# Analyse de l'ADN pendant une campagne de fouilles

## Application à l'étude de coprolithes d'un site du Paléolithique supérieur (grotte Maldidier, Dordogne, France)

Mélanie Flaender[1], Delphine Plaire[2,3], Myriam Boudadi-Maligne[4], Jean-Baptiste Mallye[4], Josie Lambourdiere[5], Jérôme Ventosa[1], Remco Den Dulk[1], Anne-Gaëlle Bourdat[1], Jean-Marc Elalouf[2,3*]

[1] Université Grenoble-Alpes, F-38000 Grenoble, France ; CEA, LETI, MINATEC Campus, F-38054 Grenoble, France

[2] Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA/DRF/SBIGeM, CNRS UMR 9198, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

[3] CNRS-UMR 7206, « Éco-anthropologie », musée de l'Homme, 17, place du Trocadéro-et-du-11-Novembre 75016 Paris, France

[4] CNRS-UMR 5199, PACEA, Université de Bordeaux, allée Geoffroy-Saint-Hilaire, CS50023, 33615 Pessac Cedex, France

[5] Service de systématique moléculaire, UMS 2700 CNRS-MNHN, CP26, 57, rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France

Correspondance : jean-marc.elalouf@cea.fr

## Introduction

L'évolution naturelle des méthodes d'analyse, y compris les plus sophistiquées, tend vers l'automatisation des procédures et la miniaturisation de l'appareillage afin de rendre possible les analyses sur le terrain. On attend de telles analyses qu'elles permettent une caractérisation rapide du matériel archéologique, délivrent une information quotidienne sur le processus de fouilles, et éventuellement contribuent à le piloter. Des équipements mobiles ont été testés avec succès pour l'étude des pigments

de peintures pariétales au moyen de différentes méthodes comme l'analyse colorimétrique [1], la fluorescence X [2-4], la diffraction X [3], la réflectographie infrarouge [4] et la spectroscopie Raman [4, 5]. Les études *in situ* des pigments ont permis en particulier d'identifier les peintures à base de charbon, sur lesquelles une datation par le radiocarbone peut ultérieurement être réalisée en laboratoire [4]. En revanche, aucune tentative n'a à ce jour été entreprise pour étudier l'ADN d'échantillons archéologiques durant une campagne de fouilles, en dépit de l'observation que les échantillons fraîchement excavés contiennent davantage d'ADN que ceux stockés de façon prolongée dans des musées [6].

L'appareillage mobile pour l'analyse d'ADN fait l'objet de recherches intensives, en raison de son application possible au diagnostic médical au chevet du patient [7], à la surveillance de la nourriture [8] et de l'environnement [9]. Les systèmes microfluidiques apparaissent comme les plus adaptés à ces objectifs car ils permettent d'intégrer et d'automatiser plusieurs opérations sur une plateforme miniaturisée [10-11]. Au-delà de la réduction du temps d'analyse, l'automatisation des tâches, en limitant la manipulation des échantillons, réduit les risques de contamination. Ce point est particulièrement important pour les analyses d'ADN ancien, car la faible quantité de matériel génétique dans les échantillons archéologiques nécessite une grande vigilance pour éviter les contaminations par de l'ADN moderne [12-13].

Pour notre étude, nous avons utilisé deux plateformes micro-fluidiques issues des travaux du Laboratoire d'Électronique et de Technologie de l'Information du CEA de Grenoble [14-17] : la plateforme *Microprep*, servant à la préparation de l'échantillon, et la plateforme *ALL* qui permet d'analyser l'ADN au moyen d'une amplification par PCR en temps réel. Ces appareils ont été utilisés durant la campagne de fouilles réalisées dans la grotte Maldidier en septembre 2015.

La grotte Maldidier (La Roque-Gageac, Dordogne) est une petite cavité surplombant la vallée de la Dordogne (Figure 1). Découverte dans les années 1960, elle a fait l'objet de fouilles à la fin des années 1960 par J.-Ph. Rigaud, dans les années 1970 par F. Delpech et au début des années 2000 par G. Lucas et J.-C. Castel [18-19]. Ces fouilles ont mis en évidence plusieurs phases d'occupation par l'homme au Paléolithique supérieur durant l'Aurignacien et le Gravettien, ainsi qu'une présence non anecdotique de canidés (loups et renard) en fond de cavité [20]. Les fouilles ont été reprises en 2012 sous la direction de M. Boudadi-Maligne afin d'étudier de façon plus approfondie les interactions entre l'homme et les carnivores au début du Paléolithique supérieur.

Trois unités stratigraphiques (*US*) ont été décrites pour la grotte Maldidier [21]. La première (*US1*), en sommet de remplissage, correspond à des limons éoliens stériles. La deuxième (*US2*), en position intermédiaire, composée de limons mis en place par ruissellement et affectés par des processus de gélifraction, fournit la plus grande partie du matériel archéologique ainsi que des restes animaux qui ont livré des dates radiocarbone comprises entre 34 000 et 27 000 ans avant le présent (calBP). La troisième unité stratigraphique (*US3*), la plus profonde, correspond à des sables issus de la désagrégation de la paroi. Elle est pauvre en matériel archéologique mais riche en excréments fossiles (coprolithes) et n'a pu être datée pour le moment.

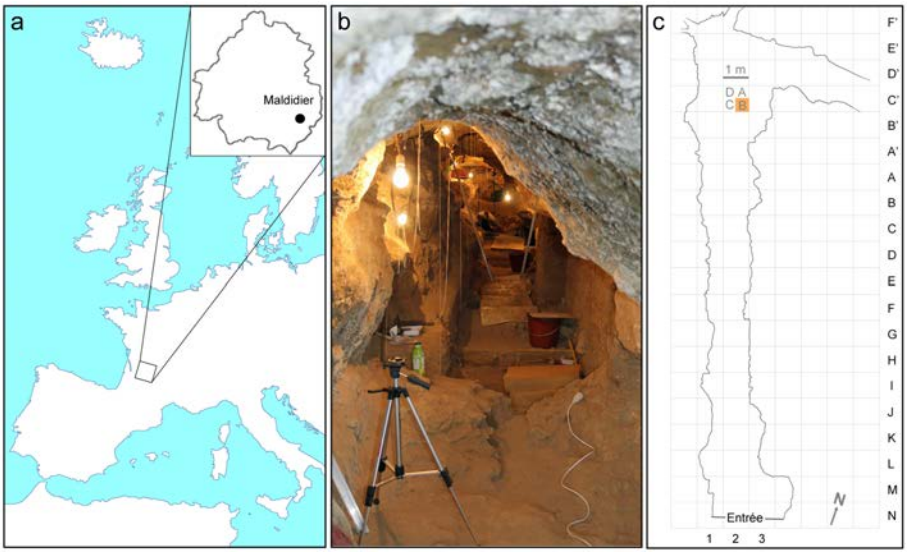



Figure 1 – Présentation du site. (a) localisation géographique de la grotte Maldidier (La Roque-Gageac, Dordogne) ; (b) la grotte vue depuis l'entrée ; (c) topographie de la grotte. Les coordonnées alphanumériques des carrés de fouilles de 1 m de côté sont indiquées en caractères noirs, et les repères alphabétiques pour les sous-carrés de 50 cm de côté sont en lettres grises. À titre d'exemple, la position occupée par le sous-carré orange est C'2B (© F. Lacrampe-Cuyaubère, X. Muth).

La préservation de l'ADN dans des coprolithes de carnivores a été montrée à plusieurs reprises dans des sites du Pléistocène [22-23]. Dans la grotte Maldidier, les coprolithes présents en *US2* et *US3* sont pour l'essentiel sous formes de fragments de taille infra-centimétrique, si bien que contrairement à ce qui peut être réalisé dans d'autres sites [24-25] une analyse de taille ou de morphologie ne peut livrer d'information sur l'espèce ou les espèces dont ils sont issus. Ce déficit d'information sur les coprolithes de la grotte Maldidier renforce la pertinence de l'analyse de leur ADN. Notre étude a porté sur la recherche d'ADN de loup (*Canis lupus*) et de renard commun (*Vulpes vulpes*). L'ADN d'hyène des cavernes (*Crocuta crocuta*), espèce dont les coprolithes sont fréquents dans les sites paléolithiques [26], a également été recherché. Les résultats éclairent d'un jour nouveau la fréquentation de la grotte Maldidier par les carnivores.

## 1 Matériel et méthodes

### 1.1 Études préalables à la campagne de fouilles

Préalablement à la campagne de fouilles, les tests permettant la détection de l'ADN des différentes espèces ont été mis au point en laboratoire sur le plateau « Paléogénomique et génétique moléculaire » du musée de l'Homme. Ce plateau comporte une salle blanche pour l'extraction d'ADN ancien et les étapes précédant l'amplification, ainsi que des laboratoires conventionnels pour l'amplification et la manipulation des produits amplifiés [23]. Les extractions d'ADN, réalisées selon le protocole décrit par

Palacio et al. [23], ont été effectuées à partir de 0,5 g d'un coprolithe d'hyène des cavernes de la grotte ariègeoise de Coumère [22], d'un coprolithe de loup de la grotte Chauvet-Pont d'Arc (Ardèche) et d'un coprolithe de renard de l'Igue-du-Gral (Lot), et l'ADN extrait a été obtenu dans un volume final de 100 µl. L'analyse de l'ADN a été effectuée par la méthode de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) en temps réel en utilisant une sonde *TaqMan* pour la détection (Figure 2). Par rapport à une PCR conventionnelle, basée sur l'utilisation d'amorces ciblant la région d'ADN amplifié, la méthode *TaqMan* [27] comporte en outre une sonde qui s'hybride sur le fragment d'ADN recopié. L'ADN polymérase, qui copie l'ADN à partir de l'amorce, possède une activité exonucléase 5'-3' qui va cliver la sonde. Une fois ce clivage réalisé, le suppresseur présent dans la sonde est suffisamment éloigné du fluorophore pour que celui-ci puisse émettre un signal après excitation. L'intérêt de cette méthode est la spécificité accrue par rapport à une simple PCR. En effet, si les oligonucléotides permettent l'amplification de fragments autres que celui recherché, ces fragments indésirables ne permettront pas l'hybridation de la sonde et il n'y aura pas de signal parasite. On doit donc en principe avec cette approche détecter seulement le fragment désiré, ce qui évite les manipulations ultérieures (purification sur gel, clonage, séquençage). Ces manipulations sont les sources principales de contamination en laboratoire ; elles requièrent en outre un temps d'analyse et des équipements qui sont incompatibles avec le concept de laboratoire mobile.

Pour nos expériences, des essais *TaqMan* à façon ont été mis au point pour la détection de fragments du génome mitochondrial de trois espèces de carnivore. Des expériences préalables réalisées dans notre laboratoire avaient permis de vérifier que les fragments ciblés peuvent être amplifiés de façon efficace et spécifique (vérification par séquençage de l'ADN) chez chacune des espèces étudiées. La sélection des amorces et des sondes a été effectuée en utilisant le logiciel *Custom TaqMan assay Design Tool* du site de la société Applied Biosystems (Foster City, Californie, USA) et leurs séquences sont indiquées dans le Tableau 1. La spécificité des essais *TaqMan* a été vérifiée préalablement à la campagne de fouilles en testant chacun des trois essais sur l'ADN extrait au laboratoire à partir d'un coprolithe d'hyène des cavernes, de loup ou de renard (voir ci-dessus). L'analyse de l'ADN de ces trois coprolithes a été réalisée dans un volume final de 20 µl contenant 10 µl de 2X *Universal Master Mix II* (Thermo Fisher Scientific), 900 nM de chaque amorce de PCR, 250 nM de la sonde *TaqMan* et 0,5 µl (0,5%) de l'extrait d'ADN, du blanc d'extraction, ou un volume équivalent d'eau distillée ultra pure certifiée sans DNase ni RNase (Thermo Fisher Scientific). L'amplification a été réalisée sur l'appareil de PCR en temps réel *CFX96 Touch* (BioRad, Hercules, Californie, USA) et comportait une étape d'activation de l'enzyme (95°C, 10 minutes), suivie de 40 cycles de PCR (95°C, 15 secondes ; 60°C, 1 minute). Chacun des essais *TaqMan* fonctionnait seulement sur l'espèce pour laquelle il avait été conçu (Figure 3).

Les séquences des amorces sens, anti-sens et des sondes sont données dans l'orientation 5'-3'. FAM, 6-carboxyfluoresceine (correspond au fluorophore de la Figure 2) ; NFQ, *non fluorescent quencher* (correspond au suppresseur de la Figure 2) ; MGB, *minor groove binder*.

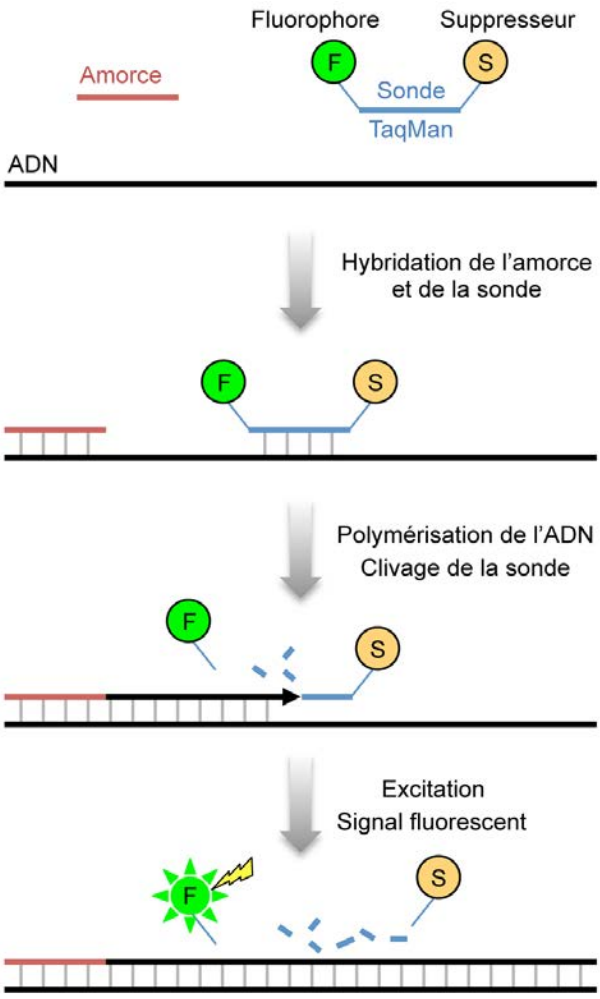



FIGURE 2 – Schéma simplifié illustrant le principe de la méthode *TaqMan* pour la détection en temps réel de l'ADN amplifié. L'amorce et la sonde *TaqMan* sont des oligonucléotides qui s'hybrident de façon spécifique sur l'ADN cible. La sonde comporte un fluorophore et un suppresseur qui empêche l'émission de signal tant que la sonde est intacte. La polymérisation de l'ADN à partir de l'amorce s'accompagne d'un clivage de la sonde. Une fois que le fluorophore et le suppresseur sont dissociés, l'excitation à une longueur d'onde appropriée permet l'obtention d'un signal fluorescent. Sur ce schéma simplifié, un seul brin d'ADN (celui sur lequel s'hybride la sonde *TaqMan*) est représenté dans la partie supérieure de la figure.

### 1.2 Études réalisées pendant la campagne de fouilles

Les précautions sur le terrain pour éviter les contaminations comportaient le port de gants en latex non poudrés, l'utilisation d'une feuille d'aluminium recouvrant la surface de travail, de boites de Petri et de scalpels stériles renouvelés pour chaque échantillon, de cônes à filtre pour les pipettes, de produits garantis PCR grade et aucune manipulation des ADN amplifiés.

Tableau 1 – Amorces et sondes *TaqMan* utilisées dans cette étude.

| **Analyse** | **Amorce ou sonde, séquence** | **Cible, taille (pb)** |
|---|---|---|
| *Crocuta crocuta* | Sens, CCACATCTGCCGAGACGTTAA<br>Anti-sens, GCTCCGTTGGCGTGTATGTAT<br>Sonde, FAM-TACGGCTGAATCATCC-NFQ-MGB | Cytochrome B, 60 |
| *Canis lupus* | Sens, CCTGGCATCTGGTTCTTACCT<br>Anti-sens, GTCCCATTTGCGAGAATTAGTAGGA<br>Sonde, FAM-CAGGGCCATAATCTT-NFQ-MGB | Région de contrôle, 72 |
| *Vulpes vulpes* | Sens, AACTATACCTGGCATCTGGTTCTTAC<br>Anti-sens, GAGATGTCCCATTTGAGAGGATTAGT<br>Sonde, FAM-CTCAGGGCCATTCTAC-NFQ-MGB | Région de contrôle, 85 |
| Carnivores | Sens, AACTATACCTGGCATCTGGTTCT<br>Anti-sens, CCATCGAGATGTCCCATTT | Région de contrôle, 88-90 |

### *1.2.1 Préparation des échantillons*

Pour la préparation des échantillons, nous avons utilisé la plateforme *Microprep* mise au point au Laboratoire d'Électronique et de Technologie de l'Information (LETI, CEA Grenoble). Le fonctionnement de cette plateforme est basé sur l'utilisation de cartouches micro-fluidiques à usage unique positionnées sur un appareil pilotant des tâches automatisées [15, 17, 28]. Les cartouches micro-fluidiques sont fabriquées puis conditionnées en pochette unitaire dans une salle blanche. Les cartouches comportent des micro-canaux pour la circulation des liquides, des valves intégrées, et plusieurs compartiments, dont l'un contient des micro-billes de verre d'un diamètre de 100 µm.

À partir de l'échantillon (coprolithe ou refus de tamis), environ 5 mg de poudre sont isolés au moyen d'un scalpel, mis en suspension dans 20 µl de tampon d'extraction (0,1% Tween 20), et introduits dans la carte micro-fluidique. Un micro-broyage, destiné à favoriser l'élution de l'ADN à partir de la matrice de l'échantillon, est réalisé grâce au mouvement des billes de verre pendant 3 cycles de 20 secondes à une fréquence de 300 Hz. Ce procédé combine une action mécanique (broyage au moyen de billes) et le procédé classique en biologie moléculaire de solubilisation au moyen d'un détergent (Tween 20) pour rendre l'ADN accessible aux réactifs permettant son amplification. Le Tween 20 a été sélectionné de préférence à d'autres détergents car il n'inhibe pas l'amplification réalisée avec notre tampon de PCR (voir 1.2.2). Une fois le broyage réalisé, l'ordinateur pilotant le système déclenche l'ouverture de micro-vannes, la chambre de broyage est rincée avec 60 µl de tampon d'extraction injecté au moyen d'une pompe péristaltique intégrée à la plateforme. L'échantillon (80 µl) est récupéré dans un tube Eppendorf, brièvement centrifugé dans une micro-centrifugeuse de paillasse, et un aliquot de surnageant est utilisé pour l'analyse par PCR. Des blancs d'extraction, correspondant à du tampon sans ajout de matériel archéologique, ont été traités sur la plateforme *Microprep* de la même façon que les échantillons et ont servi à vérifier l'absence de contamination.

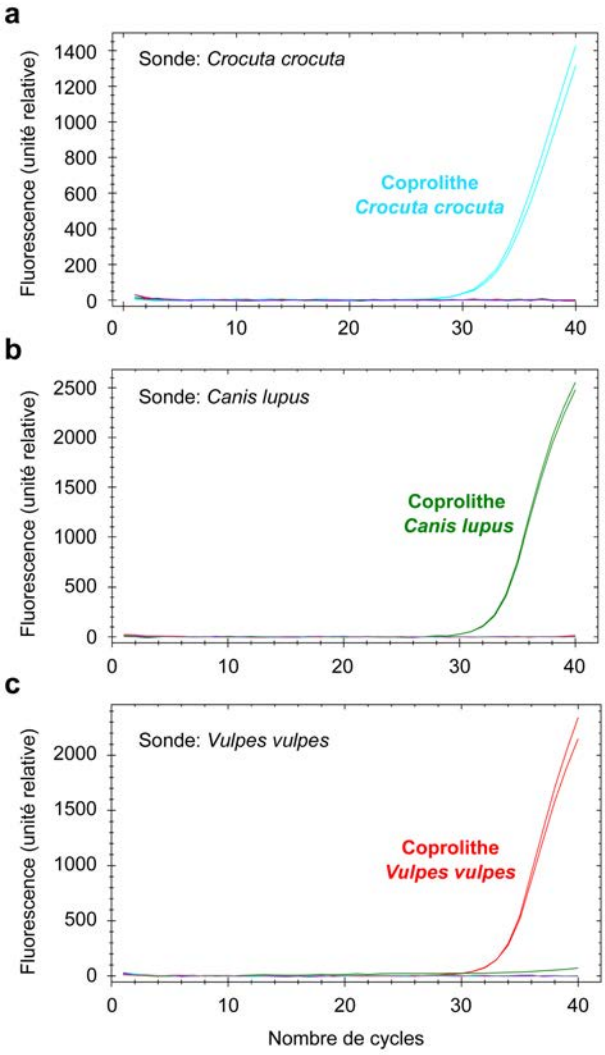



FIGURE 3 – Validation des différents essais *TaqMan* pour l'analyse de l'ADN. Ces expériences, effectuées au laboratoire du musée de l'Homme, ont été réalisées sur un appareil de PCR en temps réel Biorad CFX96. Les courbes indiquent les résultats obtenus pour l'analyse de 0,5% de l'ADN extrait de 0,5 g d'un coprolithe d'hyène des cavernes (*Crocuta crocuta*, bleu), de loup (*Canis lupus*, vert) ou de renard (*Vulpes vulpes*, rouge). Les résultats obtenus pour les blancs de PCR et les blancs d'extraction sont indiquées par les courbes grises et violettes, respectivement. Les panneaux a, b, et c correspondent respectivement aux signaux fournis par les sondes *Crocuta crocuta*, *Canis lupus*, et *Vulpes vulpes*. Pour chaque panneau, les deux courbes de même couleur correspondent à des duplicas (deux analyses pour la même quantité d'ADN).

### *1.2.2 Amplification de l'ADN par PCR en temps réel*

Pour la PCR en temps réel pendant la campagne de fouilles, nous avons utilisé la plateforme *ALL* [29] qui a été construite grâce à l'association de brevets du CEA

de Grenoble et de la société Advanced Liquid Logic, qui est maintenant propriété de la compagnie Illumina. La plateforme *ALL* utilise des cartouches micro-fluidiques à usage unique, fonctionnant sur le principe de l'électro-mouillage, et un instrument pilotant les cycles de PCR et l'acquisition des signaux optiques. Les cartouches micro-fluidiques *ALL* sont fabriquées puis conditionnées en pochette unitaire dans une salle blanche.

Pour l'amplification d'ADN, une cartouche *ALL* est positionnée sur l'instrument puis remplie d'huile de silicone stérile pour rendre optimales les conditions d'électro-mouillage, éviter l'évaporation et les contaminations croisées entre gouttelettes. L'échantillon (1 µl de la solution d'ADN ou de blanc d'extraction obtenu par *Microprep* dans un volume final de 10 µl de tampon d'extraction) est déposé dans un puits de la cartouche *ALL*. Les réactifs (4 µl d'un mélange réactionnel contenant 8 unités de *HawkZ05 DNA polymerase* (Roche Diagnostics, Manheim, Allemagne), 0,8 µl de 5x *HawkZ05 fast one-step RT-PCR master mix*, la sonde *TaqMan* (500 nM) et les amorces (1,8 µM) appropriées) sont quant à eux déposés dans un autre puits de la même cartouche. Une gouttelette d'échantillon et une gouttelette de réactifs (300 nl chacune) sont mélangées et déplacées sur la cartouche au moyen du procédé EWOD (*Electro Wetting On Dielectric*). Le déplacement sur la cartouche permet de positionner la gouttelette successivement sur des compartiments dont la température est réglée à 95°C ou 60°C et accomplir ainsi les cycles de PCR (95°C, 10 secondes ; 60°C, 90 secondes ; 45 cycles) aux températures nécessaires pour le fonctionnement du système *TaqMan*. Dix gouttelettes réactionnelles de 600 nl (par exemple deux échantillons testés vis-à-vis de cinq sondes) peuvent être analysées simultanément sur la cartouche micro-fluidique. La fluorescence de chaque gouttelette réactionnelle est mesurée à la fin de chaque cycle au moyen d'un détecteur de fluorescence. Une fois la PCR achevée, la cartouche *ALL* est transférée dans un sac étanche pour déchets de laboratoire.

## 1.3 Études postérieures à la campagne de fouilles

Ces études ont été réalisées sur le plateau « Paléogénomique et génétique moléculaire » du musée de l'Homme. La salle blanche de ce plateau était utilisée pour l'extraction d'ADN et les étapes précédant l'amplification.

### *1.3.1 Extraction d'ADN*

Les échantillons (0,45-0,50 g de coprolithe ou de sol de la grotte prélevé à proximité de coprolithes) ont été réduits en poudre au moyen du broyeur à billes MM200 (Retsch, Allemagne) réglé à une vitesse de 25 oscillations par seconde pendant 30 secondes. Les échantillons ont été ensuite transférés dans 6 ml de tampon (EDTA 250 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), N-lauryl sarkosine 0.2%, proteinase K 200 µg/ml), et incubés 60 h à 42°C sous agitation rotative. Une centrifugation (10 minutes, 3 000 g) a ensuite été réalisée, le surnageant a été concentré par centrifugation sur une colonne de dialyse Amicon de 2 ml présentant un seuil de sélection de 30 000 Dalton (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) et la colonne a été rincée quatre fois avec 2 ml d'eau distillée. L'extrait d'ADN a été récupéré dans un volume de 100 à 120 µl, puis a été soumis à une purification supplémentaire sur une colonne de silice (Qiagen #28004 ; Venlo, Pays-Bas) en suivant les recommandations du fournisseur. L'ADN a été élué de la

colonne avec du tampon Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) et récupéré dans un volume final de 100 µl.

### *1.3.2 Amplification et séquençage de l'ADN*

Les amplifications par PCR ont été réalisées au moyen des amorces pour carnivores dont la séquence est indiquée dans le Tableau 1. Les deux amorces présentent un alignement sans aucun mésappariement sur le génome mitochondrial de référence de plusieurs espèces : *Canis lupus* (code d'accès *GenBank*, NC_008092), *Canis lupus familiaris* (NC_002008), *Cuon alpinus* (NC_013445), *Vulpes vulpes* (NC_008434), et *Martes martes* (NC_021749). L'amorce sens présente également un alignement parfait sur le génome mitochondrial de référence de l'hyène des cavernes (*Crocuta crocuta*, NC_020670), et l'amorce anti-sens présente un mésappariement vis-à-vis de cette séquence, 4 nucléotides en amont de l'extrémité 3'. Les amorces prédisent l'amplification d'un fragment de 88 paires de bases (pb) pour *Crocuta crocuta* et *Martes martes*, 89 pb pour *Canis lupus*, *Canis lupus familiaris* et *Cuon alpinus*, et 90 pb pour *Vulpes vulpes*. L'efficacité de ces amorces pour amplifier l'ADN de spécimens Pléistocènes de *Canis lupus*, *Vulpes vulpes* et *Crocuta crocuta* avait été vérifiée antérieurement dans notre laboratoire.

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 50 µl contenant 0,1 à 0,9 µl de l'extrait d'ADN de coprolithe, de sol ou de blanc d'extraction, et le tampon d'amplification (amorces 300 nM, dNTP 200 µM, $MgCl_2$ 2.5 mM, 5 µl de GeneAmp 10X PCR buffer II, et 2,5 U d'*AmpliTaq Gold DNA polymerase* (Thermo Fisher Scientific)). Après une étape d'activation de l'enzyme (95°C, 10 minutes), 45 cycles de PCR (95°C, 15 secondes ; 53°C, 20 secondes ; 70°C, 1 minute) ont été réalisés sur un appareil Veriti (Thermo Fisher Scientific). La totalité du volume de chaque réaction de PCR a été déposée sur un gel de polyacrylamide à 8%. Après électrophorèse, le gel a été coloré au moyen de *Sybr Green I* (Thermo Fisher Scientific) et examiné sur un trans-illuminateur à une longueur d'onde de 305 nM. Les témoins négatifs (blanc de PCR, blanc d'extraction) ainsi que l'extrait de sol n'ont jamais fourni d'ADN amplifié. Les produits de PCR ont été extraits du gel et clonés en utilisant le kit TOPO TA (Thermo Fisher Scientific). Le séquençage a été réalisé au moyen de la méthode de Sanger sur un séquenceur automatique ABI3130 à partir de l'ADN de colonies bactériennes en utilisant l'amorce universelle M13 et les réactifs BigDye 3.1 (Thermo Fisher Scientific). Pour chaque réplica de PCR, le séquençage a porté sur l'ADN de 7 à 32 clones. Une séquence consensus a été déduite pour chaque réplica en alignant la séquence des différents clones. La séquence finale retenue pour chaque échantillon correspond au consensus des réplicas de 3 à 6 PCR.

### *1.3.3 Analyses phylogénétiques*

Les analyses phylogénétiques ont été réalisées au moyen du package informatique MEGA 6.0 [30]. Les séquences consensus obtenues pour les réplicas de PCR ont été alignées sur les génomes mitochondriaux de référence de *Crocuta crocuta*, *Vulpes vulpes*, *Canis lupus*, *Canis lupus familiaris*, *Cuon alpinus*, et *Martes martes*. Les alignements ont été effectués en utilisant les paramètres par défaut de ClustalW. Seules les séquences correspondant au fragment encadré par les amorces de PCR (46 à 48 pb

selon les espèces) ont été prises en compte pour les analyses phylogénétiques. Les relations phylogénétiques entre les séquences d'ADN ont été analysées par la méthode de *Maximum Likelihood* en considérant tous les sites du set de données (48 positions) et le modèle Kimura 2 avec des sites invariants. Pour estimer la validité des inférences phylogénétiques, nous avons utilisé la méthode de *bootstrap* en réalisant 2 000 simulations.

## 2 Résultats

Durant la campagne de fouilles, l'appareillage pour la préparation d'échantillon (*Microprep*) et l'amplification (*ALL*) de l'ADN était installé dans le gîte situé à 15 m de la Grotte Maldidier. Les instruments peuvent également être disposés en plein air pourvu qu'une source de courant soit disponible (Figure 4a). Ils sont suffisamment compacts pour être regroupés sur une seule table. La totalité de la chaine opératoire est réalisable sur une surface de 0,8 $m^2$.

Les Figures 4b-4d illustrent la méthode de préparation de l'échantillon au moyen de la plateforme *Microprep*. Une cartouche micro-fluidique est positionnée sur la plateforme, établissant ainsi automatiquement toutes les interfaces fluidiques, pneumatiques et mécaniques. L'échantillon en suspension est injecté dans l'un des compartiments de la carte micro-fluidique à usage unique (Figure 4b). Un broyage, destiné à favoriser l'élution de l'ADN à partir de la matrice de l'échantillon, est réalisé sous forte agitation en présence de billes de verre pendant trois cycles de 20 secondes (Figure 4c). L'ordinateur pilotant le système déclenche ensuite l'ouverture de micro-vannes et l'injection de tampon (Figure 4d) afin de récupérer l'échantillon dans un volume final de 80 µl. Le système a été conçu pour que l'échantillon ne soit jamais en contact avec l'appareil. Seuls les réactifs qui alimentent la cartouche passent par les réseaux de tubes faisant partie de l'instrument ; tous les éléments en contact avec l'échantillon (carte micro-fluidique, capillaire par lequel l'échantillon est collecté) sont à usage unique. Cette configuration permet d'éviter les contaminations entre deux tests successifs.

Les Figures 4e-4f montrent les éléments constitutifs de la plateforme *ALL* utilisée pour la détection de l'ADN au moyen de la PCR en temps réel. La PCR est réalisée sur une carte micro-fluidique (Figure 4e) à l'intérieur de laquelle des gouttelettes sont déplacées par électromouillage (Figure 4f). L'électromouillage utilise les propriétés de surfaces hydrophobes qui peuvent changer leur mouillabilité grâce à l'application d'une tension et se comporter alors comme des surfaces hydrophiles. Ainsi, en utilisant un réseau d'électrodes, il est possible de transférer des gouttelettes entre des électrodes adjacentes en enlevant la tension d'une électrode et en l'appliquant à la suivante. Cette technologie permet de distribuer, fusionner ou diviser des gouttelettes. La cartouche micro-fluidique est positionnée sur la plateforme *ALL*, remplie d'huile silicone stérile, et équipée de deux détecteurs de fluorescence qui permettent, si nécessaire, l'emploi simultané de deux sondes fonctionnant à des longueurs différentes (Figure 4g). Les échantillons (solutions d'ADN) et les réactifs sont déposés dans des puits séparés. Les gouttelettes d'échantillons et de réactifs sont mélangées sur la cartouche selon un protocole flexible (un échantillon analysé au moyen de plusieurs sondes ou plusieurs échantillons analysés au moyen de la même sonde). Chacune des gouttelettes (600 nl)

comportant le mélange échantillon-réactif se déplace en boucle sur la cartouche entre deux zones aux températures ajustées aux besoins de la PCR (95°C et 60°C). Après chaque boucle, la fluorescence de la goutte est mesurée et enregistrée. Les courbes de fluorescence en fonction du temps sont tracées et elles révèlent la présence ou l'absence de l'ADN d'une espèce dans l'échantillon selon qu'il y a ou non amplification.

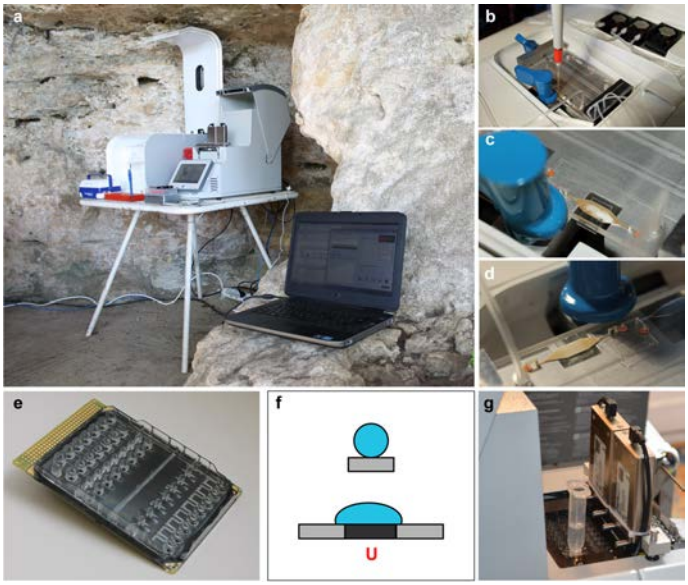



Figure 4 – Appareillage utilisé pour l'extraction et l'amplification d'ADN durant la campagne de fouilles. a : module *Microprep* (à gauche) utilisé pour l'extraction d'ADN, appareil *ALL* permettant l'amplification et la détection de l'ADN (centre), et ordinateur portable pilotant ces deux instruments ; b-d : injection, micro broyage de l'échantillon, et récupération de l'ADN dans l'appareil *Microprep* ; e : cartouche micro fluidique de l'appareil *ALL* comportant les puits où sont déposés l'ADN et les sondes pour les différents ADN recherchés ; f : manipulation d'une gouttelette sur la carte micro fluidique par électromouillage au moyen de l'application d'une tension (U) sur une surface hydrophobe ; g : la cartouche micro-fluidique positionnée dans l'appareil *ALL*, avec les deux détecteurs de fluorescence et le réservoir contenant l'huile utilisée pour éviter l'évaporation et permettre le déplacement des gouttelettes par électromouillage.

Les Figures 5a-5b montrent une expérience réalisée sur un coprolithe (MC10) fragmenté en plusieurs morceaux. À partir de l'un d'entre eux, quelques mg de poudre ont été obtenus au moyen d'un scalpel, et après traitement de l'échantillon sur *Microprep*, l'ADN a été introduit dans l'appareil *ALL* pour l'amplification par PCR et la détection en temps réel au moyen de sondes spécifiques. Lorsque le signal est constant durant les 45 cycles de PCR, cela signifie qu'il n'y a pas d'amplification, et donc que l'ADN recherché n'est pas présent. C'est le cas dans notre expérience pour les analyses réalisées sur l'échantillon au moyen des sondes *Vulpes vulpes* et *Canis lupus*, ainsi que pour le témoin négatif (blanc d'extraction) analysé avec la sonde *Crocuta crocuta*. En revanche, l'analyse de l'échantillon avec la sonde *Crocuta crocuta* permet d'observer une amplification d'ADN, qui devient détectable à partir de 33 cycles de PCR. Cette expérience démontre la présence d'ADN d'hyène des cavernes dans l'échantillon MC10.

La plateforme *ALL* d'analyse par PCR en temps réel fonctionne de façon suffisamment flexible pour analyser simultanément deux gouttelettes du même échantillon au moyen d'une même sonde, déposée dans deux puits de la cartouche. Cette approche a été utilisée pour l'analyse de l'échantillon MC11, qui correspond à un coprolithe découvert pendant une précédente campagne de fouilles et qui a été laissé en place sur le flanc de coupe (Figure 5c). La Figure 5d montre que lorsque l'échantillon MC11 est analysé au moyen des sondes *Vulpes vulpes* et *Canis lupus* les signaux d'amplification ne dépassent pas la ligne de base. En revanche, chacune des deux gouttelettes analysées au moyen de la sonde *Crocuta crocuta* met en évidence une amplification d'ADN. Ce résultat montre que la concentration d'ADN d'hyène des cavernes dans l'échantillon MC11 est suffisamment élevée pour que deux gouttelettes analysées indépendamment fournissent un résultat positif.

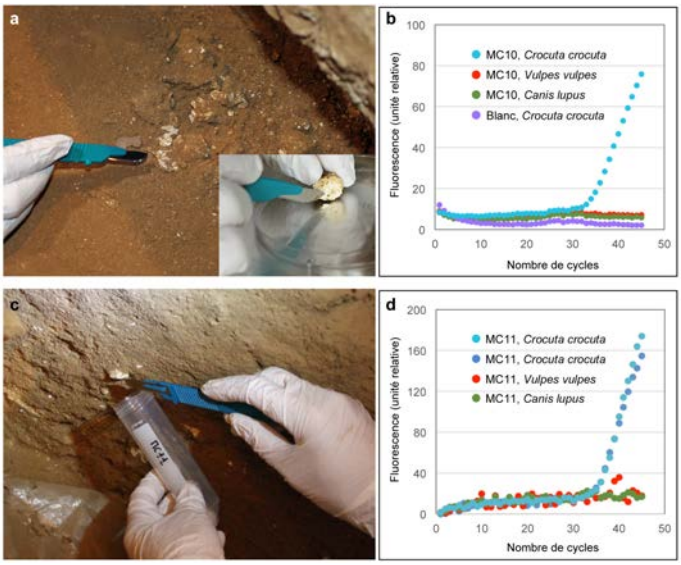



Figure 5 – Analyse de l'ADN des échantillons MC10 et MC11 pendant la campagne de fouilles. a : prélèvement de l'échantillon MC10, localisé à l'intérieur du sous-carré C'2B dans la zone de transition entre les unités stratigraphiques 2 et 3 ; quelques mg de poudre sont récupérés au moyen d'un scalpel à partir de l'intérieur du coprolithe pour l'extraction d'ADN (insert) ; b : amplification de l'ADN de l'échantillon MC10 et analyse en temps réel au moyen des sondes pour l'hyène des cavernes (*Crocuta crocuta*), le renard (*Vulpes vulpes*) et le loup (*Canis lupus*). Le blanc d'extraction (Blanc) est analysé au moyen la sonde *Crocuta crocuta* ; c : prélèvement de l'échantillon MC11 sur le flanc de coupe du sous-carré A'2D dans l'unité stratigraphique 3 ; d : amplification de l'ADN de l'échantillon MC11 et analyse en temps réel au moyen des sondes *Crocuta crocuta* (deux réplicas), *Vulpes vulpes* et *Canis lupus*.

Le protocole de fouilles mis en place à Maldidier implique une récupération de tout le matériel excavé, avec un tamisage des objets de petite dimension non identifiés *in situ*. Le matériel insoluble dans l'eau retenu sur une maille de 1,6 mm (refus de tamis) est récupéré, et trié sous loupe binoculaire. Dans les refus de tamis, une partie du matériel régulièrement retrouvé est considéré correspondre à des fragments de coprolithes. Si cette interprétation est exacte, de l'ADN doit pouvoir être détecté au moyen de la PCR en temps réel dans les refus de tamis.

La Figure 6a montre les refus de tamis assimilés à des coprolithes récupérés en réalisant un décapage de 2 cm de hauteur sur une surface de 0,25 $m^2$. Un des fragments issu de ce décapage (MRT20) a été sélectionné, puis de la poudre issue de l'intérieur de ce fragment a été récupérée au moyen d'un scalpel (Figure 6b-6c). L'analyse par PCR en temps réel sur notre plateforme mobile montre qu'une amplification d'ADN est détectée au moyen de la sonde *Crocuta crocuta*, mais pas avec les sondes *Vulpes vulpes* et *Canis lupus*. Ce résultat indique la présence d'ADN d'hyène des cavernes dans le refus de tamis.

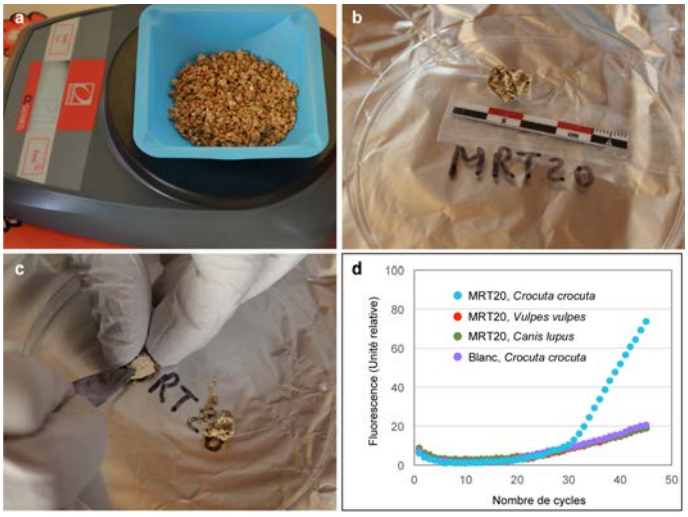



Figure 6 – Analyse d'un échantillon de refus de tamis. a : vue d'ensemble des fragments de coprolithes (total : 12 g) récupérés sur tamis de 1,6 mm à partir d'un décapage de deux cm de hauteur du sous-carré de fouilles H2C dans la zone de transition entre les unités stratigraphiques 2 et 3 ; b-c : photographie et préparation de l'échantillon (MRT20) sélectionné pour l'extraction d'ADN ; d : amplification de l'ADN et analyse en temps réel au moyen des sondes pour l'hyène des cavernes (*Crocuta crocuta*), le renard (*Vulpes vulpes*) et le loup (*Canis lupus*). Le blanc d'extraction (Blanc) est analysé au moyen la sonde *Crocuta crocuta*.

Afin de compléter les études de terrain, des expériences ont été effectuées au laboratoire après la campagne de fouilles. Ces expériences avaient pour objectif de confirmer, par séquençage de l'ADN, que les coprolithes peuvent être attribués à l'hyène des cavernes plutôt qu'à un autre carnivore. L'ADN des échantillons MC10 et MRT20 a donc été amplifié au moyen d'amorces suffisamment conservées pour fonctionner sur le génome mitochondrial de plusieurs espèces de carnivores, dont l'hyène, le renard et le loup (voir Matériel et méthodes). Ces amorces ciblent un fragment de la région de contrôle du génome mitochondrial dont la taille est de 88 à 90 paires de bases selon l'espèce. Des amplifications ont été réussies à partir des échantillons MC10 et MRT20. Un échantillon de sol collecté à proximité de MC10 n'a pas permis d'amplification d'ADN, indiquant qu'il n'y a pas de dissémination décelable de l'ADN dans le sol. Les fragments d'ADN amplifiés à partir des échantillons MC10 et MRT20 ont été séquencés, et une séquence consensus a été déduite pour chaque échantillon à partir

des données issues de trois à six amplifications. Les séquences consensus des deux échantillons étaient identiques.

Les séquences d'ADN obtenues pour les échantillons MC10 et MRT20 ont été comparées aux séquences de référence de plusieurs espèces de carnivore, et un arbre phylogénétique a été construit (Figure 7). Les séquences des deux échantillons de Maldidier appartiennent au même clade que la séquence de référence de *Crocuta crocuta*, dont elles ne diffèrent que par une substitution. Les autres séquences de carnivores occupent des positions notablement différentes dans l'arbre. Ces analyses confirment la présence d'ADN d'hyène des cavernes dans les coprolithes, et valident donc les résultats obtenus sur le terrain.

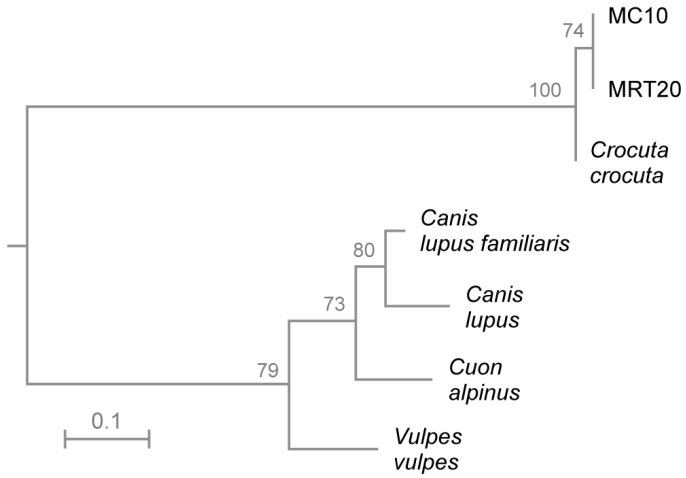



Figure 7 – Analyse phylogénétique des séquences mitochondriales. L'analyse, effectuée au moyen de la méthode *Maximum-likelihood*, porte sur un fragment de la région de contrôle du génome mitochondrial de taille et de séquence différentes chez les carnivores. Les séquences obtenues pour les échantillons MC10 et MRT20 de la grotte Maldidier ont été comparées à celles des génomes de références des cinq espèces indiquées, en utilisant la martre (*Martes martes*) pour enraciner l'arbre. L'échelle indique la distance génétique. Les nombres sur les branches correspondent au pourcentage d'arbres présentant la topologie indiquée après 2 000 simulations effectuées avec la méthode *bootstrap*.

## 3 Discussion

L'analyse d'ADN sur le terrain a été initiée il y a une vingtaine d'années [31] et a reçu une attention accrue durant la crise de l'anthrax de l'année 2001 [32]. Outre le bioterrorisme, les domaines d'application des analyses de terrain sont nombreux, incluant le diagnostic médical, la détection de pathogènes d'animaux ou de plantes et, comme nous le montrons ici, l'archéologie.

Pour cette étude, nous avons utilisé des plateformes basées sur la technologie microfluidique pour effectuer des analyses d'ADN pendant une campagne de fouilles archéologiques. L'appareillage que nous avons employé comporte une plateforme pour la préparation de l'échantillon (*Microprep*) et une plateforme (*ALL*) de PCR en temps réel [14-17, 28]. Le module *Microprep* est un système polyvalent conçu pour le traitement

automatisé d'une grande variété d'échantillons. Différentes fonctionnalités peuvent être associées, comme le chauffage, l'actionnement magnétique de billes, la filtration ou la lyse de cellules, et des cartouches dédiées à usage unique ont été mises au point pour la préparation d'échantillons contenant des agents pathogènes, des macromolécules (ADN, ARN, protéines), ou l'extraction de biomarqueurs. Ici, nous avons utilisé une cartouche micro-fluidique qui permet la dissociation de l'échantillon en réalisant un broyage au moyen de microbilles de verre. Ce procédé mécanique s'est avéré suffisant pour obtenir de l'ADN amplifiable. Il permet d'éviter l'utilisation de composés toxiques (agents chaotropes) généralement employés en laboratoire pour les extractions d'ADN et qui ne peuvent être apportés sans risque sur un chantier de fouilles.

La plateforme *ALL* permet des analyses multiplex au moyen de la PCR en temps réel. La PCR en temps réel présente trois atouts essentiels pour des analyses sur le terrain : rapidité, sensibilité, et absence de manipulation des ADN amplifiés, ce qui évite de disséminer ceux-ci dans l'environnement. L'analyse des témoins négatifs (tampon d'extraction sans ajout de matériel archéologique) n'a jamais révélé de signal d'amplification de l'ADN, indiquant que notre approche permet de travailler sans contamination. Durant la campagne de fouilles, les plateformes *Microprep* et *ALL* étaient installés dans le gite situé à 20 m de la grotte. Le temps requis pour une expérience complète, du prélèvement de l'échantillon dans la grotte aux résultats de PCR en temps réel, était de trois heures.

Les fouilles réalisées préalablement dans la grotte Maldidier avaient livré du matériel résultant d'une action anthropique, des restes de loup (*Canis lupus*) et de renard (*Vulpes vulpes*) [18-19]. Les fouilles initiées il y a quatre ans ont fourni de nouveaux échantillons pour ces trois types de restes et démontré qu'ils se sont accumulé dans l'unité stratigraphique 2 sur une période couvrant sept millénaires, de l'Aurignacien (- 34 000 ans calBP) au Gravettien (- 27 000 ans calBP). Grâce aux analyses que nous avons réalisées dans la zone de transition entre les unités stratigraphiques 2 et 3 et dans l'unité stratigraphique 3, nous montrons pour la première fois la fréquentation de la grotte par l'hyène des cavernes (*Crocuta crocuta*). Ceci soulève des questions intéressantes sur la chronologie des occupations humaines et animales du site et souligne l'intérêt de la poursuite des fouilles. Il serait par ailleurs judicieux de rechercher la présence d'ADN d'hyène des cavernes dans des coprolithes précédemment retrouvés dans l'unité stratigraphique 2. Cette unité comporte des restes de l'Aurignacien final et du Gravettien, c'est-à-dire la période au cours de laquelle l'hyène des cavernes devient rare en Europe, voire même disparaît [33].

## Conclusion et perspectives

Les essais réalisés pendant une campagne de fouilles à la grotte Maldidier montrent, pour la première fois, la possibilité d'analyser l'ADN d'échantillons archéologiques directement en sortie de grotte. Ceci ouvre un nouveau champ d'application à l'analyse de l'ADN ancien, qui pourrait à l'avenir être systématiquement associée aux opérations de fouilles.

Il convient de noter que notre approche n'est applicable qu'à des espèces connues, et pour lesquelles on dispose déjà d'une information, même partielle, sur la séquence

du génome mitochondrial. En l'absence d'une telle information, il n'est pas possible de mettre au point un essai *TaqMan* (amorces et sonde), qui doit lui-même être validé en laboratoire sur des échantillons de référence, préalablement aux analyses sur le terrain. Ces réserves faites, comme les bases de données publiques comportent aujourd'hui la séquence du génome mitochondrial de plusieurs milliers d'espèces animales (https ://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/), dont plusieurs dizaines d'espèces éteintes, une diversité d'essais à façon peuvent être conçus pour appliquer à de nombreuses espèces l'approche présentée ici.

L'appareillage que nous avons utilisé permet d'analyser un échantillon dans les trois heures qui suivent son prélèvement. On voit donc que la caractérisation de l'ADN peut être intégrée au processus de fouilles comme aide à l'interprétation du site et pour le tri du matériel excavé quotidiennement. La détection d'ADN d'hyène des cavernes est de ce point de vue illustrative des potentialités de notre méthode, car la fréquentation de la cavité par l'hyène était au départ peu prise en considération, et les fragments de coprolithes étaient par défaut attribués au loup. Il apparaît ainsi important de prendre en compte les analyses d'ADN pour faire un inventaire complet des indices de fréquentation par les carnivores. L'équipement utilisé pendant cette campagne de fouilles se composait de deux instruments, un pour l'extraction (*Microprep*), et un pour l'amplification-détection de l'ADN (*ALL*), qui nécessitent d'être raccordés à une source de courant. Pour rendre notre équipement plus facilement opérationnel, il conviendrait de pouvoir le faire fonctionner sur batterie et de le rendre plus compact. Les développements en cours au CEA Grenoble / LETI visent à intégrer les deux instruments en un seul, avec automatisation des tâches sans intervention humaine pour enchainer les opérations d'extraction et d'amplification de l'ADN. Ceci permettra de disposer d'un appareil plus aisément transportable, de réduire le temps dédié à l'expérimentation et ainsi d'analyser davantage d'échantillons.

## Remerciements

L'autorisation de réaliser les fouilles, collecter et analyser les échantillons de la grotte Maldidier a été fournie par le Direction régionale des affaires culturelles (DRAC) d'Aquitaine (autorisation 2014-33). Nous remercions le plateau « Technique » du MNHN, site du musée de l'Homme (plateau « Paléogénomique et génétique moléculaire », musée de l'Homme) et le Service de systématique moléculaire du MNHN (UMS 2700 OMSI CNRS-MNHN), où les expériences préalables et postérieures aux analyses de terrain ont été réalisées. Nous remercions également M. Daniel Dalet de nous avoir communiqué gracieusement le fond de carte (http ://d-maps.com/carte.php ?num_car=2224&lang=fr) utilisé pour la Figure 1a.

## Références

[1] J. Vouvé, F. Vouvé, J. Brunet, P. Malaurent, Apport de l'analyse colorimétrique à propos de la carcatérisation in situ des peintures préhistoriques dans une démarche conservatoire : cas de la grotte Chauvet (Ardèche, France). Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Sciences de la Terre et des Planètes. 331, 627-632, 2000.

[2] J. De Sanoit, D. Chambellan, F. Plassard, Caractérisation *in situ* du pigment noir de quelques œuvres pariétales de la Grotte de Rouffignac à l'aide d'un système portable d'analyse par fluorescence X (XRF). Archeosciences. 29, 61-68, 2005.

[3] L. Beck, H. Rousselière, J. Castaing, A. Duran, M. Lebon, S. Lahlil, F. Plassard, Analyse in situ des dessins préhistoriques de la grotte de Rouffignac par fluorescence X et diffraction X portable. Archeosciences. 36, 139-161, 2012.

[4] L. Beck, D. Genty, S. Lahlil, M. Lebon, F. Tereygeol, C. Vignaud, I. Reiche, E. Lambert, H. Valladas, E. Kaltnecker, F. Plassard, M. Menu, P. Paillet, Non-destructive portable analytical techniques for carbon *in situ* screening before sampling for dating prehistoric rock paintings. Radiocarbon. 55, 436-444, 2013.

[5] A. Tournié, L.C. Prinsloo, C. Paris, P. Colomban, B. Smith, The first *in situ* Raman spectroscopic study of San rock art in South Africa : procedures and preliminary results. Journal of Raman spectroscopy. 42, 399-406, 2011.

[6] M. Pruvost, R. Schwarz, V. B. Correia, S. Champlot, S. Braguier, N. Morel, Y. Fernandez-Jalvo, T. Grange, E.-M. Geigl, Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 104, 739-744, 2007.

[7] F. Ahmad, S. A. Hashsham, Miniaturized nucleic acid amplification systems for rapid and point-of-care diagnostics : a review. Analytica Chimica Acta. 733, 1-15, 2012.

[8] J. Y. Yoon, B. Kim, Lab-on-a-chip pathogen sensors for food safety. Sensors (Basel). 12, 10713-10741, 2012.

[9] A. S. Nezhad, Future of portable devices for plant pathogen diagnosis. Lab on a Chip. 14, 2887-28904, 2014.

[10] J. Wu, R. Kodzius, W. Cao, W. Wen, Extraction, amplification and detection of DNA in microfluidic chip-based assays. Microchimica Acta. 181, 1611-1631, 2014.

[11] E. Samiei, M. Tabrizian, M. Hoorfar, A review of digital microfluidics as portable platforms for lab-on a-chip applications. Lab on a Chip. 16, 2376-2396, 2016.

[12] S. Pääbo, H. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Despres, J. Hebler, N. Rohland, M. Kuch, J. Krause, L. Vigilant, M. Hofreiter, Genetic analyses from ancient DNA. Annual Review of Genetics. 38, 645-679, 2004.

[13] E. Willerslev, A. Cooper, Ancient DNA. Proceedings of the Royal Society of London for Biological Sciences. 272, 3-16, 2005.

[14] Y. Fouillet, D. Jary, C. Chabrol, P. Claustre, C. Peponnet, Digital microfluidic design and optimization of classic and new fluidic functions for lab on a chip systems. Microfluidics and Nanofluidics. 4, 159-165, 2008.

[15] C. Delattre, C.P. Allier, Y. Fouillet, D. Jary, F. Bottausci, D. Bouvier, G. Delapierre, M. Quinaud, A. Rival, L. Davoust, C. Peponnet, Macro to microfluidics system for biological environmental monitoring. Biosensors and Bioelectronics. 36, 230-235, 2012.

[16] A. Rival, D. Jary, C. Delattre, Y. Fouillet, G. Castellan, A. Bellemin-Comte, X. Gidrol, An EWOD-based microfluidic chip for single-cell isolation, mRNA purification and subsequent multiplex qPCR. Lab on a Chip. 14, 3739-3749, 2014.

[17] R. Den Dulk, A.-G. Bourdat, M. Flaender, C. Echampard, P. Viargues, J. Ventosa, F. Boizot, A. Rival, C. Delattre, G. Delapierre, Automated analytical system for sensitive detection of bacterial spores. Proc. CBW Symposium Stockholm Sweden, p.122, 2016 (www.foi.se/Global/Abstractbook%202016.pdf).

[18] J.-P. Rigaud, « Le Paléolithique en Périgord : les données du sud-ouest sarladais et leurs implications », thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux, 497 pages, 1982.

[19] J.-C. Castel, A. Lenoble, M. O'Farrell, « Grotte Maldidier (La Roque-Gageac, Dordogne) » dans Bilan scientifique 2004 SRA Aquitaine, ed. Ministère de la Culture et de la Communication, Direction Régionale des Affaires Culturelles de la Région Aquitaine, Bordeaux, p. 53, 2004.

[20] M. Boudadi-Maligne, « Les *Canis* pléistocènes du Sud de la France : approche biosystématique, évolutive et biochronologique », thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux 1, 451 pages, 2010.

[21] A. Lenoble, A. Queffelec, « Géoarchéologie » dans Grotte Maldidier (La Roque-Gageac, Dordogne), ed. Ministère de la Culture et de la Communication, sous-direction de l'Archéologie, DRAC Aquitaine SRA, Bordeaux, p. 30-42, 2013.

[22] C. Bon, V. Berthonaud, F. Maksud, K. Labadie, J. Poulain, F. Artigunave, P. Wincker, J.-M. Aury, J.-M. Elalouf, Coprolites as a source of information on the genome and diet of the cave hyena. Proceedings of the Royal Society of London for Biological Sciences. 279, 2825-2830, 2012.

[23] P. Palacio, V. Berthonaud, C. Guérin, J. Lambourdière, F. Maksud, M. Philippe, D. Plaire, T. Stafford, M.-C. Marsolier-Kergoat, J.-M. Elalouf, Genome data on the extinct *Bison schoetensacki* establish it as a sister species of the extant European bison (*Bison bonasus*). BMC Evolutionary Biology. 17, 48, 2017.

[24] M. Chame, Terrestrial mammal feces : a morphometric summary and description. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 98, 71-94, 2003.

[25] M. Sanz, J. Daura, N. Égüez, J.-P. Brugal, Not only hyenids : A multi-scale analysis of Upper Pleistocene carnivore coprolites in Cova del Coll Verdaguer (NE Iberian Peninsula). Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology. 443, 249-262, 2016.

[26] P. Fosse, Le rôle de l'hyène dans la formation des associations osseuses : 150 ans de controverses. L'apport des anciens textes de préhistoire et de paléontologie du Quaternaire aux études taphonomiques actuelles. Paléo. 7, 49-84, 1995.

[27] I. V. Kutyavin, I. A. Afonina, A. Mills, V. V. Gorn, E. A. Lukhtanov, E. S. Belousov, M. J. Singer, D. K. Walburger, S. G. Lokhov, A. A. Gall, R. Dempcy, M. W. Reed, R. B. Meyer, J. Hedgpeth, 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. Nucleic Acids Research. 28, 655-661, 2000.

[28] R. Den Dulk, A.-G. Bourdat, D. Jary, Y. Diakite, X. Gidrol, G. Delapierre, FlowPad, a generic microfluidics platform for automated sample preparation and qPCR detection, Proc. First International Conference CRBN-Research and Innovation, Antibes-Juan-les-Pins, France, p. 126, 2015.

[29] Z. Hua, J. L. Rouse, A. E. Eckhardt, V. Srinivasan, V. K. Pamula, W. A. Schell, J. L. Benton, T. G. Mitchell, M. G. Pollack, Multiplexed real-time polymerase chain reaction on a digital microfluidic platform. Analytical Chemistry. 82, 2310-2316, 2010.

[30] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar, MEGA6 : Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 30, 2725-2729, 2013.

[31] P. Belgrader, J. K. Smith, V. W. Weedn, M. A. Northrup, Rapid PCR for identity testing using a battery-powered miniature thermal cycler. Journal of Forensic Sciences. 43, 315–319, 1998.

[32] J. A. Higgins, M. Cooper, L. Schroeder-Tucker, S. Black, D. Miller, J. S. Karns, E. Manthey, R. Breeze, M. L. Perdue ML, A field investigation of Bacillus anthracis contamination of U.S. Department of Agriculture and other Washington, D.C., buildings during the anthrax attack of October 2001. Applied and Environmental Microbiology. 69, 593-599, 2003.

[33] A. J. Stuart, A. M. Lister, New radiocarbon evidence on the extirpation of the spotted hyaena (Crocuta crocuta (Erxl.)) in northern Eurasia. Quaternary Science Reviews. 96, 108-116, 2014.