sequence reads ≥ 20 nucleotides. This corresponds to 65.3 million reads (2.39 billions of nucleotides) for CC8 sample, and to 23.6 million of reads (0.86 billion of nucleotides) for CC9 sample.

Sequencing of the extant spotted and striped hyena mitochondrial genomes

High-molecular-weight genomic DNA was extracted from spotted hyena fresh feces and striped hyena blood samples as described (26). The fresh feces extract was subsequently dialyzed using Centriplus YM-30 (Millipore, Billerica, MA). Amplification of mitochondrial genome fragments was first performed with primers targeting sequences conserved in *Feliformia* mitochondrial genomes; primers specific for the spotted hyena or the striped hyena were subsequently selected from our sequence data to obtain DNA fragments that fill the gaps. Overlapping 1 to 15kb-long amplicons were generated from 10-50 ng of genomic DNA using PfuUltra II fusion hotstart DNA polymerase (Agilent, Santa Clara, CA) following recommendations of the manufacturer. Sequencing was performed on cloned or purified PCR products, using vector or species-specific primers, BigDye 3.1 terminator chemistry, and a 3130 XL DNA genetic analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA). We systematically sequenced both DNA strands and assembled the reads using Sequencher software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Overall genome coverage was of 4^x and 5^x for the striped hyena and cave hyena sequences, respectively. Assessment of PCR and sequencing fidelity was achieved through the detection of a single substitution between overlapping clones or fragments for the whole project.

Generation of sequence contigs from metagenomic DNA reads

Assembly was carried out on unique DNA reads using SOAPdenovo software (16) with a perfect match identity over 23 nucleotides. For CC8 sample, this provided 901,176 contigs

with an averaged size of 43 nucleotides. For CC9 sample, we obtained 466,967 contigs with an average size of 64 nucleotides.

Assembly of the cave hyena mitochondrial genome sequence

Contigs were aligned to the mitochondrial genomes of the extant spotted and striped hyenas using 85% score identity. The largest number of hits was obtained with the spotted hyena genome. For CC8 coprolite sample, we obtained 89 contigs ranging in size from 24 to 1,908 nucleotides. For CC9 coprolite sample, we retrieved 19 contigs ranging in size from 28 to 8,278 nucleotides. The contigs spanned 98.8% of the mitochondrial genome, with only two gaps in the control region domains that display tandem repeats. From these contigs we deduced a provisional consensus sequence using the spotted hyena mitochondrial genome to fill the gaps. This sequence served as a bait to retrieve all DNA reads for the cave hyena mitochondrial genome using BWA software (27) and scoring parameters consisting of one mismatch and one indel. This strategy returned 74,485 and 19,238 reads for CC8 and CC9 sample, respectively. Consensus sequences for each sample were then deduced using SAMtool package (28). Reads for DNA fragments located in the tandem repeat domains were manually aligned.

Assembly of the cave hyena 18S nuclear gene

Contigs were aligned on the cat 18S gene (available from GenBank *wgs* contig AANG01534509) using 95% score identity. We obtained contigs encompassing the entire cave hyena 18S sequence (1,869 nucleotides) for both samples. For CC8, the gene sequence was assembled from 24 overlapping contigs ranging in size from 35 to 361 nucleotides. For

CC9, the gene sequence was assembled from 3 overlapping contigs ranging in size from 159 to 1309 nucleotides. These sequences were then used to retrieve individual reads through alignment carried out with BWA software, allowing one mismatch and one indel. Each read was then aligned using BLAST software to sequences recorded in the GenBank *nt* database, and reads whose best hit was not a mammalian 18S gene were discarded. For CC8 sample, we obtained 4,927 reads, yielding an average unique read depth of 75^x (Fig. 3B). For CC9 sample, we obtained 1,981 reads, and the average unique read depth was 31^x.

Analysis of nuclear gene segments

We selected fourteen genes among the two dozens that have been previously analyzed in the spotted hyena, because orthologous sequences for each of them are available from a large number of *Feliformia* (22). DNA reads for CC8 sample were aligned to each of these 14 sequences using BWA software, allowing one mismatch and one indel. Each retrieved read was then compared to the GenBank *nt* database by BLAST, and reads which also matched an unrelated gene were discarded.

Identification of the cave hyena's prey

We aligned the reads from CC8 and CC9 dataset to several mammalian mitochondrial genomes using BWA software, allowing no mismatch. Comparison of CC8 and CC9 samples was performed by expressing the number of perfect match for each species per million reads.

Assembly of the deer mitochondrial genome sequence

CC8 and CC9 DNA reads were aligned to all *Cervidae* mitochondrial genomes using BWA software, allowing one mismatch and one indel. Reads that perfectly matched the cave hyena mitochondrial genome were discarded. The remaining reads were then aligned to the GenBank *nt* database using BLAST, and only reads whose best hit was a *Cervidae* sequence were retained. For CC8 sample, we obtained 1,576 reads, yielding an average unique read depth of 3.5^x and a sequence information for 14,706 nucleotides of the genome. For CC9 sample, we obtained 2,007 reads, yielding an average unique read depth of 3.8^x and a sequence information for 14,631 nucleotides of the genome.

Sequence alignment and phylogenetic analysis

Cave, extant spotted and extant striped hyena mitochondrial genomes were aligned to *Feliformia* mitochondrial genomes recorded in GenBank (Table S2). Alignment was performed with ClustalW using MEGA4 software (29), set with default parameters. The domains of the control region that display taxon-related insertions or deletions (nucleotide 211 to 598 , and 16250 to 16740), including the two portions with tandem repeat motifs, were discarded for the phylogenetic analysis.

Cervidae mitochondrial sequences from CC8 and CC9 samples were aligned with *Cervidae* mitochondrial genomes available in GenBank (Table S2) using MEGA4 software and default parameters. Only positions recorded for both CC8 and CC9 (13,748 nucleotides) were used for the phylogenetic analysis.

Phylogenetic trees were constructed with Maximum Likelihood and Bayesian phylogenetic inference using PhyML (30) and MrBayes (31-32), respectively. We used the general time

reversible model with gamma distributed rates across sites (4 categories) and invariable sites. Bayesian analysis was carried out using four Metropolis coupled Markov Chain Monte Carlo for at least one million generations, and sampling trees every 100 generations. PhyML analysis was performed using both SPR and NNI tree improvements. To estimate the robustness of the phylogenetic tree, we used the bootstrap method and performed 500 replicates.

Acknowledgments

We thank B. Mulot (Beauval zoo, France) for spotted hyena samples, F. Huyghe (Cerza zoo, France) for striped hyena samples, A. Martel and D. Adams for help in data analysis. This work was supported by grants from the CEA. C.B. received PhD funding from the CEA.

References

1. Gilbert MT, *et al.* (2008) Paleo-Eskimo mtDNA genome reveals matrilineal discontinuity in Greenland. *Science* 320:1787-1789.
2. Rasmussen M, *et al.* (2010) Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature* 463:757-762.
3. Edwards CJ, *et al.* (2010) A complete mitochondrial genome sequence from a mesolithic wild aurochs (*Bos primigenius*). *PLoS One* 5:e9255.
4. Poinar HN, *et al.* (2006) Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science* 311:392-394.
5. Miller W, *et al.* (2008) Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature* 456:387-390.
6. Green RE, *et al.* (2008) A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing. *Cell* 134:416-426.
7. Green RE, *et al.* (2010) A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 328:710-722.
8. Noonan JP, *et al.* (2005) Genomic sequencing of Pleistocene cave bears. *Science* 309:597-599.
9. Noonan JP, *et al.* (2006) Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. *Science* 314:1113-1118.
10. Gilbert MT, *et al.* (2007) Whole-genome shotgun sequencing of mitochondria from ancient hair shafts. *Science* 317:1927-1930.
11. Briggs AW, *et al.* (2009) Targeted retrieval and analysis of five Neandertal mtDNA genomes. *Science* 325:318-321.

12. Burbano HA, *et al.* (2010) Targeted investigation of the Neandertal genome by array-based sequence capture. *Science* 328:723-725.
13. Poinar HN, *et al.* (1998) Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science* 281:402-406.
14. Gilbert MT, *et al.* (2008) DNA from pre-Clovis human coprolites in Oregon, North America. *Science* 320:786-789
15. Bentley DR, *et al.* (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456:53-59.
16. Li R, *et al.* (2009) SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics* 25:1966-1967.
17. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7:203-214.
18. Pontius JU, *et al.* (2007) Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. *Genome Res* 17:1675-1689.
19. Rohland N, *et al.* (2005) The population history of extant and extinct hyenas. *Mol Biol Evol* 22:2435-2443.
20. Bon C, *et al.* (2008) Deciphering the complete mitochondrial genome and phylogeny of the extinct cave bear in the Paleolithic painted cave of Chauvet. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17447-17452.
21. Paule MR (1998) in *Transcription of Ribosomal RNA Genes by Eukaryotic RNA Polymerase I*, ed Paule MR (Springer-Verlag, New-York), pp. 1-8.
22. Johnson WE, *et al.* (2006) The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. *Science* 311:73-77.
23. Stuart AJ, Lister AM (2007) Patterns of Late Quaternary megafaunal extinctions in Europe and northern Asia. *Cour Forsch Inst Senckenberg* 259:287-297.

24. Pääbo S, *et al.* (2004) Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 38:645-679.
25. Willerslev E, Cooper A (2005) Ancient DNA. *Proc Biol Sci* 272:3-16.
26. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) in *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York), pp 9.17-9.19.
27. Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754-1760.
28. Li H, *et al.* (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078-2079.
29. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599.
30. Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696-704.
31. Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-755.
32. Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.

Legend to figures

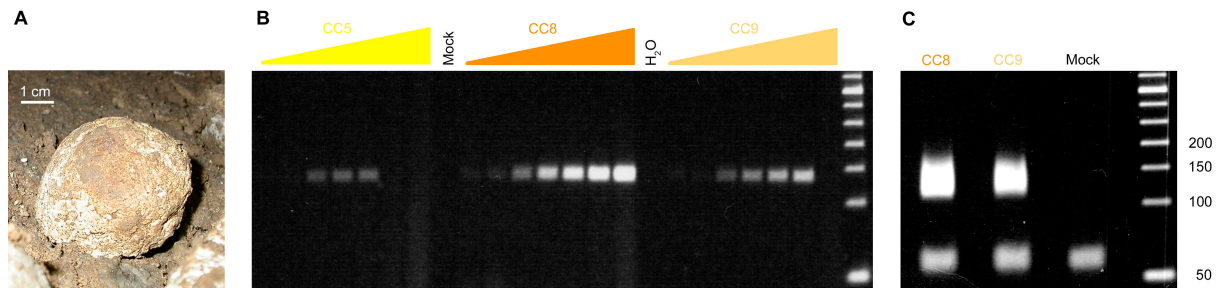


Fig. 1. Selection of coprolites. (A) Coumère Cave coprolite. (B) PCR amplification of a fragment of the cave hyena mitochondrial cytochrome B gene. Amplification (33 PCR cycles) was carried out on 0.04 to 2.5% of each DNA extract. The identity of the 127-bp DNA amplicon was checked by Sanger sequencing of cloned fragments. (C) Production of libraries of DNA fragments for metagenomic sequencing. Coprolite and mock extracts ligated to oligonucleotide adapters were amplified using 12 PCR cycles. The upper band (specific for coprolite samples) was recovered for Illumina sequencing. The lower band corresponds to PCR primer dimers. Right lane: 50-bp DNA ladder.

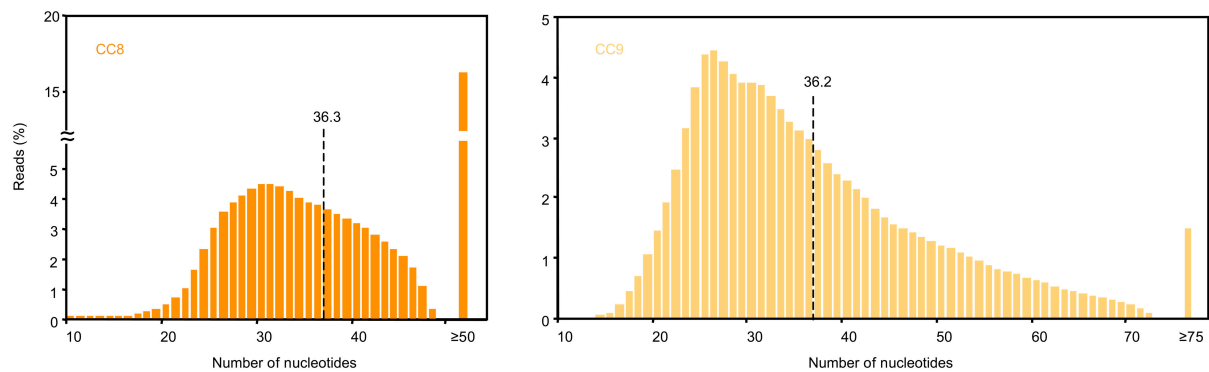


Fig. 2. Size distribution of metagenomic DNA reads. Dotted lines indicate average read length.

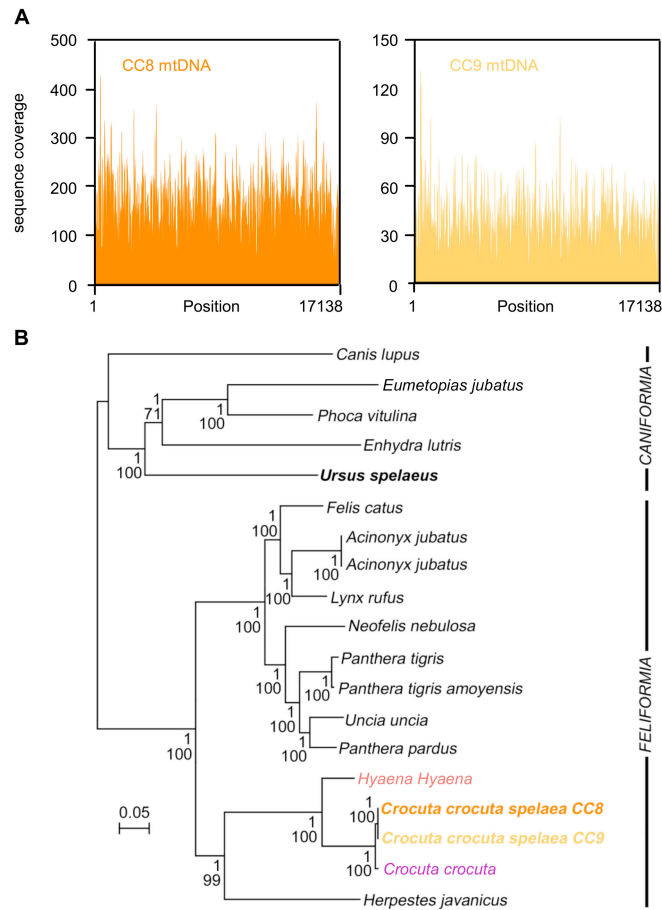


Fig. 3. Cave hyena mitochondrial genome. (A) Number of reads for each position of the cave hyena mitochondrial genome for CC8 and CC9 coprolite samples. (B) Phylogenetic analysis of the cave hyena with complete mitochondrial genome sequences. Tree construction was performed by Bayesian phylogenetic inference using *Caniformia* sequences for delineating an outgroup. The posterior probability and bootstrap values that support the nodes are indicated for Bayesian phylogenetic inference and maximum likelihood analysis, respectively. Bold characters correspond to extinct species, and colored characters indicate mitochondrial genomes provided by this study. The scale indicates the genetic distance.

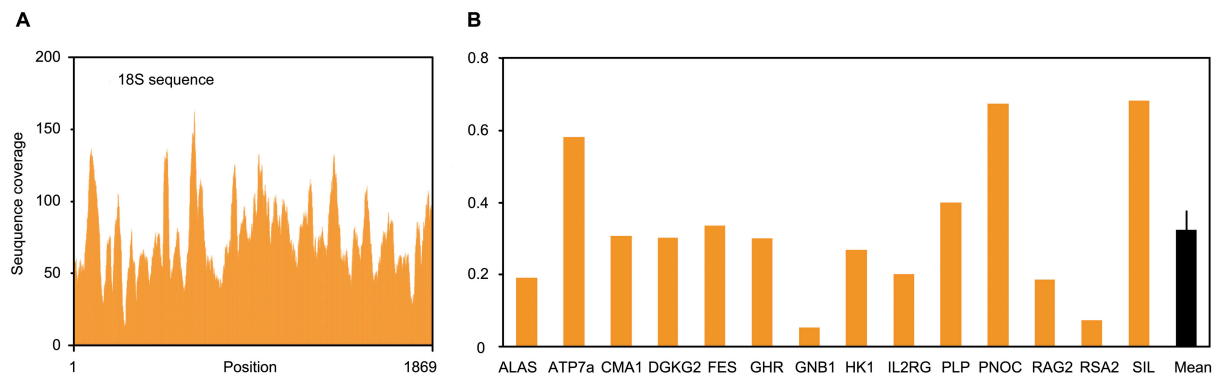


Fig. 4. Cave hyena nuclear sequence data for CC8 coprolite. (A) Number of reads for each position of the multicopy cave hyena 18S sequence. (B) Individual sequence coverage of 14 cave hyena nuclear genes. The dark column indicates the mean read depth $\pm$ SEM for the 14 genes.

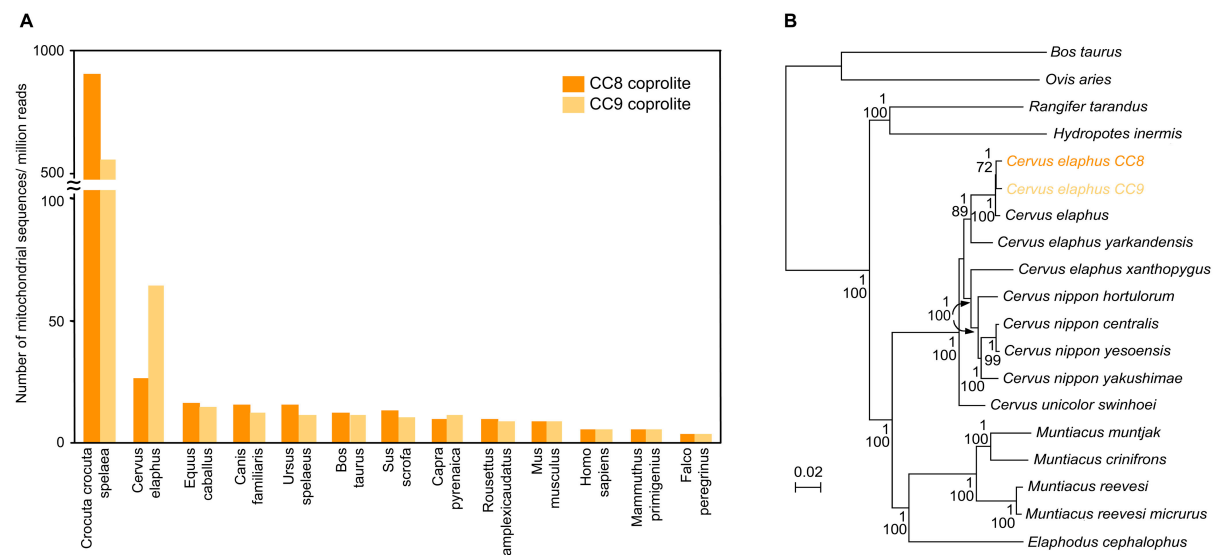


Fig. 5. Identifying *Cervus elaphus* DNA by metagenomic sequencing of coprolites. (A) Number of sequences that display a perfect match to the indicated mitochondrial genomes (B) Phylogenetic analysis of the *Cervidae* mitochondrial sequences retrieved from CC8 and CC9 coprolite samples. Tree construction was performed by Bayesian phylogenetic inference using *Bos taurus* and *Ovis aries* sequences for delineating an outgroup. The posterior probability >0.60 and bootstrap values >60 that support the nodes are indicated for Bayesian phylogenetic inference and maximum likelihood analysis, respectively. The scale indicates the genetic distance.

Supporting Information

Bon et al. “A metagenomic perspective on Pleistocene predator-prey interactions”

SI Methods

Targeted analysis of cave hyena mitochondrial genome fragments

To check for some of the differences between the cave and spotted hyena mitochondrial genome sequences, we performed PCR analysis of coprolite extracts. Amplification was carried out in a 50- μ l reaction volume containing 0.1 μ l of mock or ancient DNA extracts, 300 pM of forward and reverse primers (Table S1), 200 μ M dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 5 μ l of GeneAmp 10X PCR buffer II, and 2.5 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). After an activation step (95°C, 8.5 min), a single round of 45 PCR cycles (95°C, 15 sec; 53-57°C (according to primers *Tm*), 20 sec; 70°C, 1 min) was performed in a Veriti Applied Biosystems thermal cycler. The full reaction volume was loaded onto an 8 % polyacrylamide gel stained with Sybr Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA), the PCR amplicons were eluted from the gel and inserted into pCR4-TOPO (Invitrogen). Plasmid minipreparations of the clones were sequenced on a 3130 XL DNA sequencer using BigDye 3.1 terminator chemistry (Applied Biosystems). As generally observed with ancient DNA, sequence differences were observed from one clone to another as well as from one PCR fragment to another (1-2). This is mostly expected to come from the fact that, by contrast to Phusion DNA polymerase that was used to produce metagenomic libraries, Taq polymerase do replicate through uracil. Consequently, cytosine deamination to uracil (the most frequent damage encountered in ancient DNA) yields a high rate of CG to TA transitions for amplicons generated with Taq polymerase. This experimental artifact is

efficiently overcome by analyzing several PCR replicates and sequencing several clones from each amplicon (1-3). We therefore systematically analyzed eight colonies for each cloned fragment, sequenced both DNA strands using M13 forward and T3 primers, and deduced a consensus sequence for each PCR fragment from these 16 Sanger reads. As shown in Fig. S3, the super-consensus sequence deduced from 3-4 PCR replicates consistently agrees with the genome assembled using Illumina reads.

PCR analysis of cave hyena nuclear genes

To independently assess the presence of cave hyena nuclear DNA fragments in coprolites, we performed PCR analysis of the CC8 extract. Experimental procedures were similar to those described for PCR analysis of mitochondrial genome fragments, except for the amount of extract (0.1 to 0.5 μ l). We selected primers for three of the genes used for phylogenetic analysis, as well as a set of primers for five additional genes. Ten out of the twelve primer pairs enabled successful DNA amplification and yielded hyena sequences (Table S1, Fig. S6), providing further support to the presence of a diversity of cave hyena nuclear DNA fragments in the coprolite extract.

Sequence alignment and phylogenetic analysis

Cave hyena nuclear gene segments from CC8 were aligned with the fourteen nuclear *Feliformia* sequences (Table S3) using MEGA4 software (4) and default parameters. Only positions of the alignment for which a sequence information (total length, 2221 nucleotides) was available for the cave hyena were used for phylogenetic analysis.

Cervidae cytochrome B sequences from CC8 and CC9 samples were aligned with orthologous *Cervidae* sequences, including sequences available for the extinct *Megaloceros giganteus*, using MEGA4 software and default parameters. Only positions recorded for both CC8 and CC9 cytochrome B (904 nucleotides) were used for the phylogenetic analysis (Fig. S5).

SI References

1. Pääbo S, *et al.* (2004) Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 38:645-679.
2. Willerslev E, Cooper A (2005) Ancient DNA. *Proc Biol Sci* 272:3-16.
3. Bon C, *et al.* (2008) Deciphering the complete mitochondrial genome and phylogeny of the extinct cave bear in the Paleolithic painted cave of Chauvet. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17447-17452.
4. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599.

SI Figure legends

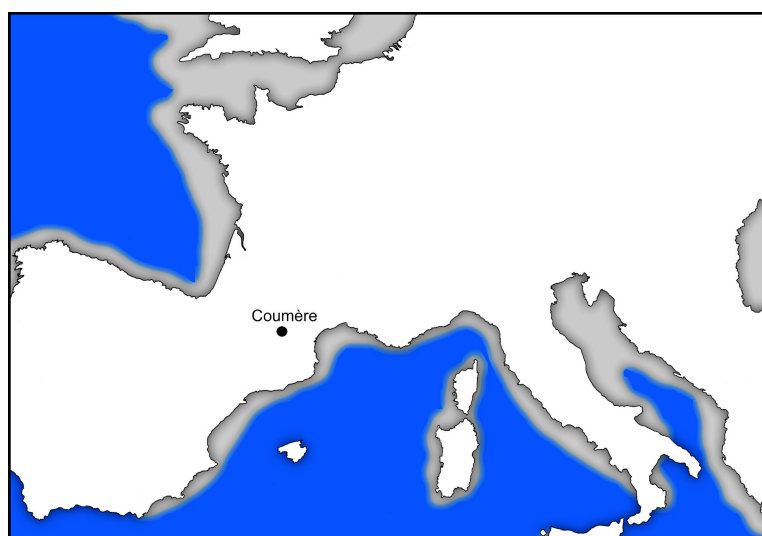


Fig. S1. Geographical localization of the Coumère Cave.

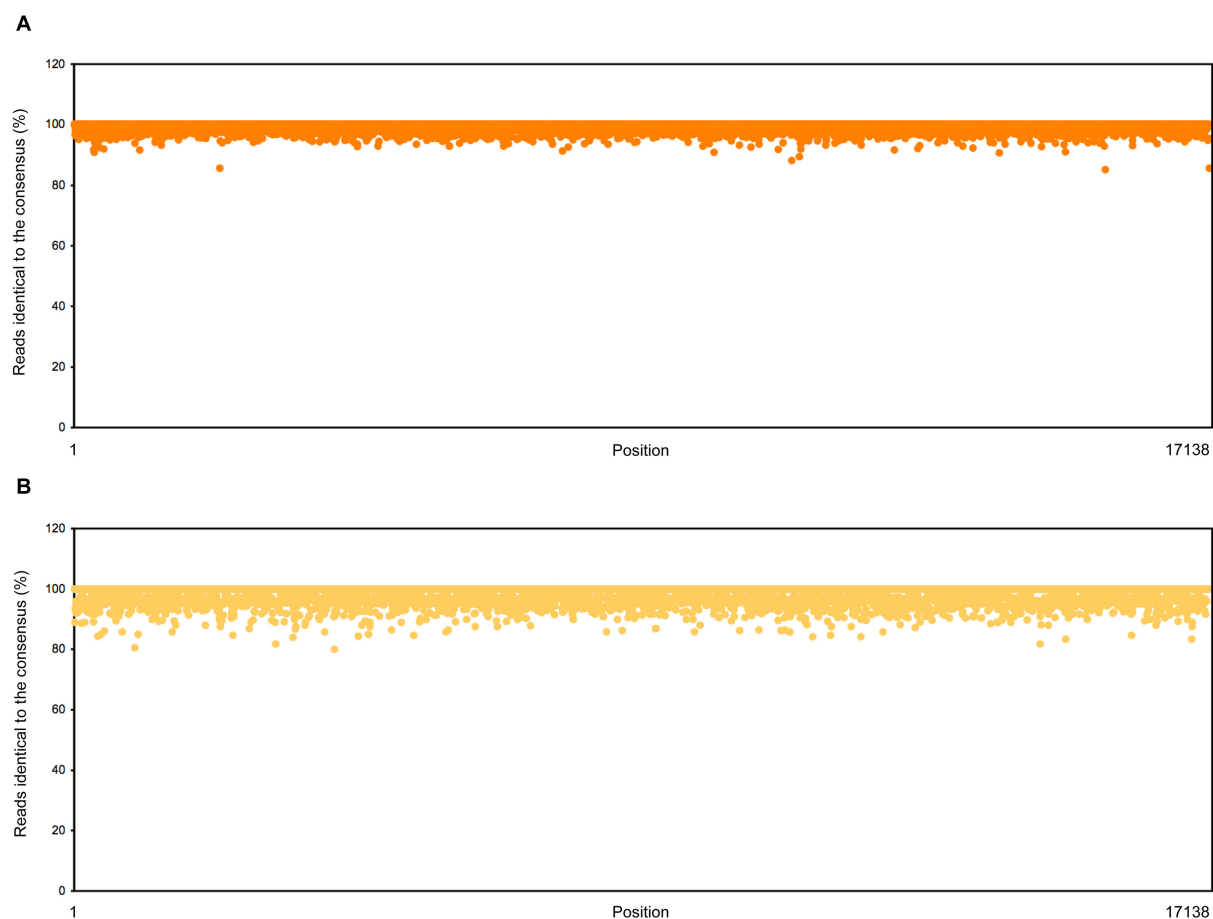


Fig. S2. Experimental support to the assembled cave hyena mitochondrial genome sequence. The figure shows the percentage of nucleotides delivered by Illumina reads that agree with the consensus at each position of the genome. (A) CC8. (B) CC9.

CYTB (primer pair 1)
 CCACATCTGCCGAGACGTTAACTACGGCTGAATCATCCG

CYTB (primer pair 2)
 TATATATACACATCGGCCGAGGAATATACTACGGATCTTATACACTCCCAGAGACGTGAAATACCGGAATCCTACTACTATT

 -----C-----
 -----T-----

CYTB (primer pair 3)
 CTACGGCTGAATCATCCGATACATACACGCCAACGGAGCTTCATATCTTCATCTGTCTATATATACACATCGGCCGAGGAATATACTACGGATCTTATACACTCCCAGAGACGTGAAATACCG

 -----T-----T-----T-----T-----T-----
 -----T-----

GAATCCTACTACTATT

COII (primer pair 4)
 TAGAAGTCGACAAACCGAGTAATCTACCCGTAGAGATAACCATCCGAATACTGATTTCATCCGAAGACGTCCTACACTCGTGGACTGTGCCATCCCTGGGC

 -----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----
 -----A-----A-----A-----A-----A-----
 -----G-----C-----G-----

D-loop (primer pair 5)
 ACACAAGCACCACACTACAAGGACGAACACATAAACCATCCATAAATGACGTTACGCTCACACGGATCCAGCATGTTGAAATACATTACATGTGCTGTGTACGGTTAGCTGTTTGTGGACAT

 -----A-----A-----A-----A-----A-----
 -----A-----C-----C-----T-----A-----C-----T-----

TAGTA

 -----AC-----

D-loop (primer pair 6)
 CACTATGCTAGGATCTTGATGATATCAGACAAGGTGTTATTCAGTTAATGGTTACAGGACATATACTTCAACC

 -----G-----A-----G-----

Fig. S3. PCR analysis of cave hyena mitochondrial DNA. Black: cave hyena mitochondrial genome sequence deduced from CC8 Illumina reads. Orange: sequence obtained by PCR amplification of the CC8 DNA extract; each line displays the consensus of several clones for a single PCR experiment. Purple: mitochondrial genome sequence of the extant spotted hyena specimen. Hyphens indicate conserved residues.

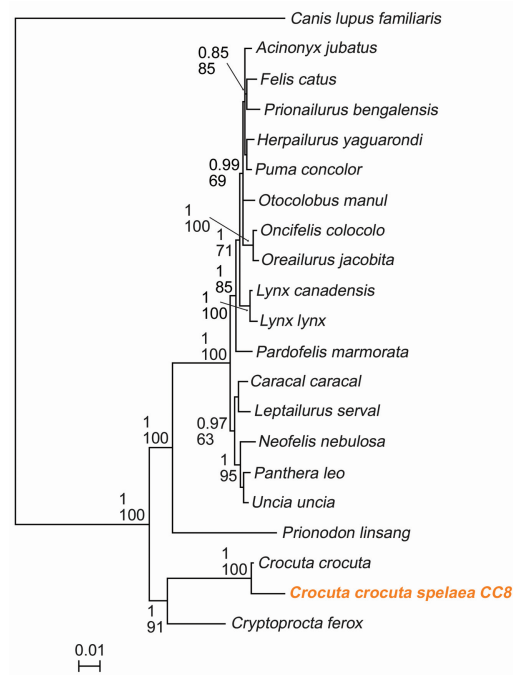


Fig. S4. Phylogeny of *Feliformia* based on nuclear genes. Tree construction was performed by Bayesian phylogenetic inference and rooted using *Canis lupus familiaris* genes. The posterior probability >0.60 and bootstrap values >60 that support the nodes are indicated for Bayesian phylogenetic inference and maximum likelihood analysis, respectively. The scale at the bottom of the figure indicates the genetic distance.

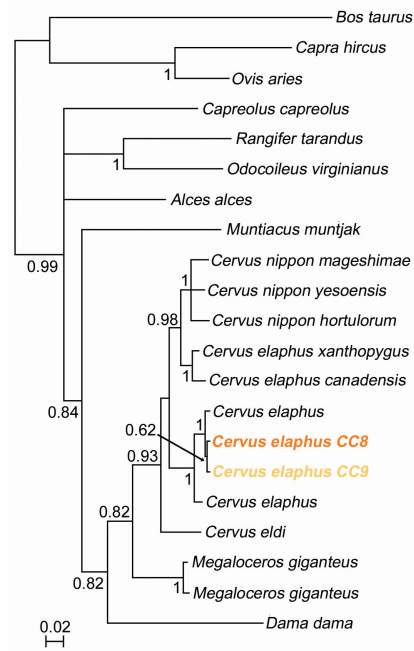


Fig. S5. Phylogeny of *Cervidae* based on mitochondrial cytochrome B gene sequences. Tree construction was performed by Bayesian phylogenetic using *Bovidae* sequences for delineating an outgroup. Only posterior probability values >0.60 are depicted. The scale at the bottom of the figure indicates the genetic distance. GenBank accession number (from top to bottom) are as follows: EF693798, AB004075, AB006800, AJ000024, AJ000029, AY607035, JF489131, AF042718, AB021092, AB160860, GU367600, AB021097, AF423198, AB001612, AJ000021, FJ556560, AM182644, AM182645, and X56290.

APOB (primer pair 7)
 TCATCCATTGAAATTAACATATGATTTCAATTCCCCAACCTGTACTCTACT
 -----A-----A-----

APP (primer pair 8)
 GGTGACCATTTATAGAATAACGTGGAAAAGAAACAAACCTTCTGTTTTCTTATTACTCAT
 -----A-AA-----

GNAT1 (primer pair 9)
 GTCCATAGTCACCTCCAACCACTCCACCCCTGCCCTCAGGACGACGCCGCAAGTTGATGCACATGGGG
 -----T-----T-----A-----
 -----A-----T-----

IRBP (primer pair 10)
 CACCTCACAAGAGGAAATGCTGGCCCGCTGCAGAAAGGGCATCCGTCACGAGGTCTGGAGGGCAACGTG
 -----A-----AA-----

IRBP (primer pair 11)
 TGTAGGGGTGCCCTGGACCTCCAGAGCTGAGGATAGGCCAGTCTGAC

PNOC (primer pair 12)
 TTTTGAGCTGCTTCTGCTCCATCTCTCCAGCCTCATCCATGCTGGGCTGTGCCCT

RAG2 (primer pair 13)
 TTTTTCGCTGCATGGAGAAAGATTGGTAGGAGATGTTCCCGAAGCCAGATATG
 -----A-----AA-----
 -----A-----

SIL (primer pair 14)
 GCTCAGCCTTCACCAATTACCGGTAAGGATTGGGAAAGGGCAAGGAATAAGTCACAGGGCAGT
 -----A-----A-----
 -----A-----

SIL (primer pair 15)
 GAGTTGAGTTGGTGTCTAACGTTCCCTTGGCCAGGTCTGGTTCTCACCCCTTTCTGGGCTCC

WT1 (primer pair 16)
 AGACAGACATCAGAGGTGGCTGGAAATGCCCGCTCCCCAGGCCACCAGGAGGAGGTCTCGTGG
 -----G-----

Fig. S6. PCR analysis of cave hyena nuclear DNA. Black: cave hyena gene sequence deduced from the PCR replicate samples. Orange: results of individual PCR experiments; each line displays the consensus of several clones for a single PCR experiment. Purple: spotted hyena gene sequences available in GenBank. Cave hyena sequence data were obtained from the CC8 coprolite sample. Hyphens indicate conserved residues.

Table S1. Oligonucleotide primers used for PCR analysis of cave hyena mitochondrial (primer pair 1-6) and nuclear DNA (primer pair 7-16).

Primer pair	Forward primer	Reverse primer	Amplicon (bp)
1	CAACCGCCTTCTCATCAGTGAC	AAGCTCCGTTGGCGTGTATGTAT	84
2	AGCTTCCATATTCTTCATCTGTC	GAATGCGGTAGCTATTACTGTG	127
3	ACATCTGCCGAGACGTAA	GAATGCGGTAGCTATTACTGTG	182
4	AAAACCAGGGGAACACTACGACTAT	GGAATGGCATCGGTCTTTAG	144
5	CCAACCCCTATAACCACTAAAC	ATTATGCCTATGCGGACA	170
6	GCGGTTTGTAGCTGGACTTATT	CTGTCCCGGTTGATCATTAG	116
7	CAAGTCAAAGCCTACCGTCTCT	GTCAACTGCCCCCTTAGC	91
8	CCATTGCTTCACGACCCATC	CGGCTGTCAAAAGGCGGTA	101
9	GGCTCAAGACTGGGCTCAA	CGTACCCTCCTCGATGGTGT	109
10	CAAGCCCCAGCACTCAC	GTCCACACGCAGGTAGCC	108
11	GTGGTGGGCGAGCGGAC	ACGGGCACGGTGAGGAAGAA	86
12	TGAAGCCCCCAAACCTC	GCCTAATCCAAGCCCAGAA	93
13	TGGCAAGAACAACAAAAAGTTAC	GTACACCACATCAATGGAATGAC	100
14	TGCCCTTGCTCACTCCT	GGCCAACCCTCTCCATATGTT	103
15	CAGTGAAGGGCCAGTCAGCTT	AGGGCACCTGGTCTGGGATA	102
16	GCTGGGGGAATCTGAGGGTG	CGTGGGGGCATAATGAGGC	103

Table S2. GenBank accession number of mitochondrial genomes used for phylogenetic analysis.

Carnivora species	GenBank	Pecora species	GenBank
Acinonyx jubatus	AF344830	Cervus elaphus	AB245427
Acinonyx jubatus	AY463959	Cervus elaphus yarkandensis	GU457435
Felis catus	U20753	Cervus elaphus xanthopygus	GU457434
Herpestes javanicus	AY873843	Cervus nippon centralis	AB211429
Lynx rufus	GQ979707	Cervus nippon yakushimae	AB218689
Neofelis nebulosa	DQ257669	Cervus nippon yesoensis	AB210267
Panthera pardus	EF551002	Cervus nippon hortulorum	GU457433
Panthera tigris	EF551003	Cervus unicolor swinhoei	EF035448
Panthera tigris amoyensis	HM589214	Elaphodus cephalophus	DQ873526
Uncia uncia	EF551004	Hydropotes inermis	EU315254
Canis lupus	AM711902	Muntiacus crinifrons	AY239042
Enhydra lutris	AB291077	Muntiacus muntjak	NC_004563
Eumotopias jubatus	GU475464	Muntiacus reevesi	NC_004069
Leptonychotes weddellii	AM181025	Muntiacus reevesi micrurus	NC_008491
Phoca vitulina	X63726	Rangifer tarandus	AB245426
Ursus spelaeus	EU327344	Bos taurus	AF492351
		Ovis aries	NC_001941

Table S3. GenBank accession number of the nucleotide sequences used for phylogenetic analysis of nuclear genes.

	ALAS	ATP7a	CMA1	DGKG2	FES	GHR	GNB1
<i>Acinonyx jubatus</i>	DQ082560	DQ082604	DQ081913	DQ081956	DQ081997	DQ082084	DQ082169
<i>Canis lupus familiaris</i>	U17083	AY011436	U89607	AAEX02021639	AY885365	DQ205835	AAEX02008927
<i>Caracal caracal</i>	DQ082565	DQ082609	DQ081918	DQ081960	DQ082001	DQ082089	DQ082173
<i>Crocuta crocuta</i>	DQ082585	DQ082629	DQ081938	DQ081980	DQ082021	DQ082108	DQ082191
<i>Cryptoprocta ferox</i>	DQ082589	DQ082634	DQ081941	DQ081983	DQ082026	DQ082113	DQ082196
<i>Felis catus</i>	DQ082546	DQ082590	DQ081900	DQ081942	DQ081984	DQ082070	DQ082156
<i>Herpailurus yaguarondi</i>	DQ082559	DQ082603	DQ081912	DQ081955	DQ081996	DQ082083	DQ082168
<i>Leptailurus serval</i>	DQ082567	DQ082611	DQ081920	DQ081962	DQ082003	DQ082091	DQ082175
<i>Lynx canadensis</i>	DQ082563	DQ082607	DQ081916	DQ081958	DQ081999	DQ082087	DQ082171
<i>Lynx lynx</i>	DQ082562	DQ082606	DQ081915	DQ081957	DQ081998	DQ082086	DQ082170
<i>Neofelis nebulosa</i>	DQ082583	DQ082627	DQ081936	DQ081978	DQ082019	DQ082106	DQ082189
<i>Otocolobus manul</i>	DQ082553	DQ082597	DQ081906	DQ081949	DQ081991	DQ082077	DQ082162
<i>Oncifelis colocolo</i>	DQ082573	DQ082617	DQ081926	DQ081968	DQ082009	DQ082097	DQ082181
<i>Oreailurus jacobita</i>	DQ082570	DQ082614	DQ081923	DQ081965	DQ082006	DQ082094	DQ082178
<i>Panthera leo</i>	DQ082578	DQ082622	DQ081931	DQ081973	DQ082014	DQ082101	DQ082184
<i>Pardofelis marmorata</i>	DQ082577	DQ082621	DQ081930	DQ081972	DQ082013	DQ082100	DQ082183
<i>Prionailurus bengalensis</i>	DQ082555	DQ082599	DQ081908	DQ081951	DQ081993	DQ082079	DQ082164
<i>Prionodon linsang</i>	DQ082584	DQ082628	DQ081937	DQ081979	DQ082020	DQ082107	DQ082190
<i>Puma concolor</i>	DQ082558	DQ082602	DQ081911	DQ081954	DQ081995	DQ205831	DQ082167
<i>Uncia uncia</i>	DQ082582	DQ082626	DQ081935	DQ081977	DQ082018	DQ082105	DQ082188

Table S3 (continued)

	HK1	IL2RG	PLP	PNOC	RAG2	RSA2	SIL
<i>Acinonyx jubatus</i>	DQ082211	DQ082649	GU931135	DQ082299	DQ082344	DQ082389	DQ082434
<i>Canis lupus familiaris</i>	AAEX02011684	AAEX02004726	GU931145	AY011861	XM_540537	GU931289	AAEX02029683
<i>Caracal caracal</i>	DQ082216	DQ082654	DQ082697	DQ082304	DQ082349	DQ082394	DQ082439
<i>Crocuta crocuta</i>	DQ082236	DQ082674	DQ082717	DQ082324	DQ082369	DQ082414	DQ082459
<i>Cryptoprocta ferox</i>	DQ082239	DQ082679	DQ082722	DQ082329	DQ082374	DQ082419	DQ082463
<i>Felis catus</i>	DQ082197	DQ082635	DQ082680	DQ082285	AF203771	DQ082375	DQ082420
<i>Herpailurus yaguarondi</i>	DQ082210	DQ082648	DQ082693	DQ082298	DQ082343	DQ082388	DQ082433
<i>Leptailurus serval</i>	DQ082218	DQ082656	DQ082699	DQ082306	DQ082351	DQ082396	DQ082441
<i>Lynx canadensis</i>	DQ082214	DQ082652	DQ082696	DQ082302	DQ082347	DQ082392	DQ082437
<i>Lynx lynx</i>	DQ082213	DQ082651	DQ082695	DQ082301	DQ082346	DQ082391	DQ082436
<i>Neofelis nebulosa</i>	DQ082234	DQ082672	DQ082715	DQ082322	DQ082367	DQ082412	DQ082457
<i>Otocolobus manul</i>	DQ082204	DQ082642	DQ082687	DQ082292	DQ082337	DQ082382	DQ082427
<i>Oncifelis colocolo</i>	DQ082224	DQ082662	DQ082705	DQ082312	DQ082357	DQ082402	DQ082447
<i>Oreailurus jacobita</i>	DQ082221	DQ082659	DQ082702	DQ082309	DQ082354	DQ082399	DQ082444
<i>Panthera leo</i>	DQ082229	DQ082667	DQ082710	DQ082317	DQ082362	DQ082407	DQ082452
<i>Pardofelis marmorata</i>	DQ082228	DQ082666	DQ082709	DQ082316	DQ082361	DQ082406	DQ082451
<i>Prionailurus bengalensis</i>	DQ082206	DQ082644	DQ082689	DQ082294	DQ082339	DQ082384	DQ082429
<i>Prionodon linsang</i>	DQ082237	DQ082673	DQ082716	DQ082323	DQ082368	DQ082413	DQ082458
<i>Puma concolor</i>	DQ082209	DQ082647	DQ082692	DQ082297	DQ082342	DQ082387	DQ082432
<i>Uncia uncia</i>	DQ082233	DQ082671	DQ082714	DQ082321	DQ082366	DQ082411	DQ082456

2.2.4. Résultats et discussion complémentaires

2.2.4.1. *Intérêt des coprolithes d'hyène des cavernes pour l'étude génétique d'un paléo-environnement*

Cette analyse montre la présence d'ADN de deux espèces animales dans les coprolithes de la Grotte de Coumère. L'espèce majoritaire représentée est un carnivore (l'hyène des cavernes) et la seconde un herbivore (le cerf élaphe). Par conséquent, nous en déduisons que ces coprolithes mettent en évidence une relation proie-prédateur et qu'ils correspondent à des excréments fossilisés d'hyène des cavernes. Cette conclusion est renforcée par la quantité notable d'ADN d'hyène des cavernes dans les coprolithes, qui compose plus de 40% du matériel génétique total.

Les études métagénomiques menées sur des os animaux ou humains montrent que de 1 à 5% seulement de l'ADN provient de l'espèce étudiée (Noonan *et al.*, 2005; Blow *et al.*, 2008; Ramirez *et al.*, 2009; Green *et al.*, 2010). Seuls les tissus conservés congelés possèdent une fraction plus importante d'ADN endogène (Poinar *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2008; Rasmussen *et al.*, 2010). Les coprolithes font donc partie des échantillons archéologiques pour lesquels la proportion d'ADN d'intérêt est la plus élevée.

Pour les ossements d'ours des cavernes que nous avons étudiés dans la deuxième partie, nous n'avons obtenu une amplification de l'ADN ancien qu'à condition d'effectuer au moins 45 cycles de PCR. Or la plupart des échantillons de coprolithes, extraits à partir de la même quantité de matériel archéologique, permettent une amplification dès 33 cycles de PCR. Ceci montre que la quantité absolue de matériel génétique appartenant à l'espèce étudiée est des milliers de fois plus élevée.

Les coprolithes sont donc bien des échantillons dont la quantité d'ADN ancien endogène est beaucoup plus importante que celle retrouvée dans les os, que ce soit de manière absolue ou par rapport à la quantité d'ADN contaminant.

L'étude a également permis de montrer que les coprolithes d'hyène des cavernes contiennent de l'ADN des proies ingérées par l'animal. La proportion d'ADN des proies varie selon les coprolithes, et CC9 contient comparativement plus d'ADN de Cervidés que CC8. Cette proportion peut dépendre de la quantité de proie ingérée, ainsi que de la richesse en matériel génétique des tissus consommés. La dégradation de l'ADN de la proie dans le système

digestif peut aussi jouer un rôle. Si les sucs gastriques sont particulièrement virulents, le matériel génétique risque d'être dégradé avant que l'excrément ne soit émis.

2.2.4.2. Homogénéité génétique entre les deux coprolithes.

À l'exception de deux substitutions, les deux séquences mitochondriales obtenues pour CC8 et CC9 sont identiques. De plus, les deux substitutions sont dans des motifs répétés de la région de contrôle, alignés manuellement et n'ont donc vraisemblablement pas de signification biologique.

Un fragment de 366 pb du Cytochrome b avait été amplifié pour 26 échantillons d'hyène des cavernes (Rohland *et al.*, 2005) et avait permis de définir cinq haplotypes mitochondriaux. Ces haplotypes se regroupent en deux haplogroupes, l'un composé uniquement de séquences appartenant à *C. crocuta spelaea* (appelé haplogroupe B) l'autre composé également de séquences provenant d'hyènes tachetées modernes *C. crocuta* (haplogroupe A).

C'est à l'haplogroupe A qu'appartiennent les séquences correspondantes de CC8 et CC9. Une séquence identique à celles de la Grotte de Coumère est ainsi retrouvée chez des hyènes provenant de cinq sites répartis dans toute l'Europe, de l'Altai à la Vienne, en France. Cet haplotype est donc couramment répandu en Europe. L'identité génétique de CC8 et de CC9 n'est donc pas un argument suffisant pour en déduire que les deux coprolithes ont été produits par le même individu.

Les deux échantillons montrent que le bol alimentaire se compose de cerf élaphe. La couverture des séquences mitochondriales de cervidés est insuffisante pour en déduire des génomes complets. Cependant, on peut noter que les deux génomes partiels sont presque identiques et sont regroupés dans un arbre phylogénétique.

L'uniformité de l'alimentation suggère que le cerf était une proie régulière de l'hyène ou que les échantillons ont été émis à peu de temps d'intervalle, alors que le troupeau de cerfs résidait dans la région.

La présence d'un nombre différent de pollens dans les deux coprolithes permet de penser qu'ils ne proviennent pas du même bol alimentaire. Cependant ils ont été produits par des individus provenant de la même lignée maternelle.

Ainsi, l'étude d'échantillons provenant de la même cavité ne semble pas permettre d'observer la diversité de l'alimentation de l'hyène des cavernes. L'étude et la comparaison de coprolithes d'hyènes des cavernes provenant de sites divers permettront une analyse plus riche de la diversité génétique des hyènes des cavernes, ainsi que de leurs habitudes alimentaires.

2.3. *Datation radiocarbone*

Nous avons tenté de dater ces échantillons à deux reprises. Tout d'abord, un fragment de chacun des deux échantillons a été envoyé à Johannes van der Plicht, qui avait daté les ossements d'ours des cavernes d'Ardèche avec succès. Cependant, lors du traitement, les deux échantillons ont été totalement dissous, ce qui ne laissait aucune matière organique datable. Nous nous sommes donc tournés vers la compagnie Beta Analytic Inc., qui avait déjà obtenu des résultats sur des coprolithes (Poinar *et al.*, 2003, Gilbert *et al.* 2008c).

2.3.1. Matériel et Méthodes

Les deux échantillons sélectionnés ont été datés par Beta Analytic Inc (Miami, USA). Avant toute analyse, ces échantillons ont subi un pré-traitement qui consiste en un lavement acide. Les échantillons sont réduits en poudre, puis d'acide chlorhydrique concentré est appliqué afin de supprimer les carbonates et ne garder que le carbone organique.

Le carbone présent dans le matériel a été réduit en graphite (qui contient 100% de carbone). Son contenu en ^{14}C a été ensuite mesuré par AMS (Accelerator-Mass-Spectrometer). Une date « radiocarbone mesurée » en a été déduite.

Une correction prenant en compte le ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ a été appliquée à cette date et a permis d'obtenir une date radiocarbone « conventionnelle ». Comme les échantillons sont âgés de moins de 19 000 ans, il était possible d'en déduire une date calibrée, prenant en compte l'évolution du taux de ^{14}C au cours du temps. Cette date est donnée en années avant J.C. et non en Before Present (avant 1950).

2.3.2. Résultats et discussion

Un des échantillons (CC8) était trop petit pour permettre une mesure indépendante du ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Cette valeur a été calculée sur une aliquote de graphite, mais qui peut être contaminée par des réactifs de laboratoire. Cela permet toutefois d'obtenir une date radiocarbone conventionnelle.

Les dates obtenues sont présentées ci-dessous (Tableau 4).

	Échantillon	Date radiocarbone conventionnelle (BP)	Date radiocarbone calibrée (av. JC)	Date radiocarbone mesurée (BP)	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$
CC8	Beta-281961	9 170 ± 50	8 540 - 8 280	NF	NF
CC9	Beta-281962	13 060 ± 90	13 730 - 13 240	13 120 ± 90	-28,4‰

Tableau 4: Datations obtenues pour deux coprolithes de la Grotte de Coumère. Les dates calibrées sont données à deux sigmas près, soit une probabilité de 95%. NF : non-fournie.

Les deux dates sont peu crédibles. En effet, les données paléontologiques montrent que l'hyène a disparu d'Europe avant la fin du Pléistocène, il y a 11 000 ans BP. La date obtenue pour CC8 n'est donc pas pertinente et celle obtenue pour CC9 est à la limite de la période de fréquentation de l'Europe par cette espèce. De plus, les dates sont très différentes, alors que les arguments paléontologiques et génétiques laissent penser que ces deux coprolithes sont contemporains.

Une autre équipe a également fait dater des coprolithes d'hyène des cavernes, mais le résultat obtenu leur a également semblé trop récent au regard des analyses palynologiques (Carrión *et al.*, 2001). Il semblerait donc que les coprolithes soient des échantillons difficiles à dater par la méthode du radiocarbone.

Nous avons envisagé deux facteurs pouvant rajeunir artificiellement les dates. L'erreur pourrait être corrélée à une élimination incomplète des carbonates lors de la préparation des échantillons. La présence de carbone inorganique, accumulé lors de la fossilisation, pourrait fausser les résultats. Une seconde explication pourrait être liée à la nature même du coprolithe. En effet, ce type d'échantillon est complexe et contient, outre la matière organique appartenant à l'animal producteur, des bactéries de son tube digestif et des micro-organismes du sol, qui l'ont colonisé *a posteriori*. Il est possible que ces micro-organismes, accumulés depuis le dépôt du coprolithe, aient diminué son âge.

2.4. *Analyse palynologique*

Les coprolithes attribués à l'hyène des cavernes sont fréquemment utilisés pour des analyses palynologiques. En effet, l'expérience montre que les excréments d'hyène sont durs et solides, et qu'ils peuvent se conserver dans du sédiment (Larkin *et al.*, 2000). L'exine est bien conservée sur les pollens et n'est pas endommagée par les sucs gastriques du carnivore (Scott *et al.*, 2003).

Des fractions des coprolithes CC8 et CC9 ont été confiées à Michel Girard (Laboratoire de Palynologie, Sophia Antipolis) pour analyse palynologique (Tableau 5).

CC8 ne contenait que 14 grains de pollens. Ce nombre étant insuffisant pour réaliser un inventaire des espèces végétales, l'analyse n'a pas été poursuivie pour cet échantillon. CC9 en revanche contient un grand nombre de grains pollens. Une telle hétérogénéité entre deux échantillons n'est pas surprenante (Carrión *et al.*, 2001; Yll *et al.*, 2006; Carrión *et al.*, 2007). En effet, la quantité de pollens dépend de l'alimentation de l'animal : si le carnivore a dévoré le tube digestif rempli de végétaux d'un herbivore, ou s'il s'est désaltéré dans une mare riche en pollens, son bol alimentaire est plus riche en pollen. La quantité de pollens et le cortège pollinique dépendent également de la saison, toutes les plantes ne fleurissant pas en même temps.

Les pollens présents dans CC9 décrivent un environnement ouvert, riche en graminées. Les pollens d'arbres sont plutôt ceux d'arbres adaptés à des climats froids. Des plantes spécifiques des bords de rivières ou d'étangs, comme l'aulne, les cypéracées, le sparganium et les renonculacées, sont également présentes. Il s'agit donc d'une steppe à poacées, comprenant des points d'eaux.

<i>Echantillons</i>	CC8		CC9	
	Nombre de grains de pollens	Pourcentage	Nombre de grains de pollens	Pourcentage
CONIFEROPHYTA				
<i>Pinus</i>	1	NP	20	6,54
<i>Juniperus</i>			4	1,31
MAGNOLIOPHYTA				
POACEAE	9	NP	184	60,13
CICHORIEAE	2	NP	12	3,92
ASTERACEAE				
<i>Anthemis</i>			5	1,63
<i>Aster</i>				
<i>Cynareae</i>	1	NP	2	0,65
<i>Artemisia</i>				
<i>Centaurea scabiosa</i>			2	0,65
<i>Xanthium</i>			1	0,33
BETULACEAE				
<i>Alnus</i>			5	1,63
CHENOPODIACEAE			2	0,65
CARYOPHYLLACEAE	1	NP	1	0,33
CAMPANULACEAE				
CRUCIFERAE			1	0,33
CYPERACEAE			15	4,90
LEGUMINOSAE			2	0,65
LILIACEAE			2	0,65
<i>Allium</i>			2	0,65
PLANTAGINACEAE				
<i>Plantago</i>			6	1,96
POLYGONACEAE				
<i>Polygonum</i>			1	0,33
<i>Rumex</i>			1	0,33
RANUNCULACEAE			3	0,98
<i>Aconitum</i>			5	1,63
<i>Anemone</i>			1	0,33
ROSACEAE			1	0,33
RUBIACEAE			5	1,63
SAXIFRAGACEAE				
<i>Saxifraga</i>			2	0,65
SALICACEAE				
<i>Salix</i>			1	0,33
SCROPHULARIACEAE			1	0,33
UMBELLIFERAE			9	2,94
URTICACEAE			2	0,65
SPARGANIACEAE				
<i>Sparganium</i>			1	0,33
indéterminés			7	2,29
TOTAL	14	NP	306	100,00
Filicales à spores monolètes			1	0,33
Mousses			11	3,59
Spores de champignons coprophiles	6700		21600	

Tableau 5 : Analyse palynologique des deux coprolithes CC8 et CC9. NP signifie Non Pertinent.

3. CONCLUSION

Ces analyses ont montré que les coprolithes d'hyènes des cavernes sont des sources riches en ADN ancien. De plus, l'extraction de ce matériel génétique ne nécessite pas l'utilisation d'un protocole particulier, différent de celui choisi pour les échantillons osseux.

L'analyse métagénomique, sans sélection *a priori* des fragments séquencés, montre qu'une très grande partie (plus de 40%) de l'ADN contenu dans les échantillons appartient à l'hyène des cavernes. Cette richesse en ADN et le mode de séquençage choisi permettent d'obtenir un génome mitochondrial complet, ainsi que des informations concernant le génome nucléaire.

De plus, nous avons pu mettre en évidence la proie des animaux étudiés : le cerf élaphe. Ce type d'échantillon fournit donc des informations concernant également l'environnement et les habitudes alimentaires de l'individu étudié.

Nous observons une forte homogénéité génétique entre les deux coprolithes étudiés, qui fournissent le même haplotype mitochondrial d'hyène des cavernes et mettent en évidence la même proie. L'analyse d'autres échantillons provenant d'autres sites, ainsi que d'échantillons produits par des espèces différentes permettra une analyse plus globale des habitudes alimentaires des Carnivores du Pléistocène.

Partie 4 : Conclusion générale

Les travaux effectués au cours de cette thèse montrent que la paléogénétique permet d'aborder de nombreuses problématiques touchant l'évolution et l'éthologie des espèces éteintes du Pléistocène. Grâce aux données acquises par le séquençage de l'ADN ancien, nous pouvons ébaucher la caractérisation moléculaire d'un paléoenvironnement.

Dans un premier temps, nous avons séquençé le génome mitochondrial complet de l'ours des cavernes, à partir d'un échantillon de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc. La taille de cette séquence la rend très informative et nous avons donc pu conduire une analyse phylogénétique afin de déduire la position de cette espèce éteinte par rapport aux autres Ursidés. Nous avons montré que l'ours des cavernes est une espèce proche de l'ours polaire et de l'ours brun, mais qu'il se situe en dehors de la diversité génétique des ours bruns.

Nous nous sommes ensuite tournés vers l'étude des populations d'ours des cavernes des Gorges de l'Ardèche. Grâce à des datations radiocarbone, nous avons montré que les ours des cavernes étaient présents dans les Gorges de l'Ardèche entre 37 000 ans BP et 27 000 ans BP. Ces dates montrent que les spécimens étudiés sont tardifs et qu'ils sont contemporains des occupations humaines de la région. Sur le plan génétique, ces ours ne présentent que deux haplotypes mitochondriaux, un spécifique à la Grotte Chauvet-Pont d'Arc, l'autre retrouvé fréquemment en Europe occidentale. Les ours des Gorges de l'Ardèche présentent une forte homogénéité génétique, qui peut être mise en relation avec l'extinction imminente de l'espèce.

Nous nous sommes enfin tournés vers les coprolithes de carnivores, comme l'hyène des cavernes. Nous avons mis au point une méthode d'extraction de l'ADN de ces échantillons qui sont rarement utilisés en ADN ancien, bien qu'ils se soient révélés contenir une grande quantité d'ADN appartenant à l'espèce productrice. L'analyse génétique à haut débit de ces extraits a permis d'obtenir le premier génome mitochondrial complet de l'hyène des cavernes, ainsi que des fragments appartenant à son génome nucléaire. Malheureusement, le manque de données génétiques concernant le génome nucléaire d'une espèce proche de l'hyène des cavernes restreint les analyses pouvant être entreprises sur cette espèce.

Nous nous avons également montré que les deux coprolithes d'hyènes étudiés correspondaient à un repas à base de cerf élaphe. Nous avons pu reconstituer de larges portions du génome mitochondrial de cette espèce, dont les spécimens du Pléistocène ont très peu été étudiés jusqu'à présent.

Nos résultats indiquent que les coprolithes de carnivores se révèlent des sources riches d'ADN ancien, appartenant à la fois à l'espèce qui les a produits et à ses proies. L'utilisation des nouvelles technologies de séquençage appliquées à ce type particulier d'échantillon permet d'étudier plusieurs espèces de Mammifères à la fois et de reconstituer leurs interactions. L'obtention d'une large quantité d'information génétique, concernant le génome mitochondrial comme le génome nucléaire, était auparavant l'étape la plus difficile en paléogénétique. Elle est désormais facilitée par l'utilisation des nouvelles technologies de séquençage. Les progrès dans la connaissance des espèces éteintes ne dépend donc plus des difficultés à amplifier l'ADN ancien, mais de la disponibilité d'échantillons fossiles de qualité, des difficultés inhérentes à la manipulation de jeux de données complexes et du manque d'informations génétiques sur les espèces modernes auxquelles les comparer.

Seules quelques espèces sont largement représentées dans les grottes. Ces espèces sont principalement des grands mammifères, souvent des carnivores, parfois leurs proies. Les autres animaux, petits mammifères, oiseaux, poissons, reptiles, sont beaucoup moins fréquents. De plus, leurs restes sont de petite taille ce qui est un handicap à l'extraction d'ADN ancien. L'analyse métagénomique des coprolithes permettra d'obtenir des informations génétiques sur ces animaux, à condition qu'ils aient servi de proie à des carnivores dont les fèces sont retrouvés fossilisés.

Par ailleurs, la quantité d'information fournie par les séquenceurs actuels rend impossible l'analyse manuelle des séquences. L'utilisation de l'informatique est donc maintenant nécessaire pour extraire et analyser les données de la banque de séquences. L'usage d'outils mathématiques puissants permet également d'extraire de nouvelles informations des génomes anciens, comme la trace de sélections positives ou de croisements interspécifiques. L'augmentation exponentielle de la quantité d'information délivrée par les séquenceurs de nouvelle génération oblige la bio-informatique à suivre une croissance similaire et les paléogénéticiens à s'ouvrir à cette science.

Enfin, l'analyse génomique d'échantillons anciens est dépendante de l'existence de génomes de référence appartenant à des espèces proches. En effet, le séquençage d'ADN ancien s'apparente à un séquençage de type *shotgun*, fournissant des séquences sont de très petite taille. À l'exception des régions très couvertes par le séquençage comme le génome mitochondrial ou des gènes nucléaires multi-copies, il n'est pas possible de reconstituer le

génomique par assemblage *de novo*. Il faut donc aligner les lectures sur un génome de référence. Or, seulement 65 génomes de Mammifères sont aujourd'hui complets ou en cours d'assemblage dans la banque de données GenBank. De plus, certains taxons, comme les Primates, sont mieux couverts que d'autres. Chez les Carnivores, seuls cinq génomes complets existent, représentant trois espèces (*Canis lupus familiaris*, *Felis catus*, *Ailuropoda melanoleuca*).

Un séquençage plus intensif des génomes, sur une grande variété d'espèces, permettra de comparer les séquences acquises sur des échantillons anciens à des espèces plus proches. La quantité d'information recueillie de cette manière et la précision des analyses effectuées seraient ainsi améliorées. Des projets comme le projet Genome 10K qui prévoit le séquençage de 10 000 génomes de Vertébrés (Check Hayden, 2009), auront donc des influences sur les avancées de la paléogénétique.

Les progrès des technologies de séquençage augmentent considérablement la puissance d'analyse de la paléogénétique.

On peut espérer que la paléogénomique soit, dans les années à venir, associé de plus en plus étroitement à l'étude génétique des sites archéologiques. A l'image des datations radiocarbone, dont, depuis la mise au point en 1947, les analyses sont devenues inhérentes à la caractérisation des sites archéologiques, il est souhaitable que la paléogénétique devienne un partenaire régulier des équipes de recherche. Grâce à Jean Clottes, la Grotte Chauvet-Pont d'Arc est le premier site d'importance majeure dans laquelle la génétique ait été intégrée dans l'équipe scientifique dès les premiers temps. Nous avons ainsi pu contribuer à l'estimation de la période à laquelle les dessins d'ours des cavernes de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc ont été tracés.

Il est souhaitable que la paléogénétique intervienne de plus en plus précocement et en association étroite avec les autres équipes de recherches, dans l'étude des sites archéologiques. Des échanges fructueux entre disciplines, naîtra une approche plus complète des sites.

Bibliographie

Abu Al-Soud, W. & Radstrom, P. (2000) Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J Clin Microbiol* 38(12):4463-4470.

Adler, C. J., Haak, W., Donlon, D. & Cooper, A. (2011) Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *J of Archaeol Sci* 38:956-964.

Allen, M., Engström, A.S., Meyers, S., Handt, O., Saldeen, T., von Haeseler, A., Pääbo, S., Gyllensten, U. (1998) Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. *J Forensic Sci* 43(3):453-464.

Allentoft, M., Schuster, S.C., Holdaway, R., Hale, M.L., McLay, E., Oskam, C., Gilbert, M.T.P., Spencer, P., Willerslev, E., Bunce, M. (2009) Identification of microsatellites from an extinct moa species using high-throughput (454) sequence data. *Biotechniques* 46(3):195-200.

Allentoft, M. E., Oskam, C., Houston, J., Hale, M.L., Gilbert, M.T.P., Rasmusse, M., Spencer, P., Jacomb, C., Willerslev, E., Holdaway, R.N., Bunce, M. (2011) Profiling the Dead: Generating Microsatellite Data from Fossil Bones of Extinct Megafauna-Protocols, Problems, and Prospects. *Plos One* 6(1).

Amory, S., Keyser, C., Crubezy, E. & Ludes, B. (2007) STR typing of ancient DNA extracted from hair shafts of Siberian mummies. *Forensic Sci Intern* 166(2-3):218-229.

Argant, A. (2001) Los antepasados del oso de las cavernas. *Cadernos do Laboratorio Xeolóxico de Laxe* 26:9.

Argant, A. (2004) Les Carnivores du gisement Pliocène final de Saint-Vallier (Drôme, France). *Geobios* 37(1):S133-S182.

Argant, A. (2009) Biochronologie et grands mammifères au Pléistocène moyen et supérieur en Europe occidentale : l'apport des Canidés, des Ursidés et des Carnivores en général. *Quaternaire* 20(4):467-480.

Argant, A. & Crégut-Bonnoure, E. (1996) Famille des Ursidae. Les grands mammifères plio-pléistocène d'Europe, (Masson, Paris), 167-179.

Austin, J. J., Ross, A. J., Smith, A. B., Fortey, R. A. & Thomas, R. H. (1997) Problems of reproducibility-does geologically ancient DNA survive in amber-preserved insects? *Proc Biol Sci* 264(1381):467-474.

Baar, C., d'Abbadie, M., Vaisman, A., Arana, M.E., Hofreiter, M., Woodgate, R., Kunkel, T.A., Holliger, P. (2011) Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors. *Nucleic Acids Res* 39(8):e51.

Baffier, D. (2005) La Grotte Chauvet : conservation d'un patrimoine. *Bulletin de la société préhistorique française* 102(1):11-16.

Ballesio, R., Barth, P., Gely, B., Philippe, M. & Rosa, M. (2003) Contribution à l'étude des ursidés pléistocènes des Gorges de l'Ardèche et de leurs plateaux : Les restes d'*Ursus Deningeri* de la Grotte des Fées, à Vallon-Pont-d'Arc (Ardèche). *Cahiers scientifiques - Muséum d'histoire naturelle de Lyon* 2:5-51.

Barnes, I., Matheus, P., Shapiro, B., Jensen, D. & Cooper, A. (2002) Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian brown bears. *Science* 295(5563):2267-2270.

Barnes, I., Shapiro, B., Lister, A., Kuznetsova, T., Sher, A., Guthrie, D., Thomas, M.G. (2007) Genetic structure and extinction of the woolly mammoth, *Mammuthus primigenius*. *Curr Biol* 17(12):1072-1075.

Barnett, R., Shapiro, B., Barnes, I., Ho, S.Y., Burger, J., Yamagichi, N., Higham, T.F., Wheeler, H.T., Rosendahl, W., Sher, A.V., Sotnikova, M., Kuznetsova, T., Baryshnikov, G.F., Martin, L.D., Harington, C.R., Burns, J.A., Cooper, A. (2009) Phylogeography of lions (*Panthera leo* ssp.) reveals three distinct taxa and a late Pleistocene reduction in genetic diversity. *Mol Ecol* 18(8):1668-1677.

Barriel, V., Thuët, E. & Tassy, P. (1999) Molecular phylogeny of Elephantidae. Extreme divergence of the extant forest African elephant. *Comptes Rendus De L'Académie des Sciences Série Iii-Sciences de la vie-Life Sciences* 322(6):447-454.

Baryshnikov, G. (1998) Cave bears from the Paleolithic of the Greater Caucasus. *Quaternary Paleozoology in the Northern Hemisphere*, in J. J. Saunders, B. W. Styles & G. Baryshnikov (Illinois State Museum, Springfield, Illinois), 69-118.

Baryshnikov, G. (1999) Chronological and geographical variability of *Crocota spelaea* (Carnivora, Hyaenidae) from the Pleistocene of Russia. *Mammoths and the mammoth fauna: Studies of an extinct ecosystem*, G. Haynes, J. Klimovicz & J. W. F. Reumers (Natural History Museum, Rotterdam).

Basler, C. F., Reid, A.H., Dybing, J.K., Janczewski, T.A., Fanning, T.G., Zheng, H., Salvatore, M., Perdue, M.L., Swayne, D.E., Garcia-Sastre, A., Palese, P., Taubenberger, J.K. (2001) Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5):2746-2751.

Beja-Pereira, A., Caramelli, D., Lalueza-Fox, C., Vernesi, C., Ferrand, N., Casoli, A., Goyache, F., Royo L.J., Conti, S., Lari, M., Martini, A., Ouragh, L., Magid, A., Atash, A., Zsolnai, A., Boscato, P., Triantaphylidis, C., Ploumi, K., Sineo, L., Mallegni, F., Taberlet, P., Erhardt, G., Sampietro, L., Bertanpetit, J., Barbujani, G., Luikart, G., Bertorelle, G. (2006) The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(21):8113-8118.

Bengtsson, C. F. *et al.* (2011) DNA from keratinous tissue. Part I: Hair and nail. *Ann Anat* doi:10.1016/j.aanat.2011.03.013.

Bentley, D. R., Olsen, M.E., Brandt, L.O., Bertelsen, M.F., Willerslev, E., Tobin, D.J., Wilson, A.S., Gilbert, M.T.P.(2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456(7218):53-59.

Binladen, J. Wiuf, C., Gilbert M.T.P., Bunce, M., Barnett, R., Larson, G., Greenwood, A.D., Haile, J., Ho, S.Y., Hansen, A.J., Willerslev, E. (2006) Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes. *Genetics* 172(2):733-741.

Blow, M. J. Zhang, T., Woyke, T, Speller, C.F., Krivoschapkin, A., Yang, D.Y., Derevianko, A., Rubin, E.M. (2008) Identification of ancient remains through genomic sequencing. *Genome Res* 18(8):1347-1353.

Bocherens, H., Billiou, D., Patou-Mathis, M., Bonjean, D., Otte, M., Mariotti, A. (1997) Paleobiological implication of the isotopic signature (^{13}C , ^{15}N) of fossil mammal collagen in Scladina Cave (Sclayn, Belgium). *Quat Research* 48(3):370-380.

Bocherens, H., Brinkman, D. B., Dauphin, Y. & Mariotti, A. (1994a) Microstructural and Geochemical Investigations on Late Cretaceous Archosaur Teeth from Alberta, Canada. *Canadian Journal of Earth Sciences* 31(5):783-792.

Bocherens, H., Drucker, D. G., Billiou, D., Geneste, J. M. & van der Plicht, J. (2006) Bears and humans in Chauvet Cave (Vallon-Pont-d'Arc, Ardeche, France): insights from stable isotopes and radiocarbon dating of bone collagen. *J Hum Evol* 50(3):370-376.

Bocherens, H., Drucker, D. G., Billiou, D., Patou-Mathis, M. & Vandermeersch, B. (2005) Isotopic evidence for diet and subsistence pattern of the Saint-Cesaire I Neanderthal: review and use of a multi-source mixing model. *J Hum Evol* 49(1):71-87.

Bocherens, H., Fizet, M. & Mariotti, A. (1994b) Diet, Physiology and Ecology of Fossil Mammals as Inferred from Stable Carbon and Nitrogen Isotope Biogeochemistry - Implications for Pleistocene Bears. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 107(3-4):213-225.

Bogdanowicz, W., Allen, M., Branicki, W., Lembring, M., Gajewska, M., Kupiec, T. (2009) Genetic identification of putative remains of the famous astronomer Nicolaus Copernicus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(30):12279-12282.

Bollongino, R., Elsner, J., Vigne, J. D. & Burger, J. (2008) Y-SNPs Do Not Indicate Hybridisation between European Aurochs and Domestic Cattle. *PLoS ONE* 3(10):e3418.

Bon, C. Berthouaud, V., Fosse, P., Gély, B., Maksud, F., Vitalis, R., Philippe, M., van der Plicht, J., and Elalouf, J.-M. (2011) Low regional diversity of late cave bears mitochondrial DNA at the time of Chauvet Aurignacian paintings. *J of Archaeol Sci* 38(8):1886-1895.

Bon, C., Caudy, N., de Dieuleveult, M., Fosse, P., Philippe, M., Maksud, F., Beraud-Colomb, E., Bouzaid, E., Kefi, R., Laugier, C., Rousseau, B., Casane, D., van der Plicht, J., Elalouf, J.-M. (2008) Deciphering the complete mitochondrial genome and phylogeny of the extinct cave bear in the Paleolithic painted cave of Chauvet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(45):17447-17452.

Bourdillat, V. (2008) Hommes, carnivores ? : caractériser l'action de l'hyène des cavernes : de l'utilisation des données fossiles pour l'interprétation des sites mixtes. Thèse de doctorat (Muséum national d'histoire naturelle, Paris)

Bower, M. A., Spencer, M., Matsumura, S., Nisbet, R. E. R. & Howe, C. J. (2005) How many clones need to be sequenced from a single forensic or ancient DNA sample in order to determine a reliable consensus sequence? *Nucleic Acids Res* 33(8):2549-2556.

Briggs, A. W., Good, J.-M., Green, R.-E., Krause, J., Maricic, T., Stenzel, U., Lalueza-Fox, C., Rudan, P., Brajkovic, D., Kucan, Z., Gusic, I., Schmitz, R., Doronichev, V.B., Golovanova, L.V., de la Rasilla, M., Fortea, J., Rosas, A., Pääbo, S. (2009) Targeted Retrieval and Analysis of Five Neandertal mtDNA Genomes. *Science* 325(5938):318-321.

Briggs, A. W., Stenzel, U., Johnson, P.L., Green, R.E., Kelso, J., Prüfer, K., Meyer, M., Krause, J., Ronan, M.T., Lachmann, M., Pääbo, S. (2007) Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(37):14616-14621.

Brotherton, P., Endicott, P., Sanchez, J.J., Beaumont, M., Barnett, R., Austin, J., Cooper, A. (2007) Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C > U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions. *Nucleic Acids Res* 35(17):5717-5728.

Burger, J., Rosendahl, W., Loreille, O., Hemmer, H., Eriksson, T., Götherström, A., Hiller, J., Collins, M.J., Wess, T., Alt, K.W. (2004) Molecular phylogeny of the extinct cave lion *Panthera leo spelaea*. *Mol Phylogenet Evol* 30(3):841-849.

Campos, P. F., Kristensen, T., Orlando, L., Sher, A., Kholodova, M.V., Götherström, A., Hofreiter, M., Drucker, D.G., Kosintsev, P., Tikhonov, A., Baryshnikov, G.F., Willerslev, E., Gilbert, M.T.P. (2010a) Ancient DNA sequences point to a large loss of mitochondrial genetic diversity in the saiga antelope (*Saiga tatarica*) since the Pleistocene. *Mol Ecol* 19(22):4863-4875.

Campos, P. F., Willerslev, E., Sher, A., Orlando, L., Axelsson, E., Tikhonov, A., Aaris-Sørensen, K., Greenwood, A.D., Kahlke, R.D., Kosintsev, P., Krakhmalnaya, T., Kuznetsova, T., Lemey, P., MacPhee, R., Norris, C.A., Shepherd, K., Suchard, M.A., Zazula, G.D., Shapiro, B., Gilbert, M.T. (2010b) Ancient DNA analyses exclude humans as the driving force behind late Pleistocene musk ox (*Ovibos moschatus*) population dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(12):5675-5680.

Cano, R. J., Borucki, M.K., Higby-Schweitzer, M., Poinar, H.N., Poinar, G.O. Jr, Pollard, K.J.. (1994) *Bacillus* DNA in fossil bees: an ancient symbiosis? *Appl Environ Microbiol* 60(6):2164-2167.

Cano, R. J., Poinar, H. N., Pieniazek, N. J., Acra, A. & Poinar, G. O., Jr. (1993) Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature* 363(6429):536-538.

Caramelli, D., Lalueza-Fox, C., Capelli, C., Lari, M., Sampietro, M.L., Gigli, E., Milani, L., Pilli, E., Guimaraes, S., Chiarelli, B., Marin, V.T., Casoli, A., Stanyon, R., Bertranpetit, J., Barbujani, G. (2007) Genetic analysis of the skeletal remains attributed to Francesco Petrarca. *Forensic Sci Int* 173(1):36-40.

Caramelli, D., Lalueza-Fox, C., Vernesi, C., Lari, M., Casoli, A., Mallegni, F., Chiarelli, B., Dupanloup, I., Bertranpetit, J., Barbujani, G., Bertorelle, G. (2003) Evidence for a genetic discontinuity between Neandertals and 24,000-year-old anatomically modern Europeans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11):6593-6597.

Carrión, J. S., Riquelme, J. A., Navarro, C. & Munuera, M. (2001) Pollen in hyaena coprolites reflects late glacial landscape in southern Spain. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 176(1-4):193-205.

Carrión, J. S., Scott, L., Arribas, A., Fuentes, N., Gil-Romera, G., Montoya, E. (2007) Pleistocene landscapes in central Iberia inferred from pollen analysis of hyena coprolites. *J Quat Sci* 22(2):191-202.

Chapco, W. & Litzenberger, G. (2004) A DNA investigation into the mysterious disappearance of the Rocky Mountain grasshopper, mega-pest of the 1800s. *Mol Phylogenet Evol* 30(3):810-814.

- Check Hayden, E. (2009) 10,000 genomes to come. *Nature* 462(7269):21.
- Clottes, J. (2001) *La grotte Chauvet : l'art des origines* (Seuil, Paris).
- Clottes, J. & Lewis-Williams, J. D. (1996) *Les chamanes de la préhistoire : transe et magie dans les grottes ornées* (Seuil, Paris).
- Collins, M. J., Nielsen-Marsh, M., Hiller, J., Smith, C.I., Roberts, J.P., Progodich, R.V., Wess, T.J., Csapo, J., Millard, A.R., Turner-Walker, G. (2002) The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry* 44(3):383-394.
- Cooper, A. (1992) Removal of colourings, inhibitors of PCR, and the carrier effect of PCR contamination from ancient DNA samples. *Ancient DNA Newsletter* 1:31-33.
- Cooper, A., Lalueza-Fox, C., Anderson, S., Rambaut, A., Austin, J., Ward, R. (2001) Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. *Nature* 409(6821):704-707.
- Cooper, A., Mourer-Chauviré, C., Chambers, G.K., von Haeseler, A., Wilson, A.C., Pääbo, S. (1992) Independent Origins of New-Zealand Moas and Kiwis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(18):8741-8744.
- Crégut-Bonnure, E. (1996) A review of small Middle Pleistocene bears from France. *Acta Zoologica Cracoviensia* 39(1):89-101.
- Cuzange, M. T., Delqué-Količ, E., Goslar, T., Meiert Grootes, P., Higham, T., Kaltnecker, E., Nadeau, M.-J., Oberlin, C., Paterne, M., van der Plicht, J., Bronk Ramsey, C., Valladas, H., Clottes, J., Geneste, J.-M. (2007) Radiocarbon intercomparison program for Chauvet Cave. *Radiocarbon* 49(2):339-347.
- d'Abbadie, M., Hofreiter, M., Vaisman, A., Loakes, D., Gasparutto, D., Cadet, J., Woodgate, R., Pääbo, S., Holliger, P. (2007) Molecular breeding of polymerases for amplification of ancient DNA. *Nat Biotechnol* 25(8):939-943.
- D'Errico, F., Vanhaeren, M., Sanchez Goni, M.-F. (2001) Les possibles relations entre l'art des cavernes et la variabilité climatique rapide de la dernière période glaciaire. *Datation - XXIe Rencontres Internationales d'Archéologie et d'Histoire d'Antibes*, J. N. Barrandon, P. Guibert & V. Michel (APDCA).
- De Benedetto, G., Nasidze, I.S., Stenico, M., Nigro, L., Krings, M., Lanzinger, M., Vigilant, L., Stoneking, M., Pääbo, S., Barbujani, G. (2000) Mitochondrial DNA sequences in prehistoric human remains from the Alps. *Eur J Hum Genet* 8(9):669-677.
- Debruyne, R., Barriel, V. & Tassy, P. (2003) Mitochondrial cytochrome b of the Lyakhov mammoth (Proboscidea, Mammalia): new data and phylogenetic analyses of Elephantidae. *Mol Phylogenet Evol* 26(3):421-434.

Debruyne, R. Chu, G., King, C.E., Bos, K., Kuch, M., Schwarz, C., Szpak, P., Gröcke, D.R., Matheus, P., Zazula, G., Guthrie, D., Froese, D., Buigues, B., de Marliave, C., Flemming, C., Poinar, D., Fisher, D., Southon, J., Tikhonov, A.N., MacPhee, R.D., Poinar, H.N. (2008) Out of America: ancient DNA evidence for a new world origin of late quaternary woolly mammoths. *Curr Biol* 18(17):1320-1326.

Deguiloux, M. F., Ricaud, S., Leahy, R. & Pemonge, M. H. (2011) Analysis of ancient human DNA and primer contamination: one step backward one step forward. *Forensic Sci Int*.

Delisle, I. & Strobeck, C. (2002) Conserved primers for rapid sequencing of the complete mitochondrial genome from carnivores, applied to three species of bears. *Mol Biol Evol* 19(3):357-361.

Delpozzo, G. & Guardiola, J. (1989) Mummy DNA Fragment Identified. *Nature* 339(6224):431-432.

DeSalle, R., Gatesy, J., Wheeler, W. & Grimaldi, D. (1992) DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science* 257(5078):1933-1936.

Edwards, C. J., Magee, D.A., Park, S.D., McGettigan, P.A., Lohan, A.J., Murphy, A., Finlay, E.K., Shapiro, B., Chamberlain, A.T., Richards, M.B., Bradley, D.G., Loftus, B.J., MacHugh, D.E. (2010) A complete mitochondrial genome sequence from a mesolithic wild aurochs (*Bos primigenius*). *PLoS One* 5(2):e9255.

Ermini, L., Olivieri, C., Rizzi, E., Corti, G., Bonnal, R., Soares, P., Luciani, S., Marota, I., De Bellis, G., Richards, M.B., Rollo, F. (2008) Complete mitochondrial genome sequence of the Tyrolean Iceman. *Curr Biol* 18(21):1687-1693.

Eshleman, J. & Smith, D. G. (2001) Use of DNase to eliminate contamination in ancient DNA analysis. *Electrophoresis* 22(20):4316-4319.

Fernandez-Mosquera, D. (1998) Isotopic biogeochemistry ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) of cave bear, *Ursus spelaeus*, from Cova Eiros site, Lugo. *Cadernos do Laboratorio Xeolóxico de Laxe* 23(237-249):237.

Fernandez-Mosquera, D., Vila-Taboada, M. & Grandal-D'Anglade, A. (2001) Stable isotopes data ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) from the cave bear (*Ursus spelaeus*): a new approach to its palaeoenvironment and dormancy. *Proc R Soc Lond B* 268(1472):1159-1164.

Feruglio, V. & Baffier, D. (2005) Les dessins noirs des Salles Hillaires et du Crâne, grotte Chauvet-Pont d'Arc : chronologie relative. *Bulletin de la société préhistorique française* 102(1):149-158.

Fosse, P. (1997) Variabilité des assemblages osseux créés par l'hyène des cavernes. *Paléo* 9:15-54.

Fosse, P. & Philippe, M. (2005) La faune de la grotte Chauvet : paléobiologie et anthropozoologie. *Bulletin de la société préhistorique française* 102(1):82-102.

Gamba, C., Fernandez, E., Tirado, M., Pastor, F. & Arroyo-Pardo, E. Brief communication: Ancient nuclear DNA and kinship analysis: The case of a medieval burial in San Esteban Church in Cuellar (Segovia, Central Spain). *Am J Phys Anthropol* 144(3):485-491.

Garcia, M. A. (2005) Ichnologie générale de la grotte Chauvet. *Bulletin de la société préhistorique française* 102(1):103-108.

Garcia, N. & Arsuaga, J. L. (2001a) Les carnivores (Mammalia) des sites du Pléistocène ancien et moyen d'Atapuerca (Espagne). *L'Anthropologie* 105:83-93.

Garcia, N. & Arsuaga, J. L. (2001b) *Ursus dolinensis*: a new species of early pleistocene ursid from Trinchera Dolina, Atapuerca (Spain). *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Ii Fascicule a-Sciences De La Terre Et Des Planetes* 332(11):717-725.

Gayraud-Valy, Y. & Thomas, H. (2000) *Les Fossiles : Empreinte des mondes disparus* (Découverte Gallimard).

Gély, B. & Porte, J.-L. (1996) Les gravures paléolithiques de la grotte des Deux-Ouvertures à Saint-Martin-d'Ardèche. *Bulletin de la Société Préhistorique Ariège-Pyrénées* LI:81-98.

Geneste, J. M. (2005) L'archéologie des vestiges matériels dans la grotte Chauvet-Pont-d'Arc. *Bulletin de la société préhistorique française* 102(1):10.

Genty, D., Ghaleb, B., Plagnes, V., Causse, C., Valladas, H., Blamart, D., Massault, M., Geneste, J.-M., Clottes, J. *et al.* (2004) TIMS U/Th and C-14 AMS ages of the Chauvet cave stalagmites: interest for the chronology of natural and human events of the cave. *Comptes Rendus Palevol* 3(8):629-642.

Gilbert, M. T. P., Binladen, J., Miller, W., Wiuf, C., Willerslev, E., Poinar, H., Carlson, J.E., Leebens-Mack, J.H., Schuster, S.C. (2007a) Recharacterization of ancient DNA miscoding lesions: insights in the era of sequencing-by-synthesis. *Nucleic Acids Res* 35(1):1-10.

Gilbert, M. T. P., Drautz, D.I., Lesk, A.M., Ho, S.Y., Qi, J., Ratan, A., Hsu, C.H., Sher, A., Dalén, L., Götherström, A., Tomsho, L.P., Rendulic, S., Packard, M., Campos, P.F., Kuznetsova, T.V., Shidlovskiy, F., Tikhonov, A., Willerslev, E., Iacumin, P., Buigues, B., Ericson, P.G., Germonpré, M., Kosintsev, P., Nikolaev, V., Nowak-Kemp, M., Knight, J.R.,

Irzyk, G.P., Perbost, C.S., Fredrikson, K.M., Harkins, T.T., Sheridan, S., Miller, W., Schuster, S.C. (2008a) Intraspecific phylogenetic analysis of Siberian woolly mammoths using complete mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(24):8327-8332.

Gilbert, M. T. P., Hansen, A.J, Willerslev, E., Rudbeck, L., Barnes, I., Lynnerup, N., Cooper, A. (2003) Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage. *Am J Hum Genet* 72(1):48-61.

Gilbert, M. T. P., Kivisild, T., Grønnow, B., Andersen, P.K., Metspalu, E., Reidla, M., Tamm, E., Axelsson, E., Götherström, A., Campos, P.F., Rasmussen, M., Metspalu, M., Higham, T.F., Schwenninger, J.L., Nathan, R., De Hoog, C.J., Koch, A., Møller, L.N., Andreassen, C., Meldgaard, M., Villems, R., Bendixen, C., Willerslev, E. (2008b) Paleo-Eskimo mtDNA genome reveals matrilineal discontinuity in Greenland. *Science* 320(5884):1787-1789.

Gilbert, M. T. P., Jenkins, D.L., Götherstrom, A., Naveran, N., Sanchez, J.J., Hofreiter, M., Thomsen, P.F., Binladen, J., Higham, T.F., Yohe, R.M., Parr, R., Cummings, L.S., Willerslev, E. (2008c) DNA from pre-Clovis human coprolites in Oregon, North America. *Science* 320(5877):786-789.

Gilbert, M. T. P., Tomsho, L.P., Rendulic, S., Packard, M., Drautz, D.I., Sher, A., Tikhonov, A., Dalén, L., Kuznetsova, T., Kosintsev, P., Campos, P.F., Higham, T., Collins, M.J., Wilson, A.S., Shidlovskiy, F., Buigues, B., Ericson, P.G., Germonpré, M., Götherström, A., Iacumin, P., Nikolaev, V., Nowak-Kemp, M., Willerslev, E., Knight, J.R., Irzyk, G.P., Perbost, C.S., Fredrikson, K.M., Harkins, T.T., Sheridan, S., Miller, W., Schuster, S.C.. (2007b) Whole-genome shotgun sequencing of mitochondria from ancient hair shafts. *Science* 317(5846):1927-1930.

Gilbert, M. T. P., Wilson, A.S., Bunce, M., Hansen, A.J., Willerslev, E., Shapiro, B., Higham, T.F., Richards, M.P., O'Connell, T.C., Tobin, D.J., Janaway, R.C., Cooper, A. (2004) Ancient mitochondrial DNA from hair. *Curr Biol* 14(12):R463-464.

Gilbert, M. T. P., Hasekorn, T., Bunce, M., Sanchez, J.J., Lucas, S.B., Jewell, L.D., van Marck, E., Worobey, M. (2007c) The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues-Which Methods Are Useful When? *Plos One* 2(6).

Gilbert, M. T., Djurhuus, D., Melchior, L., Lynnerup, N., Worobey, M., Wilson, A.S., Andreassen, C., Dissing, J. (2007d) mtDNA from hair and nail clarifies the genetic relationship of the 15th century Qilakitsoq inuit mummies. *Am J Phys Anthropol* 133(2):847-853.

Gill, P., Ivanov, P.L., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., Evett, I., Hagelberg, E., Sullivan, K. (1994) Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet* 6(2):130-135.

Goldstein, P. Z. & Desalle, R. (2003) Calibrating phylogenetic species formation in a threatened insect using DNA from historical specimens. *Mol Ecol* 12(7):1993-1998.

Golenberg, E. M. (1991) Amplification and analysis of Miocene plant fossil DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 333(1268):419-426; discussion 426-417.

Golenberg, E. M., Giannasi, D.E., Clegg, M.T., Smiley, C.J., Durbin, M., Henderson, D., Zurawski, G. (1990) Chloroplast DNA sequence from a miocene *Magnolia* species. *Nature* 344(6267):656-658.

Gotherström, A., Collins, M. J., Angerbjörn, A. & Liden, K. (2002) Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry* 44:395-404.

Grandal-d'Anglade, A. & Vidal Romani, J.-R. (1997) A population study on the cave bear (*Ursus spealeus* Ros-Hein.) from Cova Eiros (Triacastela, Galicia, Spain). *Geobios* 30(5):723-731.

Green, R. E., Krause, J., Briggs, A.W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., Patterson, N., Li, H., Zhai, W., Fritz, M.H., Hansen, N.F., Durand, E.Y., Malaspinas, A.S., Jensen, J.D., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Prüfer, K., Meyer, M., Burbano, H.A., Good, J.M., Schultz, R., Aximu-Petri, A., Butthof, A., Höber, B., Höffner, B., Siegemund, M., Weihmann, A., Nusbaum, C., Lander, E.S., Russ, C., Novod, N., Affourtit, J., Egholm, M., Verna, C., Rudan, P., Brajkovic, D., Kucan, Z., Gusic, I., Doronichev, V.B., Golovanova, L.V., Lalueza-Fox, C., de la Rasilla, M., Fortea, J., Rosas, A., Schmitz, R.W., Johnson, P.L., Eichler, E.E., Falush, D., Birney, E., Mullikin, J.C., Slatkin, M., Nielsen, R., Kelso, J., Lachmann, M., Reich, D., Pääbo, S. (2010) A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 328(5979):710-722.

Green, R. E., Krause, J., Ptak, S.E., Briggs, A.W., Ronan, M.T., Simons, J.F., Du, L., Egholm, M., Rothberg, J.M., Paunovic, M., Pääbo, S. (2006) Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature* 444(7117):330-336.

Green, R. E., Malaspinas, A.S., Krause, J., Briggs, A.W., Johnson, P.L., Uhler, C., Meyer, M., Good, J.M., Maricic, T., Stenzel, U., Prüfer, K., Siebauer, M., Burbano, H.A., Ronan, M., Rothberg, J.M., Egholm, M., Rudan, P., Brajković, D., Kućan, Z., Gusić, I., Wikström, M., Laakkonen, L., Kelso, J., Slatkin, M., Pääbo, S.. (2008) A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing. *Cell* 134(3):416-426.

Greenwood, A. D., Capelli, C., Possnert, G. & Pääbo, S. (1999) Nuclear DNA sequences from late Pleistocene megafauna. *Mol Biol Evol* 16(11):1466-1473.

Haddrath, O. & Baker, A. J. (2001) Complete mitochondrial DNA genome sequences of extinct birds: ratite phylogenetics and the vicariance biogeography hypothesis. *Proc Biol Sci* 268(1470):939-945.

Hagelberg, E., Bell, L.S., Allen, T., Boyde, A., Jones, S.J., Clegg, J.B. (1991) Analysis of Ancient Bone DNA - Techniques and Applications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 333(1268):399-407.

Hagelberg, E., Thomas, M.G., Cook, C.E. Jr, Sher, A.V., Baryshnikov, G.F., Lister, A.M. (1994) DNA from Ancient Mammoth Bones. *Nature* 370(6488):333-334.

Handt, O., Krings, M., Ward, R. H. & Pääbo, S. (1996) The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am J Hum Genet* 59(2):368-376.

Hanni, C., Laudet, V., Stehelin, D. & Taberlet, P. (1994) Tracking the origins of the cave bear (*Ursus spelaeus*) by mitochondrial DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(25):12336-12340.

Hansen, A., Willerslev, E., Wiuf, C., Mourier, T. & Arctander, P. (2001) Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates. *Mol Biol Evol* 18(2):262-265.

Hansen, A. J., Mitchell, D.L., Wiuf, C., Paniker, L., Brand, T.B., Binladen, J., Gilichinsky, D.A., Rønn, R., Willerslev, E. (2006) Crosslinks rather than strand breaks determine access to ancient DNA sequences from frozen sediments. *Genetics* 173(2):1175-1179.

Hardy, C., Callou, C., Vigne, J.D., Casane, D., Dennebouy, N., Mounolou, J.C., Monnerot, M. (1995) Rabbit mitochondrial DNA diversity from prehistoric to modern times. *J Mol Evol* 40(3):227-237.

Harper, G. L., Maclean, N. & Goulson, D. (2006) Analysis of museum specimens suggests extreme genetic drift in the adonis blue butterfly (*Polyommatus bellargus*). *Biological Journal of the Linnean Society* 88(3):447-452.

Hartley, C. J., Newcomb, R.D., Russell, R.J., Yong, C.G., Stevens, J.R., Yeates, D.K., La Salle, J., Oakeshott, J.G. (2006) Amplification of DNA from preserved specimens shows blowflies were preadapted for the rapid evolution of insecticide resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(23):8757-8762.

Hauf, J., Baur, A., Chalwatzis, N., Zimmermann, F.K., Joger, U, Lazarev, P.A. (1995) Selective Amplification of a Mammoth Mitochondrial Cytochrome-B Fragment Using an Elephant-Specific Primer. *Curr Geneti* 27(5):486-487.

Heyn, P., Stenzel, U., Briggs, A.W., Kircher, M., Hofreiter, M., Meyer, M (2010) Road blocks on paleogenomes--polymerase extension profiling reveals the frequency of blocking lesions in ancient DNA. *Nucleic Acids Res* 38(16):e161.

Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O. A. & Wilson, A. C. (1984) DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312(5991):282-284.

Higuchi, R., von Beroldingen, C. H., Sensabaugh, G. F. & Erlich, H. A. (1988) DNA typing from single hairs. *Nature* 332(6164):543-546.

Hofreiter, M., Capelli, C., Krings, M., Waits, L., Conard, N., Münzel, S., Rabeder, G., Nagel, D., Paunovic, M., Jambrëšić, G., Meyer, S., Weiss, G., Pääbo, S. (2002) Ancient DNA analyses reveal high mitochondrial DNA sequence diversity and parallel morphological evolution of late pleistocene cave bears. *Mol Biol Evol* 19(8):1244-1250.

Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., Haeseler Av, A. & Pääbo, S. (2001a) DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res* 29(23):4793-4799.

Hofreiter, M., Münzel, S., Conard, N.J., Pollack, J., Slatkin, M., Weiss, G., Pääbo, S. (2007) Sudden replacement of cave bear mitochondrial DNA in the late Pleistocene. *Curr Biol* 17(4):R122-123.

Hofreiter, M., Poinar, H.N., Spaulding, W.G., Bauer, K., Martin, P.S., Possnert, G., Pääbo, S. (2000) A molecular analysis of ground sloth diet through the last glaciation. *Mol Ecol* 9(12):1975-1984.

Hofreiter, M., Poinar, H.N., Spaulding, W.G., Bauer, K., Martin, P.S., Possnert, G., Pääbo, S. (2004a) Evidence for reproductive isolation between cave bear populations. *Curr Biol* 14(1):40-43.

Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., Kuch, M. & Pääbo, S. (2001b) Ancient DNA. *Nat Rev Genet* 2(5):353-359.

Hofreiter, M., Serre, D., Rohland, N., Rabeder, G., Nagel, D., Conard, N., Münzel, S., Pääbo, S. (2004b) Lack of phylogeography in European mammals before the last glaciation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(35):12963-12968.

Hofreiter, M. & Stewart, J. (2009) Ecological change, range fluctuations and population dynamics during the Pleistocene. *Curr Biol* 19(14):R584-594.

Hoss, M., Pääbo, S. & Vereshchagin, N. K. (1994) Mammoth DNA-Sequences. *Nature* 370(6488):333-333.

Hughes, S., Hayden, T.J., Douady, C.J., Tougaard, C., Germonpré, M., Stuart, A., Lbova, L., Carden, R.F., Hänni, C., Say, L. (2006) Molecular phylogeny of the extinct giant deer, *Megaloceros giganteus*. *Mol Phylogenet Evol* 40(1):285-291.

Huynen, L., Gill, B. J., Millar, C. D. & Lambert, D. M. (2010) Ancient DNA reveals extreme egg morphology and nesting behavior in New Zealand's extinct moa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(37):16201-16206.

Huynen, L., Millar, C. D., Scofield, R. P. & Lambert, D. M. (2003) Nuclear DNA sequences detect species limits in ancient moa. *Nature* 425(6954):175-178.

Iñiguez, A. M., Reinhard, K., Carvalho Gonçalves, M.L., Ferreira, L.F., Araújo, A., Paulo Vicente, A.C. (2006) SL1 RNA gene recovery from *Enterobius vermicularis* ancient DNA in pre-Columbian human coprolites. *Int J Parasitol* 36(13):1419-1425.

Ivanov, P. L., Wadhams, M.J., Roby, R.K., Holland, M.M., Weedn, V.W., Parsons, T.J. (1996) Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat Genet* 12(4):417-420.

Jehaes, E., Decorte, R., Peneau, A., Petrie, J.H., Boiry, P.A., Gilissen, A., Moisan, J.P., Van den Berghe, H., Pascal, O., Cassiman, J.J. (1998) Mitochondrial DNA analysis on remains of a putative son of Louis XVI, King of France and Marie-Antoinette. *Eur J Hum Genet* 6(4):383-395.

Karp, G. (2004) *Biologie cellulaire et moléculaire - 2ème édition* (De Boeck Université, Bruxelles).

King, C., Debruyne, R., Kuch, M., Schwarz, C. & Poinar, H. (2009) A quantitative approach to detect and overcome PCR inhibition in ancient DNA extracts. *Biotechniques* 47(5):941-949.

Knapp, M., Rohland, N., Weinstock, J., Baryshnikov, G., Sher, A., Nagel, D., Rabeder, G., Pinhasi, R., Schmidt, H.A., Hofreiter, M. (2009) First DNA sequences from Asian cave bear fossils reveal deep divergences and complex phylogeographic patterns. *Mol Ecol* 18(6):1225-1238.

Kolman, C. J. & Tuross, N. (2000) Ancient DNA analysis of human populations. *American Journal of Physical Anthropology* 111(1):5-23.

Krajewski, C., Driskell, A. C., Baverstock, P. R. & Braun, M. J. (1992) Phylogenetic-Relationships of the Thylacine (Mammalia, Thylacinidae) among Dasyuroid Marsupials - Evidence from Cytochrome-B DNA-Sequences. *Proc R Soc Lond B* 250(1327):19-27.

Krause, J., Dear, P.H., Pollack, J.L., Slatkin, M., Spriggs, H., Barnes, I., Lister, A.M., Ebersberger, I., Pääbo, S., Hofreiter, M. (2006) Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. *Nature* 439(7077):724-727.

Krause, J., Lalueza-Fox, C., Orlando, L., Enard, W., Green, R.E., Burbano, H.A., Hublin, J.J., Hänni, C., Fortea, J., de la Rasilla, M., Bertranpetit, J., Rosas, A., Pääbo, S. (2007) The derived FOXP2 variant of modern humans was shared with neandertals. *Curr Biol* 17(21):1908-1912.

Krause, J., Unger, T., Noçon, A., Malaspinas, A.S., Kolokotronis, S.O., Stiller, M., Soibelzon, L., Spriggs H., Dear, P.H., Briggs, A.W., Bray, S.C., O'Brien, S.J., Rabeder, G., Matheus, P., Cooper, A., Slatkin, M., Pääbo, S., Hofreiter, M. (2008) Mitochondrial genomes reveal an explosive radiation of extinct and extant bears near the Miocene-Pliocene boundary. *BMC Evol Biol* 8:220.

Kreader, C. A. (1996) Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol* 62(3):1102-1106.

Krings, M., Stone, A., Schmitz, R.W., Krainitzki, H., Stoneking, M., Pääbo, S. (1997) Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90(1):19-30.

Kruuk, H. (1972) The spotted hyena: a study of predation and social behavior (University of Chicago Press, Chicago ; London).

Kuch, M., Gröcke, D.R., Knyf, M.C., Gilbert, M.T., Younghusband, B., Young, T., Marshall, I., Willerslev, E., Stoneking, M., Poinar, H. *et al.* (2007) A preliminary analysis of the DNA and diet of the extinct Beothuk: a systematic approach to ancient human DNA. *Am J Phys Anthropol* 132(4):594-604.

Kurtén, B. (1968) Pleistocene mammals of Europe (Aldine Pub. Co., Chicago.).

Kurtén, B. (1976) The cave bear story : life and death of a vanished animal (Columbia University Press, New York).

Kurtén, B. & Crusafont Pairó, M. (1977) Villafranchian Carnivores (Mammalia) from La Puebla de Valverde (Teruel, Spain). *Commentationes Biologicae* 85:1-39.

Lalueza-Fox, C., Castresana, J., Sampietro, L., Marquès-Bonet, T., Alcover, J.A., Bertranpetit, J. (2005) Molecular dating of caprines using ancient DNA sequences of *Myotragus balearicus*, an extinct endemic Balearic mammal. *Bmc Evolutionary Biology* 5.

Lalueza-Fox, C., Römpler, H., Caramelli, D., Stäubert, C., Catalano, G., Hughes, D., Rohland, N., Pilli, E., Longo, L., Condemi, S., de la Rasilla, M., Fortea, J., Rosas, A., Stoneking, M., Schöneberg, T., Bertranpetit, J., Hofreiter, M. (2007) A melanocortin 1

receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals. *Science* 318(5855):1453-1455.

Lambert, D. M., Baker, A., Huynen L., Haddrath, O., Hebert, P.D., Millar, C.D. (2005) Is a large-scale DNA-based inventory of ancient life possible? *J Hered* 96(3):279-284.

Lambert, D. M., Ritchie, P.A., Millar, C.D., Holland, B., Drummond, A.J., Baroni, C. (2002) Rates of evolution in ancient DNA from Adelie penguins. *Science* 295(5563):2270-2273.

Lari, M., Rizzi, E., Mona, S., Corti, G., Catalano, G., Chen, K., Vernesi, C., Larson, G., Boscato, P., De Bellis, G., Cooper, A., Caramelli, D., Bertorelle, G. (2011) The complete mitochondrial genome of an 11,450-year-old aurochsen (*Bos primigenius*) from Central Italy. *BMC Evol Biol* 11:32.

Larkin, N. R., Alexander, J. & Lewis, M. D. (2000) Using Experimental Studies of Recent Faecal Material to Examine *Hyaena* Coprolites from the West Runton Freshwater Bed, Norfolk, U.K. *J of Archaeol Sci* 27(1):19-31.

Larson, G., Dobney, K., Albarella, U., Fang, M., Matisoo-Smith, E., Robins, J., Lowden, S., Finlayson, H., Brand, T., Willerslev, E., Rowley-Conwy, P., Andersson, L., Cooper A.. (2005) Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science* 307(5715):1618-1621.

Leonard, J. A. *et al.* (2005) A rapid loss of stripes: the evolutionary history of the extinct quagga. *Biol Lett* 1(3):291-295.

Leonard, J. A., Rohland, N., Glaberman, S., Fleischer, R.C., Caccone, A., Hofreiter, M. (2002) Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. *Science* 298(5598):1613-1616.

Leroi-Gourhan, A. (1965) *Préhistoire de l'art occidental* (Editions d'Art Mazenod, Paris).

Leroi-Gourhan, A. (1966) L'analyse pollinique des coprolithes. *Bulletin de la Société Préhistorique française* 63(5):153-154.

Liden, K. & Angerbjorn, A. (1999) Dietary change and stable isotopes: a model of growth and dormancy in cave bears. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266(1430):1779-1783.

Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362(6422):709-715.

Lindqvist, C., Schuster, S.C., Sun, Y., Talbot, S.L., Qi, J., Ratan, A., Tomsho, L.P., Kasson, L., Zeyl, E., Aars, J., Miller, W., Ingolfsson, O., Bachmann, L., Wiig, O. (2010)

Complete mitochondrial genome of a Pleistocene jawbone unveils the origin of polar bear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(11):5053-5057.

Lira, J., Linderholm, A., Olaria, C., Brandström Durling, M., Gilbert, M.T., Ellegren, H., Willerslev, E., Lidén, K., Arsuaga, J.L., Götherström, A. (2010) Ancient DNA reveals traces of Iberian Neolithic and Bronze Age lineages in modern Iberian horses. *Mol Ecol* 19(1):64-78.

Logan, G. A., Smiley, C. J. & Eglinton, G. (1995) Preservation of Fossil Leaf Waxes in Association with Their Source Tissues, Clarkia, Northern Idaho, USA. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 59(4):751-763.

Loreille, O. & Bouchet, F. (2003) Evolution of ascariasis in humans and pigs: a multi-disciplinary approach. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 Suppl 1:39-46.

Loreille, O., Orlando, L., Patou-Mathis, M., Philippe, M., Taberlet, P., Hänni, C. (2001a) Ancient DNA analysis reveals divergence of the cave bear, *Ursus spelaeus*, and brown bear, *Ursus arctos*, lineages. *Curr Biol* 11(3):200-203.

Loreille, O., Roumat, E., Verneau, O., Bouchet, F. & Hanni, C. (2001b) Ancient DNA from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites. *Int J Parasitol* 31(10):1101-1106.

Luciani, S., Fornaciari, G., Rickards, O., Labarga, C. M. & Rollo, F. (2006) Molecular characterization of a pre-Columbian mummy and in situ coprolite. *Am J Phys Anthropol* 129(4):620-629.

Ludwig, A., Pruvost, M., Reissmann, M., Benecke, N., Brockmann, G.A., Castanos, P., Cieslak, M., Lippold, S., Llorente, L., Malaspinas, A.S., Slatkin, M., Hofreiter, M. (2009) Coat color variation at the beginning of horse domestication. *Science* 324(5926):485.

Luptakova, L., Bábelová, A., Omelka, R., Kolena, B., Vondráková, M., Bauerová, M. Sex determination of early medieval individuals through nested PCR using a new primer set in the SRY gene. *Forensic Sci Int* 207(1-3):1-5.

Lydolph, M. C., Jacobsen, J., Arctander, P., Gilbert, M.T., Gilichinsky, D.A., Hansen, A.J., Willerslev, E., Lange, L. (2005) Beringian paleoecology inferred from permafrost-preserved fungal DNA. *Appl Environ Microbiol* 71(2):1012-1017.

MacHugh, D. E., Edwards, C. J., Bailey, J. F., Bancroft, D. R. & Bradley, D. G. (2000) The extraction and analysis of ancient DNA from bone and teeth: a survey of current methodologies. *Anc Biomol* 3:81-103.

Malmström, H., Stora, J., Dalen, L., Holmlund, G. & Götherström, A. (2005a) Extensive human DNA contamination in extracts from ancient dog bones and teeth. *Mol Biol Evol* 22(10):2040-2047.

Malmström, H., Stora, J., Dalen, L., Holmlund, G. & Götherström, A. (2005b) Extensive human DNA contamination in extracts from ancient dog bones and teeth. *Mol Biol and Evol* 22(10):2040-2047.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., Rothberg, J.M. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437(7057):376-380.

Markova, A. K., Smirnov, N. G., Kozharinov, A. V., Kazantseva, N. E., Simakova, A. N. & Kitaev, L.M. (1995) Late Pleistocene distribution and diversity of mammals in northern Eurasia (PALEOFAUNA Database). *Paleotologia I Evolucio* 28-29:5-134.

Mazza, P. & Rustioni, M. (1994) On the phylogeny of Eurasian bears. *Palaeontographica* 230:38.

Melchior, L., Lynnerup, N., Siegmund, H. R., Kivisild, T. & Dissing, J. (2010) Genetic Diversity among Ancient Nordic Populations. *Plos One* 5(7).

Miller, W., Drautz, D.I., Janecka, J.E., Lesk, A.M., Ratan, A., Tomsho, L.P., Packard, M., Zhang, Y., McClellan, L.R., Qi, J., Zhao, F., Gilbert, M.T., Dalén, L., Arsuaga, J.L., Ericson, P.G., Huson, D.H., Helgen, K.M., Murphy, W.J., Götherström, A., Schuster, S.C. (2009) The mitochondrial genome sequence of the Tasmanian tiger (*Thylacinus cynocephalus*). *Gen Res* 19(2):213-220.

Miller, W., Drautz, D.I., Ratan, A., Pusey, B., Qi, J., Lesk, A.M., Tomsho, L.P., Packard, M.D., Zhao, F., Sher, A., Tikhonov, A., Raney, B., Patterson, N., Lindblad-Toh, K., Lander, E.S., Knight, J.R., Irzyk, G.P., Fredrikson, K.M., Harkins, T.T., Sheridan, S., Pringle, T., Schuster, S.C. (2008) Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature* 456(7220):387-390.

Mills, M. G. L. (1985) Related Spotted Hyenas Forage Together but Do Not Cooperate in Rearing Young. *Nature* 316(6023):61-62.

Mills, M. G. L. (1994) *Kalahari hyenas : comparative behavioral ecology of two species* (Chapman & Hall, London).

Mitchell, D., Willerslev, E. & Hansen, A. (2005) Damage and repair of ancient DNA. *Mutat Res* 571(1-2):265-276.

Monney, J. (2009) Datation des grottes ornées de l'Ardèche - Bidon, Saint-Martin d'Ardèche, Vallon-Pont-d'Arc. *Archéologie de la France - Information*.

Montoya, P. *et al.* (2006) Fossil large mammals from the early Pliocene locality of Alcoy (Spain) and their importance in biostratigraphy. *Geodiversitas* 28(1):137-173.

Morlo, M. & Kündrät, M. (2001) The first carnivore fauna from the Ruscium (Early Pliocene, MN 15) of Germany. *Paläontologische Zeitschrift* 75:163-187.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273.

Nelson, D. E., Angerbjörn, A., Lidén, K. & Turk, I. (1998) Stable isotopes and the metabolism of the European cave bear. *Oecologia* 116:177-181.

Nilsson, M., Possnert, G., Edlund, H., Budowle, B., Kjellström, A., Allen, M. (2010) Analysis of the putative remains of a European patron saint--St. Birgitta. *PLoS One* 5(2):e8986.

Noonan, J. P., Coop, G., Kudaravalli, S., Smith, D., Krause, J., Alessi, J., Chen, F., Platt, D., Pääbo, S., Pritchard, J.K., Rubin, E.M. (2006) Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. *Science* 314(5802):1113-1118.

Noonan, J. P., Hofreiter, M., Smith, D., Priest, J.R., Rohland, N., Rabeder, G., Krause, J., Deter, J.C., Pääbo, S., Rubin, E.M. (2005) Genomic sequencing of Pleistocene cave bears. *Science* 309(5734):597-599.

Noro, M., Masuda, R., Dubrovo, I. A., Yoshida, M. C. & Kato, M. (1998) Molecular phylogenetic inference of the woolly mammoth *Mammuthus primigenius*, based on complete sequences of mitochondrial cytochrome b and 12S ribosomal RNA genes. *J Mol Evol* 46(3):314-326.

Okazaki, M., Yoshida, Y., Yamaguchi, S., Kaneno, M. & Elliott, J. C. (2001) Affinity binding phenomena of DNA onto apatite crystals. *Biomaterials* 22(18):2459-2464.

Olive, F. (2006) Evolution des grands Carnivores au Plio Pléistocène en Afrique et en Europe occidentale. *L'Anthropologie* 110:850-869.

Olivieri, C., Ermini L, Rizzi E, Corti G, Bonnal R, Luciani S, Marota I, De Bellis G, Rollo F. (2010) Characterization of Nucleotide Misincorporation Patterns in the Iceman's Mitochondrial DNA. *Plos One* 5(1).

Olsen, M. E., Bengtsson, C. F., Bertelsen, M. F., Willerslev, E. & Gilbert, M. T. (2011) DNA from keratinous tissue Part II: Feather. *Ann Anat.* doi:10.1016/j.aanat.2011.03.003

Orlando, L., Bonjean, D., Bocherens, H., Thenot, A., Argant, A., Otte, M., Hänni, C. (2002) Ancient DNA and the population genetics of cave bears (*Ursus spelaeus*) through space and time. *Mol Biol Evol* 19(11):1920-1933.

Oskam, C. L., Haile, J., McLay, E., Rigby, P., Allentoft, M.E., Olsen, M.E., Bengtsson, C., Miller, G.H., Schwenninger, J.L., Jacomb, C., Walter, R., Baynes, A., Dortch, J., Parker-Pearson, M., Gilbert, M.T., Holdaway, R.N., Willerslev, E., Bunce, M. (2010) Fossil avian eggshell preserves ancient DNA. *Proc Biol Sci* 277(1690):1991-2000.

Ozawa, T., Hayashi, S. & Mikhelson, V. M. (1997) Phylogenetic position of Mammoth and Steller's sea cow within Tethytheria demonstrated by mitochondrial DNA sequences. *Journal of Molecular Evolution* 44(4):406-413.

Pääbo, S. (1985) Molecular-Cloning of Ancient Egyptian Mummy DNA. *Nature* 314(6012):644-645.

Pääbo, S., Gifford, J. A. & Wilson, A. C. (1988) Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res* 16(20):9775-9787.

Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Despres, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L., Hofreiter, M. (2004) Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 38:645-679.

Pacher, M. & Stuart, A. J. (2009) Extinction chronology and palaeobiology of the cave bear (*Ursus spelaeus*). *Boreas* 38(2):189-206.

Parson, W., Parsons, T. J., Scheithauer, R. & Holland, M. M. (1998) Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: Application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. *International Journal of Legal Medicine* 111(3):124-132.

Peigne, S., Goillot, C., Germonpré, M., Blondel, C., Bignon, O., Merceron, G. (2009) Predormancy omnivory in European cave bears evidenced by a dental microwear analysis of *Ursus spelaeus* from Goyet, Belgium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(36):15390-15393.

Philippe, M. (2005) La grotte Chauvet et les autres "grottes à ours" de ses environs immédiats : Vallée de l'Illbie, amont des Gorges de l'Ardèche et cirque d'Estre. *Ardèche Archéologie* 22:8-19.

Philippe, M. (2007) Rapport sur les travaux effectués en 2007 dans la grotte des Deux-Ouvertures, à Saint-Martin-d'Ardèche (07). (SRA Rhône-Alpes), 110.

Philippe, M. (2009) Découverte de vestiges osseux humains dans le secteur orné paléolithique de la grotte des Deux-Ouvertures. *Ardèche Archeol.* 26:13-14.

Philippe, M. & Argant, A. (1997) Les Ours et leur évolution. *L'Homme et l'ours / Man and bear*, T. Tillet & L. Binford, 1-14.

Philippe, M., Argant, J. & Argant, A. (2010) Un programme d'inventaire, de datations et de données paléo-environnementales concernant les grottes à ossements fossiles du massif de Chartreuse. Colloque sur le Patrimoine Géologique, 7èmes Rencontres du Patrimoine scientifique en Rhône-Alpes - 24-25 Novembre 2009: 37-42.

Philippe, M. & Fosse, P. (2003) La faune de la grotte Chauvet (Vallon-Pont-d'Arc, Ardèche) : présentation préliminaire paléontologique et taphonomique. *Paléo* 15:123-140.

Philippe, M., Monney, J., Argant, J., Chauvet, J.M., Debard, E., Gély, B., Lateur, N., Stocchetti, S. (2009) La grotte ornée Paléolithique des Deux-Ouvertures (Saint-Martin-d'Ardèche) en tant que "grotte à ours des cavernes". *Ardèche Archéologie* 26:3-12.

Plisson, H. (2005) Examen tracéologique de quelques silex collectés sur le sol de la Grotte Chauvet-Pont d'Arc. *Bulletin de la société préhistorique française* 102(1):117-134.

Poinar, H., Kuch, M., McDonald, G., Martin, P. & Pääbo, S. (2003) Nuclear gene sequences from a late pleistocene sloth coprolite. *Curr Biol* 13(13):1150-1152.

Poinar, H. N., Cano, R. J. & Poinar, G. O. (1993) DNA from an extinct plant. *Nature* 363:677.

Poinar, H. N., Hofreiter M, Spaulding WG, Martin PS, Stankiewicz BA, Bland H, Evershed RP, Possnert G, Pääbo S. Molecular coproscopy (1998) Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science* 281(5375):402-406.

Poinar, H. N., Schwarz C, Qi J, Shapiro B, Macphee RD, Buigues B, Tikhonov A, Huson DH, Tomsho LP, Auch A, Rampp M, Miller W, Schuster SC. (2006) Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science* 311(5759):392-394.

Pruvost, M. & Geigl, E. M. (2004) Real-time quantitative PCR to assess the authenticity of ancient DNA amplification. *J of Archaeol Sci* 31(9):1191-1197.

Pruvost, M., Schwarz, R., Correia, V.B., Champlot, S., Braguier, S., Morel, N., Fernandez-Jalvo, Y., Grange, T., Geigl, E.M. (2007) Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(3):739-744.

Qiu, Z. X. (2003) Dispersals of Neogene carnivorans between Asia and North America. *Bulletin Of The American Museum Of Natural History* (279):18-31.

Qiu, Z. X., Yan, D. F. & Jia, H. (1985) Dentition of the *Ursavus* skeleton from Shanwang, Shandong Province. *Vertebrata Palasiatica* 23(4):264-275.

Quilès, J. (2003) Les Ursidae du Pléistocène moyen et supérieur en Midi méditerranéen : Apports paléontologiques, biochronologiques et archéozoologiques. Thèse de Doctorat du 3ème cycle Paris

Quilès, J. & Monchot, H. (2004) Sex-ratio et analyse des mélanges d'*Ursus spelaeus* (Carnivora, Ursidae) du gisement pléistocène supérieur de Fate (Ligurie, Italie). Implications paléobiologiques. *Annales de Paléontologie* 90(2):115-133.

Ramirez, O., Gigli, E., Bover, P., Alcover, J.A., Bertranpetit, J., Castresana, J., Lalueza-Fox, C. (2009) Paleogenomics in a temperate environment: shotgun sequencing from an extinct Mediterranean caprine. *PLoS One* 4(5):e5670.

Rasmussen, M., Li Y, Lindgreen S, Pedersen JS, Albrechtsen A, Moltke I, Metspalu M, Metspalu E, Kivisild T, Gupta R, Bertalan M, Nielsen K, Gilbert MT, Wang Y, Raghavan M, Campos PF, Kamp HM, Wilson AS, Gledhill A, Tridico S, Bunce M, Lorenzen ED, Binladen J, Guo X, Zhao J, Zhang X, Zhang H, Li Z, Chen M, Orlando L, Kristiansen K, Bak M, Tommerup N, Bendixen C, Pierre TL, Grønnow B, Meldgaard M, Andreasen C, Fedorova SA, Osipova LP, Higham TF, Ramsey CB, Hansen TV, Nielsen FC, Crawford MH, Brunak S, Sicheritz-Pontén T, Villems R, Nielsen R, Krogh A, Wang J, Willerslev E. (2010) Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature* 463(7282):757-762.

Rawlence, N. J., Wood, J. R., Armstrong, K. N. & Cooper, A. (2009) DNA content and distribution in ancient feathers and potential to reconstruct the plumage of extinct avian taxa. *Proc. R. Soc. Lond. B* 276(1672):3395-3402.

Reid, A. H., Fanning, T. G., Hultin, J. V. & Taubenberger, J. K. (1999) Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4):1651-1656.

Reiss, R. A. (2006) Ancient DNA from ice age insects: proceed with caution. *Quat Sci R* 25(15-16):1877-1893.

Richards, M. P., Pacher, M., Stiller, M., Quilès, J., Hofreiter, M., Constantin, S., Zilhão, J., Trinkaus, E. (2008) Isotopic evidence for omnivory among European cave bears: Late Pleistocene *Ursus spelaeus* from the Pestera cu Oase, Romania. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(2):600-604.

Rogaev, E. I., Grigorenko, A.P., Moliaka, Y.K., Faskhutdinova, G., Goltsov, A., Lahti, A., Hildebrandt, C., Kittler, E.L., Morozova, I. (2009) Genomic identification in the historical case of the Nicholas II royal family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(13):5258-5263.

Rogaev, E. I., Moliaka, Y.K., Malyarchuk, B.A., Kondrashov, F.A., Derenko, M.V., Chumakov, I., Grigorenko, A.P. (2006) Complete mitochondrial genome and phylogeny of Pleistocene mammoth *Mammuthus primigenius*. *Plos Biology* 4(3):403-410.

Rohland, N., Malaspinas, A.S., Pollack, J.L., Slatkin, M., Matheus, P., Hofreiter, M. (2007) Proboscidean mitogenomics: chronology and mode of elephant evolution using mastodon as outgroup. *PLoS Biol* 5(8):e207.

Rohland, N., Pollack JL, Nagel D, Beauval C, Airvaux J, Pääbo S, Hofreiter M. (2005) The population history of extant and extinct hyenas. *Mol Biol Evol* 22(12):2435-2443.

Saarma, U., Ho, S.Y., Pybus, O.G., Kaljuste, M., Tumanov, I.L., Kojola, I., Vorobiev, A.A., Markov, N.I., Saveljev, A.P., Valdmann, H., Lyapunova, E.A., Abramov, A.V., Männil, P., Korsten, M., Vulla, E., Pazetnov, S.V., Pazetnov, V.S., Putschkovskiy, S.V., Rõkov, A.M. (2007) Mitogenetic structure of brown bears (*Ursus arctos* L.) in northeastern Europe and a new time frame for the formation of European brown bear lineages. *Mol Ecol* 16(2):401-413.

Sato, J. J., Wolsan, M., Minami, S., Hosoda, T., Sinaga, M.H., Hiyama, K., Yamaguchi, Y., Suzuki, H. (2009) Deciphering and dating the red panda's ancestry and early adaptive radiation of Musteloidea. *Mol Phylogenet Evol* 53(3):907-922.

Scott, L., Fernandez Jalvo, Y., Carrión, J. S. & Brink, J. (2003) Preservation and interpretation of pollen in hyaena coprolites: Taphonomic observations from Spain and southern Africa. *Palaeontologia Africana* 39:83-91.

Shapiro, B. (2008) Engineered polymerases amplify the potential of ancient DNA. *Trends Biotechnol* 26(6):285-287.

Shapiro, B., Drummond, A.J., Rambaut, A., Wilson, M.C., Matheus, P.E., Sher, A.V., Pybus, O.G., Gilbert, M.T., Barnes, I., Binladen, J., Willerslev, E., Hansen, A.J., Baryshnikov, G.F., Burns, J.A., Davydov, S., Driver, J.C., Froese, D.G., Harington, C.R., Keddie, G., Kosintsev, P., Kunz, M.L., Martin, L.D., Stephenson, R.O., Storer, J., Tedford, R., Zimov, S., Cooper, A. (2004) Rise and fall of the Beringian steppe bison. *Science* 306(5701):1561-1565.

Sherwood, L. (2005) *Fundamentals of physiology : a human perspective* (Brooks/Cole ; London : Thomson Learning, Pacific Grove, Calif.).

Stankiewicz, B. A., Poinar, H. N., Briggs, D. E. G., Evershed, R. P. & Poinar, G. O. (1998) Chemical preservation of plants and insects in natural resins. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265(1397):641-647.

Stiller, M., Baryshnikov G, Bocherens H, Grandal d'Anglade A, Hilpert B, Münzel SC, Pinhasi R, Rabeder G, Rosendahl W, Trinkaus E, Hofreiter M, Knapp M. (2010) Withering Away-25,000 Years of Genetic Decline Preceded Cave Bear Extinction. *Mol Biol Evol* 27(5):975-978.

Stiller, M., Green, R.E., Ronan, M., Simons, J.F., Du, L., He, W., Egholm, M., Rothberg, J.M., Keates, S.G., Ovodov, N.D., Antipina, E.E., Baryshnikov, G.F., Kuzmin, Y.V., Vasilevski, A.A., Wuenschell, G.E., Termini, J., Hofreiter, M., Jaenicke-Després, V., Pääbo, S. (2006) Patterns of nucleotide misincorporations during enzymatic amplification and direct large-scale sequencing of ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(37):13578-13584.

Stiller, M., Knapp, M., Stenzel, U., Hofreiter, M. & Meyer, M. (2009) Direct multiplex sequencing (DMPS)-a novel method for targeted high-throughput sequencing of ancient and highly degraded DNA. *Genome Res* 19(10):1843-1848.

Stone, A. C., Starrs, J. E. & Stoneking, M. (2001) Mitochondrial DNA analysis of the presumptive remains of Jesse James. *J Forensic Sci* 46(1):173-176.

Sutcliffe, A. J. (1969) Adaptations of spotted hyaenas to living in the British Isles. *Bulletin of the Mammalian Society of the British Isles* 31:10-14.

Talbot, S. L. & Shields, G. F. (1996a) A phylogeny of the bears (Ursidae) inferred from complete sequences of three mitochondrial genes. *Mol Phylogenet Evol* 5(3):567-575.

Talbot, S. L. & Shields, G. F. (1996b) Phylogeography of brown bears (*Ursus arctos*) of Alaska and paraphyly within the Ursidae. *Mol Phylogenet Evol* 5(3):477-494.

Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Krafft, A. E., Bijwaard, K. E. & Fanning, T. G. (1997) Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science* 275(5307):1793-1796.

Tebbe, C. C. & Vahjen, W. (1993) Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl Environ Microbiol* 59(8):2657-2665.

Théry-Parisot, I. & Thiébault, S. (2005) Le pin (*Pinus sylvestris*) : préférence d'un taxon ou contrainte de l'environnement ? Etude des charbons de bois de la Grotte Chauvet. *Bulletin de la société préhistorique française* 102(1):69-76.

Thomas, M. G., Hagelberg, E., Jones, H. B., Yang, Z. H. & Lister, A. M. (2000) Molecular and morphological evidence on the phylogeny of the Elephantidae. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267(1461):2493-2500.

Thomas, R. H., Schaffner, W., Wilson, A. C. & Pääbo, S. (1989) DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature* 340(6233):465-467.

Tosello, G. & Fritz, C. (2005) Les dessins noirs de la Grotte Chauvet-Pont-d'Arc : essai sur leur originalité dans le site et leur place dans l'art aurignacien. *Bulletin de la société préhistorique française* 102(1):159-172.

Turner, A. (1984) The interpretation of variation in fossil specimens of spotted hyena (*Crocuta crocuta* Erxleben, 1777) from Sterkfontein valley sites (mammalian: carnivora). *Annals of the Transvaal museum* 33:399-418.

Valdiosera, C. E., García, N., Anderung, C., Dalén, L., Crégut-Bonnoure, E., Kahlke, R.D., Stiller, M., Brandström, M., Thomas, M.G., Arsuaga, J.L., Götherström, A., Barnes, I. (2007) Staying out in the cold: glacial refugia and mitochondrial DNA phylogeography in ancient European brown bears. *Mol Ecol* 16(24):5140-5148.

Valdiosera, C. E., García-Garitagoitia, J.L., Garcia, N., Doadrio, I., Thomas, M.G., Hänni, C., Arsuaga, J.L., Barnes, I., Hofreiter, M., Orlando, L., Götherström, A. (2008) Surprising migration and population size dynamics in ancient Iberian brown bears (*Ursus arctos*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(13):5123-5128.

Valladas, H., Clottes J, Geneste, J.M., Garcia, M.A., Arnold, M., Cachier, H., Tisnérat-Laborde, N. (2001) Palaeolithic paintings. Evolution of prehistoric cave art. *Nature* 413(6855):479.

Vartanyan, S. L., Garutt, V. E. & Sher, A. V. (1993) Holocene Dwarf Mammoths from Wrangel-Island in the Siberian Arctic. *Nature* 362(6418):337-340.

Vasan, S., Zhang, X., Zhang, X., Kapurniotu, A., Bernhagen, J., Teichberg, S., Basgen, J., Wagle, D., Shih, D., Terlecky, I., Bucala, R., Cerami, A., Egan, J., Ulrich, P. (1996) An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature* 382(6588):275-278.

Vila, C., Leonard, J.A., Götherstrom, A., Marklund, S., Sandberg, K., Liden, K., Wayne, R.K., Ellegren, H. (2001) Widespread origins of domestic horse lineages. *Science* 291(5503):474-477.

Vila-Taboada, M., Fernandez-Mosquera, D., Lopez-González, F., Grandal-D'Anglade, A. & Vidal Romani, J.-R. (1999) Paleocological implication inferred from stable isotopic

signatures ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) in bone collagen of *Ursus spealeus* ROS.-HEIN. *Cad Lab Xeol Laxe* 24:73-87.

Wagner, J. (2010) Pliocene to early Middle Pleistocene ursine bears in Europe: a taxonomic overview. *Journal of the National Museum (Prague), Natural History Series* 179(20):197-215.

Waits, L. P., Sullivan, J., O'Brien, S. J. & Ward, R. H. (1999) Rapid radiation events in the family Ursidae indicated by likelihood phylogenetic estimation from multiple fragments of mtDNA. *Mol Phylogenet Evol* 13(1):82-92.

Wall, J. D. & Kim, S. K. (2007) Inconsistencies in Neanderthal genomic DNA sequences. *Plos Genetics* 3(10):1862-1866.

Watts, P. C., Thompson, D. J., Allen, K. A. & Kemp, S. J. (2007) How useful is DNA extracted from the legs of archived insects for microsatellite-based population genetic analyses? *Journal of Insect Conservation* 11(2):195-198.

Wayne, R. K., Leonard, J. A. & Cooper, A. (1999) Full of sound and fury: The recent history of ancient DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30:457-477.

Wayne, R. K., Van Valkenburgh, B. & O'Brien, S. J. (1991) Molecular distance and divergence time in carnivores and primates. *Mol Biol Evol* 8(3):297-319.

Werdelin, L. & Solounias, N. (1991) The Hyaenidae: taxonomy, systematics and evolution. *Fossils and Strata* 30:1-104.

Willerslev, E., Cappellini, E., Boomsma, W., Nielsen, R., Hebsgaard, M.B., Brand, T.B., Hofreiter, M., Bunce, M., Poinar, H.N., Dahl-Jensen, D., Johnsen, S., Steffensen, J.P., Bennike, O., Schwenninger, J.L., Nathan, R., Armitage, S., de Hoog, C.J., Alfimov, V., Christl, M., Beer, J., Muscheler, R., Barker, J., Sharp, M., Penkman, K.E., Haile, J., Taberlet, P., Gilbert, M.T., Casoli, A., Campani, E., Collins, M.J. (2007) Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested southern Greenland. *Science* 317(5834):111-114.

Willerslev, E. & Cooper, A. (2005) Ancient DNA. *Proc Biol Sci* 272(1558):3-16.

Willerslev, E., Gilbert, M.T., Binladen, J., Ho, S.Y., Campos, P.F., Ratan, A., Tomsho, L.P., da Fonseca, R.R., Sher, A., Kuznetsova, T.V., Nowak-Kemp, M., Roth, T.L., Miller, W., Schuster, S.C. (2009) Analysis of complete mitochondrial genomes from extinct and extant rhinoceroses reveals lack of phylogenetic resolution. *BMC Evol Biol* 9:95.

Willerslev, E., Hansen, A.J., Binladen, J., Brand, T.B., Gilbert, M.T., Shapiro, B., Bunce, M., Wiuf, C., Gilichinsky, D.A., Cooper, A. (2003) Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science* 300(5620):791-795.

Willerslev, E., Hansen, A. J. & Poinar, H. N. (2004a) Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost. *Trends Ecol Evol* 19(3):141-147.

Willerslev, E., Hansen, A.J., Rønn, R., Brand, T.B., Barnes, I., Wiuf, C., Gilichinsky, D., Mitchell, D., Cooper, A. (2004b) Long-term persistence of bacterial DNA. *Curr Biol* 14(1):R9-10.

Wood, J. R., Rawlence, N.J., Rogers, G.M., Austin, J.J., Worthy, T.H., Cooper, A. (2008) Coprolite deposits reveal the diet and ecology of the extinct New Zealand megaherbivore moa (Aves, Dinornithiformes). *Quat Sci R* 27(27-28):2593-2602.

Woodward, S. R., Weyand, N. J. & Bunnell, M. (1994) DNA sequence from Cretaceous period bone fragments. *Science* 266(5188):1229-1232.

Yang, H., Golenberg, E. M. & Shoshani, J. (1996) Phylogenetic resolution within the elephantidae using fossil DNA sequence from the American mastodon (*Mammut americanum*) as an outgroup. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(3):1190-1194.

Yll, R., Carrión, J. S., Marra, A. C. & Bonfiglio, L. (2006) Vegetation reconstruction on the basis of pollen in Late Pleistocene hyena coprolites from San Teodoro Cave (Sicily, Italy). *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 237(1):32-39.

Yu, L., Li, Q. W., Ryder, O. A. & Zhang, Y. P. (2004) Phylogeny of the bears (Ursidae) based on nuclear and mitochondrial genes. *Mol Phylogenet Evol* 32(2):480-494.

Yu, L., Li, Y. W., Ryder, O. A. & Zhang, Y. P. (2007) Analysis of complete mitochondrial genome sequences increases phylogenetic resolution of bears (Ursidae), a mammalian family that experienced rapid speciation. *BMC Evol Biol* 7:198.

Zhang, Y. P. & Ryder, O. A. (1993) Mitochondrial DNA sequence evolution in the Arctoidea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(20):9557-9561.

Zhang, Y. P. & Ryder, O. A. (1994) Phylogenetic relationships of bears (the Ursidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 3(4):351-359.

Zischler, H., Höss, M., Handt, O., von Haeseler, A., van der Kuyl, A.C., Goudsmit, J. (1995) Detecting dinosaur DNA. *Science* 268(5214):1192-1193; author reply 1194.

Abstract

Palaeogenetics aims at analysing DNA from archaeological remains. New genetic sequencing technologies revitalize the discipline through genomic analysis. Because of cool and constant temperature, cave sites allow the preservation of ancient DNA. We carried out DNA analysis of Pleistocene specimens originating from cave sites, especially the Chauvet cave. We studied samples from two extinct species, the cave bear, *Ursus spelaeus*, and the cave hyena, *Crocota crocuta spelaea*.

Using a well-preserved sample from Chauvet cave, we characterized the 16,810 bp-long mitochondrial genome of the extinct cave bear, and established its phylogeny. We were able to ascertain that the cave bear is a sister-species to the brown and polar bears, and that the two lineages split about 1.6 million years ago. We also sequenced mitochondrial control region fragments of Chauvet and Deux-Ouvertures cave bear samples. These Ardèche bear specimens, dated back to 28,000-32,000 years BP, display strong genetic homogeneity that may be related to the imminent species extinction.

Finally, we analysed cave hyena coprolites from the Coumère Cave by metagenomic DNA sequencing. As these fossilized feces still contain a high amount of mitochondrial and nuclear DNA, we were able to decipher the first complete mitochondrial genome for the cave hyena. We found DNA from the red deer, *Cervus elaphus*, thus depicting a Pleistocene predator-prey relationship.

Résumé

La Paléogénétique a pour but l'analyse de l'ADN de pièces archéologiques, et le renouveau de cette discipline tend à intégrer une dimension génomique par le séquençage massif des spécimens les mieux préservés. Les grottes, dont la température reste fraîche et constante, permettent la conservation de l'ADN. Nous avons analysé des échantillons du Pléistocène conservés dans des grottes, dont un site archéologique majeur, la Grotte Chauvet. L'étude a porté sur deux espèces, l'ours des cavernes, *Ursus spelaeus* et l'hyène des cavernes, *Crocota crocuta spelaea*.

À partir d'un échantillon particulièrement bien conservé de la Grotte Chauvet, nous avons séquencé le génome mitochondrial de l'ours des cavernes et établi la phylogénie de cette espèce éteinte. Nous avons montré que l'ours des cavernes est une espèce proche des ours bruns et polaires dont elle s'est séparée il y a 1,6 million d'années. Nous avons ensuite analysé la région de contrôle mitochondrial de plusieurs spécimens des Grottes Chauvet et des Deux-Ouvertures datés de 28 000 à 32 000 ans. La forte homogénéité génétique de cette population ardéchoise pourrait être corrélée à la disparition régionale de l'espèce.

Enfin, nous avons réalisé l'analyse génomique de coprolithes d'hyène des cavernes. Nous avons mis en évidence des quantités importantes d'ADN nucléaire et mitochondrial dans les coprolithes et reconstitué le premier génome mitochondrial complet d'hyène des cavernes. La présence d'ADN de cerf élaphe, *Cervus elaphus*, nous permet de décrire une relation proie-prédateur du Pléistocène.