



HAL
open science

Étude génétique de la diversité et de l'alimentation de l'hyène des cavernes à partir de coprolithes de six sites du sud de la France

Jean-Marc Elalouf, Veronique Berthonaud, Bernard Gely, Anne-Sophie Lartigot-Campin, Marie-Claude Marsolier, Anne-Marie Moigne, Marie-Hélène Moncel, Pauline Palacio, Delphine Plaire, Thibaud Saos, et al.

► To cite this version:

Jean-Marc Elalouf, Veronique Berthonaud, Bernard Gely, Anne-Sophie Lartigot-Campin, Marie-Claude Marsolier, et al.. Étude génétique de la diversité et de l'alimentation de l'hyène des cavernes à partir de coprolithes de six sites du sud de la France. Quaternaire, 2021, 32 (2), pp.153-171. 10.4000/quaternaire.15822 . hal-03419642

HAL Id: hal-03419642

<https://hal.science/hal-03419642>

Submitted on 8 Nov 2021

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

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

Copyright

1 **Étude génétique de la diversité et de l'alimentation de l'hyène des cavernes à partir**
2 **de coprolithes de six sites du sud de la France**

3

4 *A genetic survey for cave hyena diversity and food consumption. Insight from DNA*
5 *analysis of coprolites from six cave sites in the south of France*

6

7 Jean-Marc ELALOUF^{1,2}, Véronique BERTHONAUD¹, Bernard GÉLY³, Anne-Sophie
8 LARTIGOT-CAMPIN⁴, Marie-Claude MARSOLIER^{1,2}, Anne-Marie MOIGNE^{4,5}, Marie-
9 Hélène MONCEL⁵, Pauline PALACIO¹, Delphine PLAIRE^{1,2}, Thibaud SAOS⁴, Thomas W.
10 STAFFORD, Jr.⁶, et Agnès TESTU⁴

11

12 ¹ Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Institut des sciences du vivant Frédéric
13 Joliot, CNRS UMR 9198, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France. *Courriels* :
14 jean-marc.elalouf@cea.fr, veronique.berthonaud@cea.fr, mcmk@cea.fr,
15 p_palacio@msn.com, delphine.plaire@gmail.com.

16 ² Unité Eco-anthropologie, Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS UMR 7206,
17 Université de Paris, 17 place du Trocadéro 75016 Paris, France.

18 ³ Service régional de l'archéologie, DRAC Rhône-Alpes, 69283 Lyon, France. *Courriel* :
19 bernard.gely@culture.gouv.fr.

20 ⁴ Unité Histoire Naturelle de l'Homme Préhistorique (HNHP), Muséum national d'Histoire
21 naturelle, CNRS, Université de Perpignan Via Domitia, Centre Européen de Recherches
22 Préhistoriques de Tautavel, 1 avenue Léon-Jean Grégory, 66720 Tautavel, France.
23 *Courriels* : asl@cerptautavel.com, anne-marie.moigne@cerptautavel.com,
24 thibaud.saos@cerptautavel.com, agnes.testu@cerptautavel.com.

25 ⁵ Unité Histoire Naturelle de l'Homme Préhistorique (HNHP), Département Homme et
26 Environnement, Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS UMR 7194, Musée de
27 l'Homme, 17 place du Trocadéro, 75016 Paris, France. *Courriel* : [marie-
28 helene.moncel@mnhn.fr](mailto:marie-helene.moncel@mnhn.fr).

29 ⁶ Stafford Research, 200 Acadia Avenue, Lafayette, Colorado 80026-1845 USA. *Courriel* :
30 twstafford@stafford-research.com.

31

32 **RÉSUMÉ**

33 Afin d'obtenir des informations sur la diversité génétique et l'alimentation de l'hyène des
34 cavernes, nous avons analysé l'ADN de coprolithes de six sites du sud de la France. Les sites
35 correspondent à quatre grottes ardéchoises (Grotte-aux-Ours de Châteaubourg, Baume
36 Néron et Trou-du-Renard de Soyons, Le Figuier) et deux grottes de l'Aude (Tournal, La
37 Crouzade). Pour huit coprolithes de ces six sites, nous avons réalisé un séquençage global
38 massif qui a livré à partir de chaque échantillon des lectures pour 60 à 250 millions de
39 fragments d'ADN. La recherche de fragments du génome mitochondrial de 35 espèces
40 animales, dont l'Homme, montre que l'ADN le plus abondant est systématiquement celui de
41 l'hyène, ce qui valide l'identification des échantillons comme coprolithes d'hyène des
42 cavernes. L'ADN d'autres grands mammifères détecté dans les coprolithes indique la
43 consommation par l'hyène de différents grands animaux dont le cheval et le bison (Néron),
44 l'ours des cavernes (Trou-du-Renard), le renne (Tournal) et le rhinocéros laineux (Le
45 Figuier). Les raisons pour lesquelles les autres coprolithes ne livrent pas d'information sur
46 l'alimentation de l'hyène sont discutées. L'analyse phylogénétique des séquences des
47 génomes mitochondriaux d'hyène reconstruits à partir de l'ADN des coprolithes révèle la
48 présence (Néron) d'un spécimen de l'haplogroupe B, détecté pour la première fois en France,
49 alors que les autres spécimens appartiennent à l'haplogroupe A. La détermination de l'âge
50 de trois coprolithes par la méthode du radiocarbone les situe à l'Aurignacien (Châteaubourg,
51 39 670-38 000 cal. BP) ou au Gravettien (site de Soyons : Néron, 30 890-30180 cal. BP ;
52 Trou-du-Renard, 25 800-25 290 cal. BP) suggérant, pour le site de Soyons, le possible
53 remplacement durant le Gravettien de l'haplogroupe B par l'haplogroupe A. Nous montrons
54 que l'haplogroupe A, constitué de génomes mitochondriaux d'hyènes des cavernes et
55 d'hyènes tachetées actuelles, a une structuration plus complexe que celle envisagée
56 précédemment. L'analyse des génomes nucléaires d'hyènes des cavernes et d'hyènes

57 actuelles tachetées révèle une phylogénie différente de celle fournie par les génomes
58 mitochondriaux. Les génomes nucléaires d'hyènes tachetées actuelles et d'hyènes des
59 cavernes sont en effet répartis dans deux clades monophylétiques et, à l'intérieur du clade
60 des hyènes des cavernes, le faible support pour le regroupement des spécimens en fonction
61 de leur haplogroupe mitochondrial résulte probablement de flux géniques entre ces différents
62 groupes et de tris de lignées incomplets.

63

64 **ABSTRACT**

65 To gain information on the diet and genetic diversity of the cave hyena, we performed DNA
66 analyses on coprolites from six cave sites in southern France, including four caves from
67 Ardèche (Châteaubourg, Grotte-aux-Ours cave; Soyons, Néron and Trou-du-Renard caves;
68 Le Figuier) and two caves from Aude (Tournal, La Cruzade). Eight coprolites from these
69 six sites were analysed using high-throughput shotgun DNA sequencing, with 60 to 250
70 million DNA reads being obtained for each sample. Mining the dataset for mitochondrial
71 DNA reads for 35 animal species, including human, we found that hyena DNA was the most
72 abundant one in all samples, hence validating the opinion that they correspond to cave hyena
73 coprolites. Mitochondrial DNA reads for other species strongly suggest the presence of
74 several large animals in the cave hyena diet, including the horse and the bison (Néron), the
75 extinct cave bear (Trou-du-Renard), the reindeer (Tournal) and the woolly rhinoceros (Le
76 Figuier). The reasons why the diet could not be identified from the other coprolites are
77 discussed. Phylogenetic analysis of the hyena mitochondrial genomes sequences
78 reconstructed from DNA reads discloses the presence at Néron of a specimen of haplogroup
79 B, which has not been recorded previously in France. All other coprolites display
80 mitochondrial genomes belonging to haplogroup A. AMS radiocarbon dating analysis of
81 three coprolites yielded ages dating back to the Aurignacian (Châteaubourg, 39,670-38,000

82 cal. BP) or the Gravettian ages (Soyons : Néron, 30,890-30,180 cal. BP ; Trou-du-Renard,
83 25,800-25,290 cal. BP), indicating the possible replacement of mitochondrial haplogroup B
84 by haplogroup A in Soyons. The mitochondrial haplogroup A was shown previously to
85 include both extinct cave hyena and extant spotted hyena specimens. With a large number
86 of new cave hyena mitochondrial genomes sequences for haplogroup A, our studies show
87 that ancient and extant hyenas are more intermingled than previously suspected in this
88 haplogroup. Analysis of nuclear genome data revealed phylogenetic relationships between
89 cave and extant spotted hyenas different than those conveyed by mitochondrial genomes.
90 Specifically, the nuclear genomes of extinct and extant hyenas robustly delineate distinct
91 monophyletic clades. In the cave hyena clade, the poor support to the grouping of the
92 specimens according to their mitochondrial haplogroups likely reflects the effects of both
93 incomplete lineage sorting and gene flow.

94

95 Mots-clés : ADN ancien ; *Crocota crocuta* ; *Crocota spelaea* ; Paléogénomique ;
96 Pléistocène.

97 Keywords : ancient DNA ; *Crocota crocuta* ; *Crocota spelaea* ; Paleogenomics ;
98 Pleistocene.

99

100 1 - INTRODUCTION

101

102 Depuis leur apparition au 19^{ème} siècle dans la littérature scientifique (Buckland, 1829) et
103 romanesque (Flaubert, 1881) les coprolithes, du grec *kopros* (excrément) et *lithos* (pierre),
104 ont attiré l'attention de différentes communautés de chercheurs. Fournissant des
105 informations sur une espèce animale et son environnement (Reinhard et Bryant, 1992), ils
106 sont pris en considération par des disciplines aussi diverses que la palynologie (Martin et
107 Sharrock, 1964 ; Argant, 1990), la parasitologie (Araujo *et al.*, 1982), l'archéozoologie
108 (Backwell *et al.*, 2009), la taphonomie (Pesquero *et al.*, 2011), la génétique (Poinar *et al.*,
109 1998) et la génomique (Bon *et al.*, 2012). Leur formation et leur préservation sont liées au
110 régime alimentaire de l'animal. Ainsi, la forte teneur en calcium et en phosphate permettant
111 la fossilisation est obtenue en particulier chez les carnivores qui consomment les os de leurs
112 proies (Kruuk, 1976 ; Larkin *et al.*, 2000). Par conséquent, dans les sites européens du
113 Pléistocène moyen et supérieur, il n'est pas surprenant que la plupart des coprolithes
114 retrouvés soient attribués à l'hyène des cavernes, broyeur d'os familial de l'espace souterrain
115 (Fosse, 1995 ; Sanz *et al.*, 2016).

116

117 Bien que son statut taxonomique puisse être discuté, l'hyène des cavernes est assimilée à
118 l'hyène tachetée africaine actuelle *Crocuta crocuta*, espèce très plastique
119 morphologiquement. L'hyène des cavernes n'en serait qu'une variante chrono-géographique
120 (Kurtén, 1957 ; Turner, 1984 ; Werdelin et Solounias, 1991), souvent élevée au rang de sous-
121 espèce (*Crocuta crocuta spelaea*). *Crocuta crocuta* est connue dans le registre fossile
122 européen depuis le début du Pléistocène moyen, en Espagne à Atapuerca TD6 (García et
123 Arsuaga, 2001) et en Italie à Casal Selce (Sardella et Petrucci, 2012). Différentes sous-
124 espèces ont été décrites au cours de cette période sur la base de critères morphologiques ou

125 métriques. Du point de vue génétique, la notion de sous-espèce est peu solide. L'analyse de
126 l'ADN mitochondrial de spécimens actuels d'hyène tachetée et de fossiles d'hyène des
127 cavernes ne permet pas de les assigner à des espèces distinctes (Westbury *et al.*, 2020). Les
128 données sur l'ADN nucléaire des mêmes spécimens montrent une séparation des lignées,
129 suivie d'un échange bidirectionnel de matériel génétique (Westbury *et al.*, 2020). Par souci
130 de parcimonie, comme il n'y a pas en principe entre espèces distinctes de flux de matériel
131 génétique transmis à la descendance, nous désignons ici l'hyène des cavernes sous le nom
132 de *Crocota crocuta*.

133

134 La morphologie des coprolithes d'hyène des cavernes laisse peu de doute sur leur
135 identification (Sanz *et al.*, 2016). Des travaux antérieurs ont montré la bonne préservation
136 de l'ADN dans les coprolithes d'hyène des cavernes (Bon *et al.*, 2012). L'analyse globale
137 par séquençage massif (Bon *et al.*, 2012 ; Palacio *et al.*, 2017), ainsi que l'analyse ciblée au
138 moyen de tests de PCR spécifiques (Utge *et al.*, 2020) ont permis de mettre en évidence dans
139 les coprolithes l'ADN de l'hyène et des espèces qu'elle a consommées. Dans cette étude
140 nous avons étoffé le corpus de données génétiques disponibles pour les coprolithes d'hyènes
141 en analysant des échantillons de six sites du sud de la France (fig. 1). Les sites, où sont
142 documentées des fréquentations humaines et animales durant le Pléistocène, sont présentés
143 ci-dessous, du Nord au Sud.

144

145 **2 - PRÉSENTATION DES SITES**

146

147 **2.1 - GROTTÉ-AUX-OURS (CHATEAUBOURG, ARDÈCHE)**

148

149 Située dans le canyon de la Goule en rive droite du Rhône, la grotte (fig. 2a) a été découverte
150 en 1860 lors de l'ouverture d'une carrière. C'était à l'origine une grotte constituée de hautes
151 salles jouxtant de petites galeries qui s'inclinaient au gré des strates ; elle s'ouvrait à 150 m
152 d'altitude. Malgré quelques fouilles en 1871 et dans les années 1930, la quasi-totalité du
153 remplissage karstique de la grotte a malheureusement été perdu. La découverte en 1995
154 d'une poche d'argile et de sable très fossilifère entraîne des fouilles de sauvetage menées en
155 urgence. Des restes osseux de *Ursus spelaeus*, *Crocota spelaea*, *Panthera (Leo) spelaea*,
156 *Panthera pardus* et *Canis lupus* sont trouvés (Pautret-Homerville *et al.*, 2011). Les couches
157 B1 et B2 sont les plus riches et contiennent des coprolithes. Les ossements de très jeunes
158 hyènes, les os de proies rongés ou régurgités ainsi que les coprolithes retrouvés dans la grotte
159 permettent d'affirmer que celle-ci a servi de repaire à l'hyène des cavernes. Lors des fouilles
160 de sauvetage, des outils en silex ont également été trouvés. Peu nombreux, ce sont des éclats
161 Levallois et des lames en silex barrémo-bédoulien locaux. Ils sont attribuables au
162 Paléolithique moyen et leur faible abondance suggère des intrusions ponctuelles de
163 Néandertal dans un repaire de carnivores. Peu après les fouilles, la grotte a été détruite par
164 l'avancée de la carrière (Pautret-Homerville *et al.*, 2011).

165

166 2.2 - BAUME NÉRON ET LE TROU-DU-RENARD (SOYONS, ARDÈCHE)

167

168 Situé sur la face est du massif du Guercy, le réseau complexe de grottes formant le site de
169 Soyons a été découvert par le Vicomte Lepic et J. de Lubac en 1870. Il y a actuellement sept
170 grottes connues : la Baume Néron, la Grotte des Enfants, l'Abri Moula, la Grotte de la
171 Madeleine, le Trou-du-Renard, le Trou-du-Mouton et le Trou-Roland. Les deux grottes d'où
172 proviennent nos échantillons sont la Baume Néron et le Trou-du-Renard.

173

174 La Baume Néron (fig. 2b) est constituée d'une vaste salle de trente mètres de long sur dix
175 de large. C'est la plus grande des cavités du site archéologique de Soyons. Les fouilles
176 menées par le Vicomte Lépici et J. de Lubac dans les années qui suivirent la découverte ont
177 permis de mettre au jour un gisement moustérien important. Les fouilles réalisées dans les
178 années 1950 révèlent trois phases moustériennes dont la plus ancienne est encadrée par deux
179 « charniers » (Veyrier *et al.*, 1951). Celui qui est sus-jacent à la plus ancienne occupation
180 moustérienne se serait formé lorsque les Néandertaliens ont abandonné la grotte et qu'elle a
181 servi de refuge à des carnivores. Les deux charniers, formés de nombreux restes osseux, ne
182 présentent pas la même composition. Le plus récent, au-dessus du niveau moustérien, est
183 riche en coprolithes et ossements de carnivores (loup, ours et hyène des cavernes) alors que
184 le second, plus ancien et situé sous le plus ancien niveau moustérien, révèle de nombreux
185 restes de grand boviné et de cheval associés à l'ours des cavernes (Veyrier *et al.*, 1951). En
186 1991, lors de la vérification de l'état de conservation du gisement, de nouvelles fouilles ont
187 été réalisées. Quatre couches (I, II, III et VII) ont alors livré du matériel moustérien. Deux
188 dents humaines d'un enfant ont été découvertes dans la couche I (Defleur *et al.*, 1992). Un
189 charbon de bois de *Pinus* sp. issu de la couche III au milieu de la séquence a été daté de
190 $43\ 000 \pm 1\ 100$ ans BP par le radiocarbone (Defleur *et al.*, 1994). La couche VII, à sa base,
191 est très riche. Il s'agit d'une couche de sédiments brun jaunâtre peu caillouteux. L'industrie
192 est décrite comme un Moustérien de type Quina. La faune de cette couche VII est composée
193 de nombreux carnivores dont le loup, l'ours et l'hyène des cavernes. Le renne est l'espèce
194 dominante, indiquant une occupation humaine durant une période froide et sèche. Sous cette
195 couche, à la base de la séquence, les fouilles ont mis au jour une couche avec une forte
196 densité de restes osseux et de coprolithes sans trace de présence humaine. Cette couche peut
197 correspondre au « charnier » le plus ancien décrit par Veyrier. La Grotte de Néron a été
198 classée monument historique en 1965 puis aménagée et ouverte au public en 1995.

199

200 Découverte en même temps que la Baume Néron, la grotte dite du Trou-du-Renard (fig. 2c)
201 est une cavité présentant d'abondantes concrétions. Elle fait partie d'un réseau karstique qui
202 la relie notamment à l'Abri Moula situé un peu plus en contrebas sur la colline du site de
203 Soyons (Defleur, 1995). Des fouilles anciennes ont permis de recueillir du matériel attribué
204 au Paléolithique moyen (Gaillard *et al.*, 1933), mais ce n'est qu'en 1989 que les parties
205 profondes, appelées « Réseau *Ursus* », sont découvertes et topographiées. Des ossements de
206 grands carnivores (ours, lion et hyène des cavernes) ainsi que des coprolithes d'hyène ont
207 été mis au jour dans ce secteur. Cette partie de la grotte est également riche en spéléothèmes
208 (Gardien *et al.*, 2009). La grotte a été aménagée et ouverte au public en 1989.

209

210 2.3 - LE FIGUIER (SAINT-MARCEL-D'ARDÈCHE, ARDÈCHE)

211

212 La Grotte du Figuier (fig. 2d) est une vaste cavité située sur la rive gauche de l'Ardèche à
213 85 m d'altitude (39 m au-dessus du niveau de la rivière). Connue depuis le 19^{ème} siècle, elle
214 a fait l'objet de nombreuses fouilles qui ont concerné surtout la première salle (Salle 1, la
215 plus vaste) dès les années 1940 (Combiér, 1967). La grotte a livré une longue séquence à la
216 fois pour le Paléolithique moyen et le Paléolithique supérieur-Mésolithique-Néolithique,
217 dont des restes humains et des gravures du Solutréen. Les travaux effectués en 2007 et 2008
218 dans les trois salles ont permis de préciser le remplissage, commun à l'ensemble du réseau,
219 et les types d'occupation (Moncel *et al.*, 2010, 2012). L'occupation humaine des salles
220 profondes (2 et 3) au Paléolithique moyen se confirme. Les hommes ont pu accéder aux
221 salles profondes à partir de la grande salle principale (Salle 1) ou à partir d'une autre entrée
222 située dans la Salle 3. Le site est connu pour avoir livré dans la Salle 1 deux niveaux du
223 Paléolithique moyen, dont l'un a été attribué au Moustérien de type Quina ; le même mode

224 opératoire a été utilisé par les chasseurs de ces deux niveaux (Moncel, 2001). Des activités
225 de nature différente selon les salles sont envisagées. Hommes et carnivores ont fréquenté les
226 salles profondes dans un contexte climatique froid, probablement la dernière époque
227 glaciaire. Une date a été obtenue sur une dent de cheval issue de la Salle 1. Elle a donné un
228 âge de 52 ± 9 ka (MIS 3) en accord avec le contexte faunique (Richard *et al.*, 2015). Les
229 restes d'*Ursus spelaeus* sont nombreux dans les salles 2 et 3, qui ont aussi livré deux
230 coprolithes d'hyène. Les hommes du Paléolithique supérieur ont également fréquenté le
231 réseau de la grotte, mais de manière différente. Le Gravettien est le seul faciès clairement
232 identifié parmi le matériel découvert dans les sondages des salles 2 et 3.

233

234 2.4 - GROTTÉ TOURNAL (BIZE-MINERVOIS, AUDE)

235

236 La grotte Tournal à Bize-Minervois (fig. 2e) est située dans les falaises calcaires
237 rognaciennes du Minervois. Dans la première moitié du 19^{ème} siècle, des outils
238 préhistoriques sont identifiés dans un niveau fossilifère « antédiluvien » (Tournal, 1827). La
239 grotte a livré un matériel abondant, lithique et osseux, et les fouilles minutieuses d'André
240 Tavano ont mis en évidence la stratigraphie complexe de ce site et des occupations humaines
241 durant le Moustérien, l'Aurignacien et le Magdalénien (Tavano, 1987). Des restes humains
242 ont été découverts dans tous les ensembles. Les niveaux attribués au MIS 3 et au MIS 2 sont
243 caractérisés par une industrie majoritairement réalisée en quartzites locaux et par une
244 exploitation particulière des chevaux et des rennes, associés aux cerfs, grands bovinés et
245 bouquetins (Magniez, 2009, 2010 ; Marin *et al.*, 2020). Les carnivores, en particulier l'hyène
246 et le loup, sont présents dans tous les niveaux du remplissage et ont laissé de nombreux
247 indices de consommation de carcasses. Le site permet d'observer la transition Paléolithique
248 moyen-Paléolithique supérieur. Son intérêt est de montrer des changements climatiques

249 majeurs, avec une péjoration nette et une réduction de la biodiversité entre les niveaux
250 aurignaciens E1 et E3 (Magniez, 2010 ; Magniez et Boulbes, 2014). Les coprolithes étudiés
251 proviennent des couches F et G du niveau moustérien D1.

252

253 2.5 - LA CROUZADE (GRUISSAN, AUDE)

254

255 La grotte de la Crouzade (fig. 2f) est creusée dans les calcaires du Crétacé inférieur du massif
256 de la Clape appartenant à la nappe des Corbières. Fouillée au début du 20^{ème} siècle par
257 Théophile et Philippe Hélène, qui réalisent la première description stratigraphique du site
258 (Hélène, 1930) et depuis 2016 par Thibaud Saos et collaborateurs (Saos *et al.*, 2020), elle
259 livre une industrie et une faune du Pléistocène supérieur en excellent état de conservation.
260 La coupe stratigraphique de référence (Lumley-Woodyear, 1971 ; Saos, 2003), située au
261 fond du boyau principal, montre une riche succession de niveaux d'occupations du
262 Paléolithique moyen au Paléolithique supérieur (Sacchi, 1986). Des restes humains ont été
263 découverts dans tous les ensembles, en particulier des éléments de crâne dans le niveau
264 aurignacien qui, avec un âge de 36 014-34 402 ans cal. BP (2σ), comptent parmi les plus
265 anciens vestiges d'Homme anatomiquement moderne découverts en France (Henri-Gambier
266 et Sacchi, 2008 ; Saos *et al.*, 2020). Trois niveaux moustériens, C6 à C8, sont actuellement
267 en cours de fouille (Saos *et al.*, 2020) à 65 m des porches de la grotte. Ils sont associés, de
268 la base au sommet, à un climat humide (C8) puis froid et sec (C7), surmontés par une couche
269 très riche en ossements d'ursidés (C6). Les carnivores, et en particulier les hyènes, sont
270 présents dans tous les niveaux. Les coprolithes 71372-C7 et 71377-C7 étudiés ici
271 proviennent de la couche 7, datée de 41 000 ans \pm 2 000 ans BP par les séries de l'Uranium
272 sur dent de cheval combinées à l'ESR. Les trois couches (C6-C8) ont livré une industrie
273 caractéristique du Paléolithique moyen de la fin du MIS 3, et un assemblage faunique riche

274 en ossements de renne (*Rangifer tarandus*) et de cheval (*Equus ferus germanicus*), associés
275 à l'hydrintin (*Equus hydruntinus davidi*), au bouquetin (*Capra praepyrenaica*) et aux grands
276 bovinés (Saos *et al.*, 2020). Des os de petits animaux consommés par l'homme, restes
277 aviaires et surtout de léporidés, sont également présents (Morin *et al.*, 2019).
278

279 3 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

280 3.1 - ÉCHANTILLONS

281

282 Les échantillons de cette étude sont issus de fouilles programmées ou de fouilles préventives
283 réalisées plusieurs années à plusieurs décennies avant la réalisation des analyses génétiques.

284 Les autorisations d'analyse ont été obtenues de la part des autorités compétentes en agrément
285 avec la législation en cours. Pour les échantillons de la Grotte-aux-Ours de Châteaubourg,
286 de la Baume Néron et du Trou-du-Renard, l'autorisation (convention 2013.01) a été accordée
287 par le Musée de Soyons ; pour les échantillons de la grotte du Figuier, l'autorisation
288 (convention 2007) est celle accordée pour les fouilles programmées sur ce site ; pour les
289 échantillons des grottes de La Crouzade et de Tournal, l'autorisation (convention MT18002)
290 a été accordée par le Centre Européen de Recherches Préhistoriques de Tautavel.

291

292 3.2 - EXTRACTION DE L'ADN

293

294 Les extractions d'ADN ont été réalisées dans des laboratoires où aucun ADN amplifié n'a
295 jamais été manipulé : laboratoire du CEA Saclay dédié à cette activité (Bon *et al.*, 2012 ;
296 Palacio *et al.*, 2017), ou salle blanche du Musée de l'Homme à Paris (Utge *et al.*, 2020). Les
297 précautions utilisées contre les contaminations incluent le port d'une combinaison intégrale,
298 d'un masque et de gants (changés fréquemment) par les expérimentateurs, l'utilisation de
299 matériel stérile à usage unique ou d'outils soigneusement lavés et stérilisés après chaque
300 manipulation.

301

302 Les coprolithes analysés dans cette étude étaient dans leur état d'origine (fig. 3a-fig. 3g), à
303 l'exception d'un des coprolithes de La Crouzade qui était verni (fig. 3h). Pour l'extraction

304 d'ADN, les coprolithes ont été coupés en deux afin d'en rendre l'intérieur accessible au
305 prélèvement. Cette approche évite de récupérer un excès de contaminants présents à la
306 surface du coprolithe, qu'ils proviennent de l'environnement, de la manipulation du
307 coprolithe pendant et après la fouille, ou de son traitement au moyen d'un vernis. L'intérieur
308 du coprolithe a été gratté au moyen d'un scalpel à usage unique et environ 0,5 g de matériel
309 récupéré. Aucune inclusion osseuse n'a été repérée lors des prélèvements. L'échantillon a
310 ensuite été broyé finement pendant 30 secondes au moyen d'un Mikro-dismembrator S
311 (Sartorius ; Göttingen, Allemagne) réglé à fréquence de 2 000 oscillations par minute.
312 L'extraction de l'ADN a été réalisée selon le protocole précédemment décrit (Utge *et al.*,
313 2020) en l'adaptant à des échantillons de 0,5 g. Brièvement, la poudre de coprolithe est
314 transférée dans un tube Falcon de 15 ml contenant 5 ml de tampon d'incubation (EDTA
315 0,25M, Tris-HCl 10mM (pH 8), N-lauryl-sarcosyl 0,2%, protéinase K 200 µg/ml). Après
316 16h d'incubation à 42°C sous agitation rotative, l'échantillon est centrifugé 5 minutes à
317 5 000 g. Le surnageant est récupéré, déposé par fractions de 1-2 ml sur une colonne de
318 dialyse Amicon de 2 ml (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) d'une porosité de 30kDa,
319 en réalisant une centrifugation de 20 minutes à 3 000 g après chaque ajout de surnageant. La
320 colonne est ensuite rincée quatre fois avec 2 ml d'eau distillée. L'extrait d'ADN est récupéré
321 en centrifugeant la colonne en position inverse 1 minute à 1 000 g, puis soumis à une
322 purification supplémentaire sur une colonne de silice (MinElute PCR purification kit;
323 Qiagen ; Venlo, Pays-Bas) en suivant les recommandations du fournisseur. Enfin, l'ADN
324 est élué de la colonne avec du tampon Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) et récupéré dans un volume
325 final de 100 µl.

326

327 3.3 - ANALYSE DE L'ADN PAR PCR EN TEMPS RÉEL

328

329 La PCR quantitative en temps réel a été utilisée pour vérifier la présence d'ADN d'hyène
330 des cavernes dans les coprolithes préalablement au séquençage massif. Elle a été réalisée en
331 utilisant les amorces et la sonde TaqMan préalablement décrites (Utge *et al.*, 2020). Les
332 amplifications ont été effectuées dans un volume final de 20 µl contenant 10 µl de 2X
333 TaqMan fast advanced master mix (Thermo Fisher Scientific), les amorces sens et anti-sens
334 (900 nM), la sonde TaqMan (250 nM), et de l'eau (blanc de PCR), un blanc d'extraction ou
335 une aliquote de l'extrait d'ADN. L'amplification a été effectuée dans l'appareil de PCR en
336 temps réel *CFX96 Touch* (BioRad, Hercules, Californie, USA). Elle comportait les étapes
337 suivantes : 50°C, 2 minutes ; 95°C, 20 secondes ; suivies de 40 cycles de PCR (95°C,
338 3 secondes ; 60°C, 30 secondes). Les données ont été analysées au moyen du logiciel CFX
339 Maestro de la société Biorad pour calculer le cycle seuil (*Cycle Threshold*, ou C_T), qui
340 correspond au nombre de cycles de PCR à partir duquel le signal fluorescent devient
341 significativement différent de la ligne de base.

342

343 La vérification de la présence d'ADN d'hyène des cavernes dans les coprolithes a été
344 effectuée en analysant trois quantités de chaque extrait (0,1 ; 0,3 et 0,9 µl). Comme l'objectif
345 était de sélectionner des coprolithes susceptibles de fournir des banques complexes, c'est-à-
346 dire des banques contenant une grande quantité de fragments d'ADN, seuls les coprolithes
347 présentant un $C_T \leq 35$ pour l'amplification de l'ADN d'hyène à partir de 0,3 µl d'extrait ont
348 été retenus. Ont ainsi été exclus des analyses ultérieures un coprolithe de la grotte du Figuier
349 et un coprolithe de la grotte Tournal. À partir des données de PCR en temps réel nous avons
350 choisi, pour la construction des banques, d'utiliser des quantités d'extrait comprises entre
351 1 µl et 10 µl selon les échantillons.

352

353 3.4 - CONSTRUCTION DE BANQUES DE FRAGMENTS D'ADN

354

355 Des banques de fragments d'ADN compatibles avec le séquençage massif au moyen de la
356 méthode Illumina (Bentley *et al.*, 2008) ont été construites en utilisant les réactifs Illumina
357 (TruSeq Nano DNA LT sample kit FC-121-4001 ; San Diego, Californie, USA). Les
358 banques ont été obtenues en suivant les recommandations du fournisseur, à l'exception de
359 modifications introduites en raison des particularités de l'ADN ancien, qui se présente sous
360 la forme de courts fragments. Ainsi, l'étape initiale de préparation de la banque
361 (fragmentation de l'ADN) n'a pas été effectuée. Le protocole de construction des banques,
362 avec 12 cycles de PCR pour l'amplification des banques, était identique à celui décrit par
363 Palacio *et al.* (2017).

364

365 3.5 - SÉQUENÇAGE DE L'ADN

366

367 Le séquençage des banques a été réalisé au Génoscope (CEA Evry, France) sur la plateforme
368 Illumina HiSeq 2500. Une aliquote de chaque banque a été déposée sur une ligne d'une lame
369 à huit lignes, sauf pour l'échantillon de Néron, qui a été déposé sur 3 lignes. La longueur de
370 lecture sélectionnée était de 101 nucléotides, et le séquençage réalisé à partir d'une seule
371 extrémité de chaque fragment.

372

373 3.6 - TRAITEMENT DES DONNÉES DE SÉQUENCE D'ADN ET ALIGNEMENT DES 374 LECTURES

375

376 Les données de séquence, ou lectures, ont été traitées de façon à éliminer les séquences des
377 adaptateurs, les bases indéterminées et les séries de bases de faible qualité. Ceci a été réalisé
378 à l'aide d'un logiciel, conçu par le Génoscope, dérivé du programme FASTX-Toolkit

379 ([http://hannonlab.cshl.edu/ fastx_toolkit](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit)). Les lectures de longueur inférieure à 30
380 nucléotides ont ensuite été exclues. Le tableau 1 donne pour chaque échantillon le nombre
381 total de lectures disponible après traitement des données de séquence.

382

383 Pour l'analyse des séquences mitochondriales, les lectures de toutes les banque ont d'abord
384 été alignées simultanément sur un ensemble de 35 génomes mitochondriaux incluant le
385 génome de référence de *Crocota crocuta* (GenBank NC_020670.1) (Bon *et al.*, 2012) et les
386 génomes mitochondriaux de plusieurs animaux potentiellement sources de nourriture pour
387 l'hyène. Les alignements ont été réalisés en utilisant le logiciel BWA v0.7.12 (Li & Durbin,
388 2009) et les fichiers ont été analysés avec le logiciel SAMtools v1.3.1 (Li *et al.*, 2009). Seules
389 ont été prises en compte les lectures uniques s'alignant parfaitement sur les génomes
390 mitochondriaux cibles, sans mésappariement, insertion ou délétion, et avec une qualité
391 d'alignement (*mapping quality*) supérieure à 25. Ce premier alignement avait pour objectif
392 de vérifier l'identité de l'espèce à l'origine du coprolithe, et de fournir des informations sur
393 son bol alimentaire.

394 Pour l'analyse des séquences nucléaires, les lectures des banques correspondant aux
395 coprolithes Châteaubourg 1, Néron 2, Trou-du-Renard 1, Tournal 143 et Crouzade 71372
396 (qui présentaient le plus de lectures correspondant à l'ADN mitochondrial de *Crocota*) ont
397 été alignées sur l'assemblage du génome nucléaire PEQU000000000 de l'hyène rayée
398 (*Hyaena hyaena*) (Westbury *et al.*, 2018) en utilisant l'algorithme *aln* (-n 0.01, -l 999) du
399 logiciel BWA v0.7.12 et les fichiers analysés avec le logiciel SAMtools v1.3.1. Les lectures
400 alignées présentes en doublon ont été éliminées en utilisant SAMtools. La couverture
401 moyenne du génome nucléaire ainsi obtenue est indiquée dans le tableau 2.

402

403 Nos données pour les génomes nucléaires d'hyène ont été comparées à celles de Westbury
404 *et al.* (2020). Nous avons analysé tous les spécimens anciens eurasiatiques (Ccsp014,
405 Ccsp015, Ccsp026, Ccsp040, Ccsp041, Ccsp042 et Ccsp043) de cette étude, ainsi que quatre
406 spécimens actuels d'Afrique : Ghana, Zambia2518, Tanzania5695 et Kenya793. Nous avons
407 procédé pour ces alignements comme spécifié précédemment (Westbury *et al.*, 2020). Le
408 traitement appliqué aux lectures issues des spécimens anciens et actuels est présenté ci-
409 dessous.

410 Les lectures des banques des spécimens anciens ont été traitées pour éliminer les séquences
411 des adaptateurs Illumina et les lectures trop courtes ont été supprimées (en utilisant les
412 longueurs minimales indiquées par Westbury *et al.*, (2020) pour chaque banque) à l'aide du
413 logiciel Cutadapt v1.8.1 (Martin, 2011). Les lectures ainsi traitées ont été alignées sur
414 l'assemblage du génome de l'hyène rayée en utilisant l'algorithme *aln* (-n 0.01, -l 999) du
415 logiciel BWA v0.7.12 (Li & Durbin, 2009) et les fichiers analysés avec le logiciel SAMtools
416 v1.3.1 (Li et al., 2009). Les lectures alignées présentes en doublon ont été éliminées en
417 utilisant SAMtools.

418 Les lectures des banques des spécimens actuels ont été traitées pour éliminer les séquences
419 des adaptateurs, et les lectures de longueur inférieure à 30 nucléotides ont été supprimées à
420 l'aide du logiciel Cutadapt v1.8.1. Les lectures chevauchantes ont ensuite été fusionnées en
421 utilisant le logiciel FLASH v1.2.1 (Magoč et Salzberg, 2011). Les lectures ainsi traitées ont
422 été alignées sur l'assemblage du génome de l'hyène rayée en utilisant l'algorithme *mem* du
423 logiciel BWA v0.7.12 et les fichiers analysés avec le logiciel SAMtools v1.3.1. Les lectures
424 alignées présentes en doublon ont été éliminées en utilisant SAMtools.

425

426 3.7 – RECONSTRUCTION DES GÉNOMES MITOCHONDRIAUX

427

428 La reconstruction du génome mitochondrial d'hyène de tous les spécimens à l'origine des
429 coprolithes, à l'exception de celui de la Baume Néron, a été effectuée de la façon suivante :
430 les lectures ont été alignées uniquement sur le génome de référence de *Crocota crocuta* en
431 utilisant le logiciel BWA v0.7.12 et ses paramètres par défaut, c'est-à-dire en permettant une
432 seule insertion ou délétion par lecture et une fraction d'alignements manquants de 0,04, ce
433 qui adapte le nombre de mésappariements tolérés à la longueur de la lecture. Les lectures
434 alignées ont ensuite été analysées par le logiciel SAMtools pour ne conserver que les lectures
435 présentant une qualité d'alignement supérieure à 25. Les lectures sélectionnées ont été
436 traitées par le logiciel mapDamage2.0 (Jónsson *et al.*, 2013) qui a permis de vérifier que
437 toutes les banques montraient l'endommagement attendu pour l'ADN ancien amplifié avec
438 l'ADN polymérase Phusion (Jónsson *et al.*, 2013 ; Marsolier-Kergoat *et al.*, 2015 ; Palacio
439 *et al.*, 2017). Les transitions C vers T aux extrémités 5' ne sont pas présentes car l'enzyme
440 Phusion interrompt la polymérisation au niveau des cytosines désaminées. En revanche, aux
441 extrémités 3' préalablement réparées par copie du brin complémentaire avec la polymérase
442 Klenow, d'abondantes transitions G vers A sont détectées. Ceci est illustré sur la figure 4
443 pour la banque obtenue à partir du coprolithe Néron 2. Le score des bases situées aux
444 extrémités a été réévalué au moyen de mapDamage2.0 afin que les bases avec une forte
445 probabilité d'endommagement ne soient pas prises en compte dans la reconstruction du
446 génome. Les lectures alignées présentes en doublon ont ensuite été éliminées en utilisant
447 SAMtools, et une première séquence a été reconstruite en prenant comme base consensus
448 pour chaque position du génome la base la plus fréquemment observée dans les lectures
449 alignées, avec un minimum de deux lectures concordantes. Cette première séquence
450 reconstruite a ensuite servi de matrice pour réaligner toutes les lectures, permettant à de
451 nouvelles lectures de s'aligner sur ce génome plus proche de celui correspondant aux
452 fragments d'ADN de la banque. Ce cycle d'alignement/correction des bases aux extrémités

453 avec élimination des séquences dupliquées et reconstruction d'une séquence consensus a été
454 itéré jusqu'à ce que le génome mitochondrial reconstruit ne varie plus d'un cycle à l'autre
455 (entre 3 et 5 itérations selon les banques).

456

457 L'analyse préliminaire de la banque du coprolithe de la Baume Néron a montré qu'elle
458 contenait un grand nombre de lectures s'alignant sur un génome mitochondrial de cheval
459 (*Equus caballus*, référence de GenBank NC_001640). Pour éviter que le génome
460 mitochondrial reconstruit pour l'hyène ne soit altéré par des lectures correspondant au
461 génome mitochondrial d'un équidé qui pourraient s'aligner de façon illégitime sur le génome
462 d'hyène, nous avons procédé comme décrit précédemment mais en alignant les lectures
463 simultanément sur un génome d'hyène et un génome de cheval (les deux génomes utilisés
464 pour le premier cycle d'alignement sont les mêmes que ceux précédemment employés :
465 NC_020670.1 et NC_001640). Des consensus pour les deux génomes mitochondriaux, celui
466 de l'hyène et celui de l'équidé, ont ainsi été construits à chaque itération, jusqu'à ce que
467 l'ensemble n'évolue plus d'une itération à l'autre.

468

469 3.8 - ANALYSES PHYLOGÉNÉTIQUES DES GÉNOMES MITOCHONDRIAUX

470

471 Les analyses phylogénétiques ont été réalisées en utilisant le logiciel MEGA X (Kumar *et*
472 *al.*, 2018). Les séquences consensus de *Crocota crocuta* que nous avons reconstruites ont
473 été alignées avec le génome mitochondrial de référence de l'hyène rayée (*Hyaena hyaena*,
474 GenBank NC_020669.1) (Bon *et al.*, 2012), le génome de *Crocota crocuta* utilisé
475 initialement pour l'alignement des lectures, le génome d'un spécimen moderne de *Crocota*
476 *crocuta* (Kira, GenBank JF894377) (Bon *et al.*, 2012) et 20 génomes mitochondriaux de
477 *Crocota crocuta* tant anciens que modernes précédemment publiés (Palacio *et al.*, 2017 ;

478 Westbury *et al.*, 2020). Nous avons construit un arbre phylogénétique à partir de cet
479 alignement en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance et le modèle général
480 réversible (*General Time Reversible model*) (Nei & Kumar, 2000). Les positions dont la base
481 a été déterminée dans moins de 95 % des séquences ont été éliminées ; au total 15 064
482 positions ont été prises en compte. Les arbres initiaux pour la recherche heuristique ont été
483 obtenus en appliquant les algorithmes Neighbor-Joining et BioNJ à une matrice de distances
484 évaluée avec une approche de maximum de vraisemblance composée (*Maximum Composite*
485 *Likelihood*), et en sélectionnant ensuite la topologie avec la plus forte valeur de
486 vraisemblance. Une distribution Gamma avec 5 catégories a été utilisée pour modéliser les
487 différences des taux d'évolution à différentes positions de la séquence nucléotidique.

488

489 3.9 - ANALYSES EN COMPOSANTES PRINCIPALES DES GÉNOMES NUCLÉAIRES

490

491 Les analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées comme décrit par Westbury
492 *et al.* (2020) en utilisant un échantillonnage des bases au moyen du logiciel ANGSD v0.913
493 (Korneliussen *et al.*, 2014) de façon à éviter les biais que pourraient induire les différences
494 de couverture entre les génomes. Les filtres suivants ont été appliqués : n'ont été considérées
495 que les lectures avec une qualité d'alignement supérieure à 25, qui s'alignaient à un seul
496 endroit du génome (*-uniqueOnly 1*) ; les lectures considérées comme « mauvaises » (*bad*)
497 par ANGSD ont été éliminées (*-remove_bads 1*) ; seules les bases de qualité supérieure à 25
498 (*-minQ 25*) ont été prises en compte ; enfin, seules les transversions et seuls les sites qui
499 étaient couverts chez au moins 7 échantillons avec la fréquence de l'allèle minoritaire
500 supérieure à 0.1 ont été considérés.

501

502 3.10 - ANALYSES PHYLOGÉNÉTIQUES DES GÉNOMES NUCLÉAIRES

503

504 Ces analyses ont été menées selon les procédures décrites ailleurs (Westbury *et al.*, 2020).
505 En particulier, les sites des séquences alignées sur l'assemblage de l'hyène rayée ont été
506 sélectionnés en appliquant les mêmes filtres, puis pseudohaploïdisés en utilisant la fonction
507 d'échantillonnage aléatoire du logiciel ANGSD v0.913 (Korneliussen *et al.*, 2014). Les 333
508 contigs de l'assemblage dont la longueur était supérieure à 2 millions de paires de bases
509 (Mpb) ont été découpés en segments de 2 Mpb non chevauchants, d'où 467 segments. Les
510 bases des sites ont été binarisées et un arbre phylogénétique a été construit pour chaque
511 segment au moyen de la méthode du maximum de vraisemblance en utilisant le logiciel
512 RAxML v8.2.10 (Stamatakis, 2014) avec le modèle de substitution BINGAMMA et en
513 spécifiant l'hyène rayée comme groupe externe. Finalement les 467 arbres partiels ont été
514 combinés en un seul arbre consensus en utilisant le logiciel PHYLIP v3.6 (J. Felsenstein,
515 PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6 (2005) ;
516 <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/>).

517

518 3.11 - DATATIONS RADIOCARBONE

519

520 Les datations ont été réalisées sur la matrice des coprolithes, au sein de laquelle aucun résidu
521 osseux n'était visible. La préparation des échantillons consistait en un traitement par l'acide
522 (HCl 0,5M) à température ambiante, suivi d'une lyophilisation, d'une combustion pour la
523 production de CO₂, et d'une conversion du CO₂ en graphite. Les datations ¹⁴C ont été
524 réalisées au moyen de la méthode de spectrométrie de masse par accélérateur (AMS) à
525 l'Université de Californie à Irvine (UCIAMS). L'âge calibré de chaque échantillon avant le
526 présent (cal. BP) a été calculé en utilisant le logiciel OxCal 4.4 (Ramsey, 2009) et la courbe
527 de calibration IntCal20 (Reimer *et al.*, 2020).

528 4 - RÉSULTATS ET DISCUSSION

529 4.1 - CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DE L'ESPÈCE À L'ORIGINE DES 530 COPROLITHES ET ANALYSE DE SON ALIMENTATION

531

532 Nous avons analysé par séquençage massif le contenu en ADN de huit coprolithes provenant
533 de 6 sites : un échantillon de la Grotte-aux-Ours de Châteaubourg, un échantillon des grottes
534 de Néron et du Trou-du-Renard du site de Soyons, un échantillon de la grotte du Figuier,
535 deux échantillons de la grotte Tournal et deux échantillons de la grotte de la Crouzade.

536

537 Les lectures de fragments d'ADN correspondant à chaque échantillon ont d'abord été
538 alignées sur un ensemble de 35 génomes mitochondriaux, incluant un génome de *Crocota*
539 *crocota* et les génomes de plusieurs proies potentielles de l'hyène. Les lectures ont été
540 alignées simultanément sur les 35 génomes et seules celles qui s'alignaient parfaitement,
541 sans insertion, délétion ou mésappariement sur un seul des 35 génomes ont été retenues.
542 Cette approche présente l'avantage d'éliminer les séquences qui se retrouvent dans plusieurs
543 génomes, et qui sont donc peu spécifiques, mais limite le nombre de génomes qui peut être
544 introduit dans l'analyse. En effet, si plusieurs génomes d'espèces génétiquement proches
545 sont criblés simultanément, de nombreuses lectures s'aligneront sur plusieurs de ces
546 génomes et seront éliminées par notre crible : l'ADN de ces espèces sera, à tort, jugé absent
547 (faux négatif). Pour cette raison, la liste des 35 génomes ne comprend qu'une seule espèce
548 pour chaque genre. Un résultat positif peut ensuite être approfondi en faisant une nouvelle
549 série d'alignements sur un nombre plus limité de génomes génétiquement proches pour
550 déterminer plus précisément l'espèce dont l'ADN est présent dans le coprolithe (voir ci-
551 dessous).

552 Le tableau 3 présente les résultats obtenus en alignant les lectures de chaque banque sur les
553 35 génomes. Comme attendu d'après la morphologie des coprolithes, le génome sur lequel
554 s'alignent le plus grand nombre de lectures est pour chaque échantillon celui de *Crocota*
555 *crocota*, ce qui confirme qu'il s'agit bien dans tous les cas de coprolithes d'hyène.

556

557 En ce qui concerne les autres génomes, l'abondance des lectures alignées suggère dans
558 certains cas que les espèces correspondantes ont pu faire partie du bol alimentaire. En
559 complément du nombre de lectures alignées, nous avons utilisé un deuxième critère pour
560 caractériser les lectures mitochondriales attribuées à une espèce donnée, à savoir la
561 répartition de ces lectures le long du génome. Nous avons considéré tous les génomes
562 mitochondriaux sur lesquels s'alignent au moins 30 lectures pour au moins un des
563 coprolithes étudiés (ce seuil de 30 a été choisi de façon arbitraire, de façon à pouvoir évaluer
564 qualitativement la répartition des lectures alignées sur les génomes). Sept génomes
565 mitochondriaux sont dans ce cas : celui du bison des steppes (*Bison priscus*), de l'aurochs
566 (*Bos primigenius*), du rhinocéros laineux (*Coelodonta antiquitatis*), du cheval (*Equus*
567 *caballus*), du renne (*Rangifer tarandus*), du saïga (*Saiga tatarica*) et de l'ours des cavernes
568 (*Ursus spelaeus*). La figure 5 montre le nombre de lectures commençant à chaque position
569 des sept génomes mitochondriaux pour les six coprolithes dont les données, pour au moins
570 un de ces génomes, correspondent à au moins 30 lectures alignées.

571

572 Si un coprolithe contient de l'ADN mitochondrial d'une espèce donnée, on s'attend à ce que
573 les fragments de cet ADN s'alignent sur des séquences réparties de façon relativement
574 uniforme le long du génome. Le cas est particulièrement clair pour les lectures du coprolithe
575 Néron 2 s'alignant sur un génome mitochondrial de cheval (*Equus caballus*) : on observe en
576 effet un grand nombre de lectures (2 165) qui se répartissent régulièrement le long du

577 génome (fig. 5). Cette observation nous a d'ailleurs incités à aligner les lectures de cette
578 banque simultanément sur des génomes mitochondriaux de cheval et d'hyène afin de
579 reconstruire le génome mitochondrial de l'hyène sans que la séquence consensus ne soit
580 affectée par les lectures correspondant au génome d'un équidé (voir Matériel et Méthodes).
581 Le génome mitochondrial de l'équidé a également été reconstruit avec une valeur médiane
582 de 8 pour la couverture (nombre de lectures incluant une position donnée du génome). La
583 comparaison de cette séquence consensus avec une base de données de séquences d'ADN
584 (sur le site blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, test effectué le 29 juillet 2020) démontre sans
585 ambiguïté qu'il s'agit du génome mitochondrial d'un spécimen de cheval puisque les cent
586 séquences les plus proches, avec des pourcentages d'identité supérieurs à 98,5%,
587 correspondent toutes à des génomes mitochondriaux d'*Equus caballus*. L'identité avec le
588 génome mitochondrial d'autres équidés est moindre (*Equus hydruntinus*, 93,2% ; *Equus*
589 *asinus*, 92,0%). En l'absence d'information sur le génome mitochondrial des chevaux
590 présents à la fin du Pléistocène dans le sud de la France (*Equus caballus germanicus*, *gallicus*
591 *et arcelini*) (Brugal *et al.*, 2020) il n'est pas possible d'identifier formellement l'espèce de
592 cheval dont l'ADN est présent dans le coprolithe de la Baume Néron.

593

594 Outre les lectures alignées sur le génome mitochondrial de cheval, on observe aussi que 65
595 et 53 lectures du coprolithe Néron 2 s'alignent respectivement avec une répartition régulière
596 sur les génomes mitochondriaux de bison des steppes et d'aurochs (fig. 5). Cette observation
597 nous a paru surprenante car on s'attend, en ce qui concerne ces proies de grande taille, à ce
598 que le bol alimentaire de l'hyène comprenne le plus souvent une espèce, parfois deux, mais
599 rarement trois. Étant donné la forte ressemblance des séquences des génomes
600 mitochondriaux de bison des steppes et d'aurochs, il semblait possible que l'animal
601 consommé appartienne en fait à une autre espèce de boviné, dont certaines parties de l'ADN

602 mitochondrial sont suffisamment semblables à des séquences mitochondriales du bison des
603 steppes ou de l'aurochs pour s'y aligner. Deux autres lignées de grand boviné sont présentes
604 en Europe à la fin du Pléistocène : le bison d'Europe (*Bison bonasus*) et une lignée de bison
605 baptisée X (Soubrier *et al.*, 2016) ou Bb1 (Massilani *et al.*, 2016) mais qui pourrait
606 correspondre au bison des forêts (*Bison schoetensacki*) (Palacio *et al.*, 2017). C'est sous ce
607 nom que la désignons ici. Nous avons réaligné la banque du coprolithe Néron 2
608 simultanément sur les génomes mitochondriaux du bison des steppes, de l'aurochs et du
609 bison des forêts. Nous avons alors obtenu 17 lectures pour le bison des steppes, 19 lectures
610 pour l'aurochs et 495 lectures pour le bison des forêts. L'expérience complémentaire
611 consistant à réaligner la banque du coprolithe Néron 2 simultanément sur les génomes
612 mitochondriaux du bison des steppes, de l'aurochs et du bison d'Europe a donné 37 lectures
613 pour le bison des steppes, 32 lectures pour l'aurochs et 233 lectures pour le bison d'Europe.
614 Le nombre deux fois plus élevé de lectures pour le bison des forêts que pour le bison
615 d'Europe, et la vérification de la répartition homogène de ces lectures le long de l'ADN
616 mitochondrial du bison des forêts (fig. 6) suggèrent fortement que les lectures s'alignant sur
617 les différents génomes de bovinés (bison des steppes, aurochs, bison des forêts et bison
618 d'Europe) correspondent en fait à des fragments d'ADN de bison des forêts et donc que le
619 coprolithe de Néron 2 contient à la fois de l'ADN de cheval et de l'ADN de bison des forêts.
620

621 Une répartition régulière des lectures alignées s'observe aussi sur le génome mitochondrial
622 d'ours des cavernes pour le coprolithe Trou-du-Renard 1, sur le génome mitochondrial de
623 rhinocéros laineux pour le coprolithe Le Figuier 1, et sur le génome mitochondrial de renne
624 pour le coprolithe Tournal 143 (fig. 5). Dans ces trois cas, le nombre de lectures alignées,
625 dont l'abondance est spécifique d'un coprolithe particulier (les autres coprolithes servant de
626 témoins négatifs d'une certaine façon) et la distribution de ces lectures sur les génomes

627 suggèrent fortement qu'un spécimen de l'espèce correspondante a fait partie du bol
628 alimentaire. L'alignement simultané des lectures obtenues pour le coprolithe du Trou-du-
629 Renard sur les génomes mitochondriaux de deux ursinés confirme que c'est
630 vraisemblablement l'ours des cavernes (250 lectures) plutôt que l'ours brun (46 lectures) qui
631 faisait partie du bol alimentaire de l'hyène.

632

633 Le génome mitochondrial de saïga illustre une situation différente de celles décrites jusqu'à
634 présent. On peut d'abord remarquer que trois coprolithes fournissent plus de 30 lectures
635 s'alignant sur ce génome (tab. 3). Par ailleurs, ces lectures apparaissent toujours concentrées
636 en quelques endroits de la séquence, dont un se retrouve dans tous les cas présentant plus de
637 30 lectures alignées (fig. 5). Cette configuration serait très peu probable si de l'ADN de saïga
638 se trouvait dans ces coprolithes. Nous n'avons donc pas d'argument fort en faveur de la
639 présence d'ADN de saïga dans les coprolithes étudiés.

640

641 L'étude des ossements accumulés dans les repaires d'hyène des cavernes montre que cette
642 espèce consommait une diversité de gros animaux (Diedrich et Zak, 2006 ; Fourvel *et al.*,
643 2014. Nos analyses génétiques valident cette notion et révèlent en particulier quatre bols
644 alimentaires différents (Néron 2: cheval et bison des forêts ; Trou-du-Renard 1: ours des
645 cavernes ; Le Figuier 1: rhinocéros laineux ; Tournal 143 : renne) pour les quatre coprolithes
646 qui livrent une information sur le régime alimentaire de l'hyène. Dans trois cas (Néron, Trou-
647 du-Renard, Tournal), les animaux consommés par l'hyène font partie du
648 paléoenvironnement déduit de l'analyse des sites, bien que pour Néron les équidés et les
649 grands bovinés se situent dans un charnier différent de celui où se trouvent les coprolithes.
650 La présence d'ADN de rhinocéros laineux dans le coprolithe de la grotte du Figuier ouvre
651 de nouvelles perspectives pour l'analyse du paléoenvironnement du site puisqu'aucun reste

652 de rhinocéros n'a jusqu'à présent été découvert dans la grotte. La possibilité d'une sélection
653 d'espèces différentes par les humains et les hyènes, de même que la fréquentation du site
654 par les humains et les hyènes à des époques différentes, font partie des notions qu'il
655 conviendra d'approfondir à l'occasion d'autres études.

656

657 Les résultats de cette étude et ceux de travaux antérieurs (Bon *et al.*, 2012 ; Palacio *et al.*,
658 2017 ; Utge *et al.*, 2020) portent à 9 le nombre de coprolithes d'hyène pour lesquels des
659 analyses génétiques ont livré une information sur le régime alimentaire de l'hyène. Jusqu'à
660 présent, seule la consommation de gros animaux a été mise en évidence, et le nombre
661 d'espèces détectées (6 pour 9 coprolithes) souligne la diversité du régime alimentaire de
662 l'hyène. Les 6 espèces dont l'ADN a été trouvé dans les coprolithes d'hyène sont le bison
663 des forêts, le cerf élaphe, le cheval, l'ours des cavernes, le renne et le rhinocéros laineux.
664 L'ADN de cerf élaphe a été trouvé dans deux coprolithes d'un même site (Bon *et al.*, 2012).
665 La seule récurrence frappante à ce stade est celle du bison des forêts, dont l'ADN a été
666 détecté dans quatre coprolithes de trois sites différents (Palacio *et al.*, 2017 ; Utge *et al.*,
667 2020 ; et la présente étude). À titre d'hypothèse, nous proposons que cette association
668 pourrait aider à définir le biotope de l'hyène des cavernes.

669

670 Parmi les huit coprolithes de la présente étude, quatre seulement livrent une information sur
671 les animaux consommés par l'hyène des cavernes. Les résultats négatifs pour les autres
672 coprolithes peuvent être expliqués par différentes raisons. Premièrement, les 35 genres
673 recherchés (tab. 3) représentent un nombre important d'espèces mais ne prétendent être une
674 liste exhaustive ni définitive pour explorer la diversité de l'alimentation de l'hyène. Comme
675 les séquences d'ADN de cette étude ont été déposées dans la base de données EBI, l'analyse
676 pourra être poursuivie sur d'autres génomes mitochondriaux et les génomes nucléaires de

677 nombreuses espèces. La seconde raison qui pourrait expliquer la difficulté à identifier le
678 contenu du bol alimentaire est le cannibalisme, comportement connu chez l'hyène tachetée
679 actuelle (Frank, 1994) et l'hyène des cavernes (Diedrich et Zak, 2006 ; Diedrich 2011).
680 Lorsque c'est le cas, on ne peut s'attendre à retrouver un ADN autre que celui de l'hyène
681 dans les coprolithes. Troisièmement, il convient de mentionner que les différents tissus
682 animaux contiennent des quantités inégales d'ADN. Celui-ci est en effet beaucoup plus
683 abondant dans les tissus mous, en particulier le foie, que dans l'os compact, où la quantité
684 par gramme de tissu frais est 100 à 1 000 fois plus faible (Hochmeister *et al.*, 1991 ;
685 Hofstetter *et al.*, 1997). Ainsi, un coprolithe correspondant à un bol alimentaire pauvre en
686 tissus mous contiendra peu d'ADN de l'animal consommé.

687

688 4.2 - RECONSTRUCTION ET ANALYSE PHYLOGÉNÉTIQUE DES GÉNOMES 689 MITOCHONDRIAUX D'HYÈNE

690

691 Nous avons ensuite reconstruit le génome mitochondrial d'hyène présent dans les huit
692 coprolithes étudiés. Le tableau 1 montre que la valeur médiane de la couverture des génomes
693 reconstitués varie entre 3 et 65. Les génomes mitochondriaux reconstitués à partir de tous
694 les coprolithes étudiés (mis à part celui du Figuier 1, dont la couverture était faible) ont été
695 comparés à d'autres génomes de *Crocuta crocuta* précédemment obtenus à partir de
696 spécimens eurasiatiques du Pléistocène supérieur et de spécimens modernes d'origine sub-
697 saharienne, présents dans différents pays d'Afrique ou des zoos (Bon *et al.*, 2012 ; Palacio
698 *et al.*, 2017 ; Westbury *et al.*, 2020). L'arbre phylogénétique obtenu par la méthode du
699 maximum de vraisemblance (fig. 7) montre que les génomes se répartissent dans les quatre
700 haplogroupes identifiés lors d'études antérieures (Rohland *et al.*, 2005 ; Westbury *et al.*,
701 2020).

702

703 Les génomes de la présente étude se trouvent dans deux de ces haplogroupes seulement. Les
704 génomes des coprolithes Châteaubourg 1, Trou-du-Renard 1, Crouzade 71372, Crouzade
705 71377, Tournal 143 et Tournal 106 forment un clade de séquences très proches au sein de
706 l'haplogroupe A, tandis que le génome du coprolithe Néron 2 fait partie de l'haplogroupe B.
707 Comme observé précédemment (Westbury *et al.*, 2020), l'haplogroupe A présente la
708 particularité de rassembler des génomes d'hyènes européennes du Pléistocène supérieur et
709 d'hyènes sub-sahariennes modernes. Cependant, alors que les génomes analysés par
710 Westbury et collaborateurs se répartissaient à l'intérieur de l'haplogroupe A en deux clades
711 réciproquement monophylétiques, l'un formé de séquences anciennes d'origine européenne
712 et l'autre de séquences modernes d'origine africaine, cette partition disparaît avec l'addition
713 des génomes que nous avons reconstruits. En effet, le clade formé par les séquences
714 Châteaubourg 1, Trou-du-Renard 1, Crouzade 71372, Crouzade 71377, Tournal 106 et
715 Tournal 143 est plus proche phylogénétiquement de spécimens actuels d'hyène de Somalie
716 ou du Ghana que du clade comportant les génomes anciens de France, d'Allemagne et
717 d'Ukraine. Des flux génétiques entre les lignages des hyènes anciennes européennes et des
718 hyènes africaines ont été mis en évidence par Westbury *et al.* (2020) qui suggèrent, pour
719 expliquer le regroupement de génomes mitochondriaux d'origines européenne et africaine
720 au sein de l'haplogroupe A, un ou plusieurs événements d'introggression dont le sens n'est pas
721 déterminé, soit des hyènes européennes vers les hyènes africaines, soit l'inverse.

722

723 Les mêmes auteurs ont noté la répartition dans deux haplogroupes mitochondriaux (A et B)
724 de spécimens anciens géographiquement proches, retrouvés sur le territoire actuel de
725 l'Allemagne. Nous avons observé le même phénomène à une échelle encore plus restreinte
726 puisque les coprolithes du Trou-du-Renard et de la Baume Néron, pour lesquels les génomes

727 d'hyène appartiennent respectivement aux haplogroupes A et B, ont été collectés tous les
728 deux sur le site de Soyons. Ne disposant pas de datation directe pour leur échantillon de
729 l'haplogroupe A (Ccsp040), Westbury *et al.* (2020) ne pouvaient écarter l'hypothèse que les
730 différents spécimens d'Allemagne vivaient à des périodes différentes, entre lesquelles s'était
731 produit un remplacement d'haplogroupe. La datation radiocarbone du coprolithe du Trou-
732 du-Renard donne un âge de 25 800-25 290 cal. BP (tab. 4). Cette date, gravettienne, est
733 postérieure à celle (31 000 cal. BP) proposée pour la disparition de l'hyène des cavernes en
734 Europe (Stuart et Lister, 2014) qui ne tient pas compte toutefois de toute une série de
735 données. En effet l'hyène des cavernes, tout en se raréfiant, persiste bien au-delà, au moins
736 jusqu'au Gravettien (Boulestin *et al.*, 2006 ; Discamps, 2011), voire plus tardivement
737 encore. Elle est par exemple signalée à 22 120-21 820 cal. BP en Allemagne (Westbury *et*
738 *al.*, 2020) et dans les niveaux de l'ensemble magdalénien de la grotte Tournal (Magniez,
739 2010). L'âge obtenu pour le coprolithe de Néron est de 30 890-30 180 cal. BP. Nos données
740 de datation indiquent donc une présence tardive de l'haplogroupe A (Trou-du-Renard) alors
741 que des dates aussi tardives n'ont pour le moment pas été obtenues pour l'haplogroupe B sur
742 la colline de Soyons, ce qui est compatible avec un remplacement d'haplogroupe.

743

744 L'industrie lithique retrouvée jusqu'à présent dans les grottes de Châteaubourg, de Néron et
745 du Trou-du-Renard a conduit à les considérer comme des sites du Paléolithique moyen.
746 L'âge du coprolithe de Châteaubourg (39 670-38 000 cal. BP) le situe au début du
747 Paléolithique supérieur (Aurignacien), et ne remet pas en cause l'interprétation traditionnelle
748 du site comme un repaire de carnivores fréquenté occasionnellement par Néandertal. Les
749 dates obtenues pour les coprolithes de la Baume Néron et du Trou-du-Renard correspondent
750 en revanche à un Paléolithique supérieur déjà bien avancé (Gravettien) et révèlent des

751 intrusions animales largement postérieures aux dernières occupations néandertaliennes
752 documentées.

753

754 4.3 - ANALYSES DES GÉNOMES NUCLÉAIRES D'HYÈNE

755

756 Westbury *et al.* (2020) ont montré que les relations entre les génomes nucléaires des hyènes
757 anciennes européennes et des hyènes modernes africaines sont très différentes de celles
758 observées entre leurs génomes mitochondriaux. Les analyses en composantes principales ont
759 révélé en particulier que les génomes nucléaires des hyènes anciennes européennes et
760 modernes africaines, loin de se mêler entre eux, forment deux groupes bien distincts. Nous
761 avons reproduit ces analyses en y introduisant les données des spécimens Châteaubourg 1,
762 Néron 2, Trou-du-Renard 1, Tournal 143 et Crouzade 71372 et avons confirmé les
763 observations précédentes. La figure 8a montre en effet que l'axe CP1 différencie nettement
764 les hyènes anciennes européennes des hyènes modernes africaines tandis que l'axe CP2 tend
765 à séparer les hyènes anciennes selon leur position géographique, avec les hyènes d'origine
766 est-asiatique en haut du graphe et les hyènes d'origine européenne en bas. Les deux
767 spécimens d'origine asiatique appartenant à l'haplogroupe mitochondrial D sont
768 relativement éloignés des européens, qui se regroupent en fonction de leur haplogroupe
769 mitochondrial, A ou B, en deux ensembles adjacents. Les échantillons que nous avons
770 étudiés se retrouvent placés de façon cohérente à proximité des spécimens de même
771 haplogroupe analysés précédemment par Westbury *et al.* (2020).

772

773 Les analyses en composantes principales étaient complétées dans l'étude de Westbury *et al.*
774 (2020) par un arbre phylogénétique consensus, construit à l'aide du logiciel PHYLIP à partir
775 de 467 arbres phylogénétiques partiels correspondant à des segments de 2 Mpb non

776 chevauchants des chromosomes nucléaires. La topologie de cet arbre consensus reflétait les
777 résultats des analyses en composante principale puisqu'il mettait en évidence une séparation
778 claire entre le groupe des hyènes anciennes européennes et le groupe des hyènes africaines
779 modernes. Cependant la topologie des arbres partiels variait fortement à l'intérieur de chacun
780 de ces deux groupes. Nous avons reproduit cette analyse phylogénétique en y introduisant
781 les échantillons de notre étude mentionnés précédemment et avons confirmé les observations
782 antérieures. Ainsi, la figure 8b montre que les arbres partiels concordent en ce qui concerne
783 les deux groupes majeurs, celui des hyènes anciennes européennes et celui des hyènes
784 africaines modernes : 462 arbres (98,9%) appuient l'hypothèse de la monophylie des hyènes
785 anciennes européennes et 367 (78,5%) soutiennent l'hypothèse de la monophylie des hyènes
786 modernes africaines. La topologie des arbres partiels à l'intérieur de chacun de ces clades
787 est par contre très variable. L'arbre consensus montre un regroupement préférentiel des
788 hyènes anciennes européennes selon leur haplogroupe mitochondrial (A, B ou D), mais cette
789 tendance est faible : en particulier les groupes des hyènes anciennes correspondant aux
790 haplogroupes A et B n'apparaissent que dans 63 (13,5%) et 66 (14,1%) arbres partiels,
791 respectivement. Comme proposé précédemment (Westbury *et al.*, 2020), ces observations
792 s'expliquent probablement par les flux géniques entre ces différents groupes et par des tris
793 de lignées incomplets (*incomplete lineage sorting*).

794

795 **5 - CONCLUSION**

796

797 Notre étude montre la préservation de l'ADN dans les coprolithes de six sites du Sud de la
798 France (Châteaubourg, Baume Néron, Trou-du-Renard, Le Figuier, La Crouzade et
799 Tournal). Parmi les 35 espèces animales recherchées, celle dont l'ADN est
800 systématiquement majoritaire dans les coprolithes est l'hyène des cavernes. L'ADN de

801 différents gros animaux est également présent dans certains coprolithes et indique la
802 consommation par l'hyène du cheval et du bison des forêts (Baume Néron), de l'ours des
803 cavernes (Trou-du-Renard), du renne (Tournal) et du rhinocéros laineux (Le Figuier).
804 L'impossibilité d'identifier le régime alimentaire de l'hyène des cavernes à partir des autres
805 coprolithes est attribuée à différents facteurs, tels que la consommation d'espèces autres que
806 celles recherchées dans nos analyses, le cannibalisme de l'hyène ou encore l'ingestion de
807 tissus pauvres en ADN. La datation des coprolithes de Châteaubourg, de la Baume Néron et
808 du Trou-du-Renard les situe au Paléolithique supérieur, indiquant une dissociation entre les
809 occupations animales et humaines des sites, où ces dernières sont documentées au
810 Paléolithique moyen mais pas au Paléolithique supérieur. L'analyse phylogénétique des
811 génomes mitochondriaux d'hyène reconstruits à partir de l'ADN des coprolithes révèle
812 qu'ils proviennent en majorité de spécimens de l'haplogroupe A, qui inclut d'autres hyènes
813 des cavernes du Pléistocène, ainsi que des spécimens actuels d'hyène tachetée d'Afrique.
814 Avec les données de cette étude, la répartition des séquences anciennes et actuelles au sein
815 de l'haplogroupe A apparaît différente de celle proposée auparavant. L'haplogroupe B, qui
816 ne comporte que des spécimens d'hyène des cavernes, est détecté, pour la première fois en
817 France, à partir de l'un des échantillons (Néron). L'analyse des génomes nucléaires confirme
818 les conclusions d'études précédentes sur les différences entre les génomes nucléaires des
819 hyènes anciennes et modernes, ainsi que sur les indices de flux géniques et de tris de lignées
820 incomplets entre les hyènes anciennes appartenant à différents haplogroupes
821 mitochondriaux.

822

823 **DÉPÔTS DANS LES BASES DE DONNÉES**

824

825 Les lectures des séquences d'ADN ont été déposées dans la base de données EBI

826 (<http://www.ebi.ac.uk>) sous le code d'accès ERP124344. Les génomes mitochondriaux

827 reconstruits par assemblage des lectures ont été déposés dans la base de données GenBank

828 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) sous les codes d'accès MW193882-MW193888.

829

830 **REMERCIEMENTS**

831

832 Nous remercions le Plateau Technique du MNHN, site du Musée de l'Homme (plateforme
833 Paléogénomique et Génétique Moléculaire, Musée de l'Homme) où une partie des
834 expériences de ce projet ont été réalisées. Nous adressons également nos remerciements à
835 M. Daniel Dalet pour le fond de carte libre de droit ([http://d-](http://d-maps.com/carte.php?num_car=2224&lang=fr)
836 [maps.com/carte.php?num_car=2224&lang=fr](http://d-maps.com/carte.php?num_car=2224&lang=fr)) utilisé pour la figure 1, et à Mme Fanny
837 Derym pour les photographies des grottes de Soyons (fig. 2b-2c). La photographie de la
838 figure 2a a été initialement publiée par Pautret-Homerville *et al.* (*Quaternaire*, **Hors-série**
839 (4), 185-199).

840

841 **BIBLIOGRAPHIE**

842

843 **ARGANT J., 1990** - Climat et environnement au Quaternaire dans le Bassin du Rhône
844 d'après les données palynologiques. *Documents du Laboratoire de Géologie de Lyon*, **111**,
845 1-199.

846 **ARAUJO A.J.G., CONFALONIERI U.E.C, & FERREIRA L.F., 1982** - Oxyurid
847 (Nematoda) egg from coprolites from Brazil. *Journal of Parasitology*, **68** (3), 511-512.

848 **BACKWELL L., PICKERING R., BROTHWELL D., BERGER L., WITCOMB M.,**
849 **MARTILL D., PENKMAN K., WILSON A., 2009** - Probable human hair found in a
850 fossil hyaena coprolite from Gladysvale cave, South Africa. *J. Archaeol. Sci.*, 36, 1269-
851 1276.

852 **BENTLEY D.R., BALASUBRAMANIAN S., SWERDLOW H.P., SMITH G.P.,**
853 **MILTON J., BROWN C.G., HALL K.P., EVERS D.J., BARNES C.L., BIGNELL**
854 **H.R., BOUTELL J.M., BRYANT J., CARTER R.J., KEIRA CHEETHAM R., COX**
855 **A.J., ELLIS D.J., FLATBUSH M.R., GORMLEY N.A., HUMPHRAY S.J., IRVING**
856 **L.J., KARBELASHVILI M.S., KIRK S.M., LI H., LIU X., MAISINGER K.S.,**
857 **MURRAY L.J., OBRADOVIC B., OST T., PARKINSON M.L., PRATT M.R.,**
858 **RASOLONJATOVO I.M., REED M.T., RIGATTI R., RODIGHIERO C., ROSS**
859 **M.T., SABOT A., SANKAR S.V., SCALLY A., SCHROTH G.P., SMITH M.E.,**
860 **SMITH V.P., SPIRIDOU A., TORRANCE P.E., TZONEV S.S., VERMAAS E.H.,**
861 **WALTER K., WU X., ZHANG L., ALAM M.D., ANASTASI C., ANIEBO I.C.,**
862 **BAILEY D.M., BANCARZ I.R., BANERJEE S., BARBOUR S.G., BAYBAYAN**
863 **P.A., BENOIT V.A., BENSON K.F., BEVIS C., BLACK P.J., BOODHUN A.,**
864 **BRENNAN J.S., BRIDGHAM J.A., BROWN R.C., BROWN A.A., BUERMANN**
865 **D.H., BUNDU A.A., BURROWS J.C., CARTER N.P., CASTILLO N., CHIARA E**

866 CATENAZZI M., CHANG S., NEIL COOLEY R., CRAKE N.R., DADA O.O.,
867 DIAKOUMAKOS K.D., DOMINGUEZ-FERNANDEZ B., EARNSHAW D.J.,
868 EGBUJOR U.C., ELMORE D.W., ETCHIN S.S., EWAN M.R., FEDURCO M.,
869 FRASER L.J., FUENTES FAJARDO K.V., SCOTT FUREY W., GEORGE D.,
870 GIETZEN K.J., GODDARD C.P., GOLDA G.S., GRANIERI P.A., GREEN D.E.,
871 GUSTAFSON D.L., HANSEN N.F., HARNISH K., HAUDENSCHILD C.D.,
872 HEYER N.I., HIMS M.M., HO J.T., HORGAN A.M., HOSCHLER K., HURWITZ
873 S., IVANOV D.V., JOHNSON M.Q., JAMES T., HUW JONES T.A., KANG G.D.,
874 KERELSKA T.H., KERSEY A.D., KHREBTUKOVA I., KINDWALL A.P.,
875 KINGSBURY Z., KOKKO-GONZALES P.I., KUMAR A., LAURENT M.A.,
876 LAWLEY C.T., LEE S.E., LEE X., LIAO A.K., LOCH J.A., LOK M., LUO S.,
877 MAMMEN R.M., MARTIN J.W., MCCAULEY P.G., MCNITT P., MEHTA P.,
878 MOON K.W., MULLENS J.W., NEWINGTON T., NING Z., LING NG B., NOVO
879 S.M., O'NEILL M.J., OSBORNE M.A., OSNOWSKI A., OSTADAN O.,
880 PARASCHOS L.L., PICKERING L., PIKE A.C., PIKE A.C., CHRIS PINKARD D.,
881 PLISKIN D.P., PODHASKY J., QUIJANO V.J., RACZY C., RAE V.H.,
882 RAWLINGS S.R., CHIVA RODRIGUEZ A., ROE P.M., ROGERS J., ROBERT
883 BACIGALUPO M.C., ROMANOV N., ROMIEU A., ROTH R.K., ROURKE N.J.,
884 RUEDIGER S.T., RUSMAN E., SANCHES-KUIPER R.M., SCHENKER M.R.,
885 SEOANE J.M., SHAW R.J., SHIVER M.K., SHORT S.W., SIZTO N.L., SLUIS J.P.,
886 SMITH M.A., ERNEST SOHNA SOHNA J., SPENCE E.J., STEVENS K., SUTTON
887 N., SZAJKOWSKI L., TREGIDGO C.L., TURCATTI G., VANDEVONDELE S.,
888 VERHOVSKY Y., VIRK S.M., WAKELIN S., WALCOTT G.C., WANG J.,
889 WORSLEY G.J., YAN J., YAU L., ZUERLEIN M., ROGERS J., MULLIKIN J.C.,
890 HURLES M.E., MCCOOKE N.J., WEST J.S., OAKS F.L., LUNDBERG P.L.,

891 **KLENERMAN D., DURBIN R., & SMITH A.J., 2008** - Accurate whole human
892 genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, **456** (7218), 53–59.

893 **BON C., BERTHONAUD V., MAKSUD F., LABADIE K., POULAIN J.,**
894 **ARTIGUENAVE F., WINCKER P., AURY J.-M., & ELALOUF J.-M., 2012** -
895 Coprolites as a source of information on the genome and diet of the cave hyena.
896 *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, **279** (1739), 2825-2830.

897 **BOULESTIN B., DEBENATH A., GOMEZ De SOTO J., & TOURNEPICHE J.-F.,**
898 **2006** - Une nouvelle grotte ornée en Charente : l’aven du Charnier à Vilhonneur.
899 Historique d’une découverte. *Bulletin de la Société préhistorique française*, **103** (1), 172-
900 174.

901 **BRUGAL J.-P., ARGANT A., BOUDADI-MALIGNE M., CRÉGUT-BONNOURE E.,**
902 **CROITOR R., FERNANDEZ P., FOURVEL J.-B., FOSSE P., GUADELLI J.-L.,**
903 **LABE B., MAGNIEZ P., & UZUNIDIS A., 2020** - Pleistocene herbivores and
904 carnivores from France: An updated overview of the literature, sites and taxonomy.
905 *Annales de Paléontologie*, **106** (2), 102384.

906 **BUCKLAND W., 1829** - On the discovery of coprolites, or fossils faeces, in the Lias at
907 Lyme Regis, and in other formations. *Transactions of the Geological Society of London*,
908 **S2-3** (1), 223-236.

909 **COMBIER J., 1967** - *Le Paléolithique de l'Ardèche dans son cadre paléoclimatique*.
910 Bordeaux : Delmas, Bordeaux, 462 p.

911 **DEFLEUR A., DUTOUR O., & VANDERMEERSCH, B., 1992** - Étude de deux dents
912 humaines provenant des niveaux moustériens de la Baume Néron (Soyons, Ardèche).
913 *Bulletins et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris*, **4** (1-2), 127-134.

914 **DEFLEUR A., BEZ J.-F., CRÉGUT-BONNOURE E., FONTUGNE M., JEANNET,**
915 **M., MAGNIN F., TALON B., THINON M., & COMBIER J., 1994** – Industries,

916 biostratigraphie, restes humains et datation du gisement moustérien de la Baume Néron
917 (Soyons, Ardèche). *Comptes rendus de l'Académie des sciences Série II*, **318** (10), 1409-
918 1414.

919 **DEFLEUR A., 1995** - Nouvelles découvertes de restes humains Moustériens dans les dépôts
920 de la Baume Moula-Guercy (Soyons, Ardèche). *Bulletins et Mémoires de la Société*
921 *d'Anthropologie de Paris*, **7** (3-4), 185-190.

922 **DIEDRICH C.G., & ZAK K., 2006** -Prey deposits and den sites of the Upper Pleistocene
923 hyena *Crocota crocuta spelaea* (Goldfuss, 1823), in horizontal and vertical caves of the
924 Bohemian Karst (Czech Republic). *Bulletin of Geosciences*, **81** (4), 237-276.

925 **DIEDRICH C.G., 2011** - The late Pleistocene spotted hyena *Crocota crocuta spelaea*
926 (Goldfuss 1823) population with its type specimens from the Zoolithen Cave at
927 Gailenreuth (Bavaria, South Germany): a hyena cub raising den of specialised cave bear
928 scavengers in boreal forest environments of Central Europe. *Historical Biology*, **23** (4),
929 335-367.

930 **DISCAMPS E., 2011** - Hommes et hyènes face aux recompositions des communautés
931 d'Ongulés (MIS 5-3) : Eléments pour un cadre paléoécologique des sociétés Paléolithique
932 moyen et supérieur ancien d'Europe de l'Ouest. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux
933 1, Bordeaux, France. 438 p.

934 **FLAUBERT G., 1881** – *Bouvard et Pécuchet*. Alphonse Lemerre, Paris, 400 p.

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

938 **FOURVEL J.-B., FOSSE P., BRUGAL J.-P., CRÉGUT-BONNOURE E., SLIMAK L.**
939 **& TOURNEPICHE J.-F., 2014** - Characterization of bear remains consumption by

940 Pleistocene large carnivores (Felidae, Hyaenidae, Canidae). *Quaternary International*,
941 **339-340**, 232-244.

942 **FRANK L., 1994** - When hyenas kill their own. *New Scientist*, **141** (1915), 38-41.

943 **GAILLARD C., LAURENT J., & COTE C., 1933** - L'industrie et la faune de la caverne
944 moustérienne « le Trou-du-Renard » à Soyons (Ardèche). *Association française pour*
945 *l'Avancement des Sciences*, **57^{ème} session**, 338-342.

946 **GARCÍA N., & ARSUAGA J.L., 2001** - Les carnivores (Mammalia) des sites du
947 Pléistocène ancien et moyen d'Atapuerca (Espagne). *L'Anthropologie* **105**, 83-93.

948 **GARDIEN V., LECUYER C., & DERYM, F., 2009** - Reconstitution de l'évolution du
949 climat récent (- 120 000 ans à nos jours) dans la vallée du Rhône à partir de l'étude du site
950 de Soyons. *Ardèche Archéologie*, **26**, 27-29.

951 **HÉLÉNA P., 1930** - Rapport succinct des fouilles exécutées dans la grotte de la Crouzade
952 (Aude) du 9 juillet au 6 août 1930. *Archives de l'Institut de Paléontologie Humaine*, Paris,
953 8 p.

954 **HENRI-GAMBIER D., & SACCHI D., 2008** - La Crouzade V-VI (Aude, France) : un des
955 plus anciens fossiles d'anatomie moderne en Europe occidentale. *Bulletins et Mémoires*
956 *de la Société d'Anthropologie de Paris*, **20** (1-2), 79-104.

957 **HOCHMEISTER M.N., BUDOWLE B., BORER U.V., EGGMANN U., COMEY C.T.,**
958 **& DIRNHOFER R., 1991** - Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from
959 compact bone from human remains. *Journal of Forensic Sciences*, **36** (6), 1649-1661.

960 **HOFSTETTER J.R., ZHANG A., MAYEDA A.R., GUSCAR T., NURNBERGER J.I.,**
961 **& LAHIRI D.K., 1997** - Genomic DNA from mice: a comparison of recovery methods
962 and tissue sources. *Biochemical and Molecular Medicine*, **62** (2), 197-202.

963 **JÓNSSON H., GINOLHAC A., SCHUBERT M., JOHNSON P.L.F., & ORLANDO L.,**
964 **2013** - mapDamage2.0 : fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage

965 parameters. *Bioinformatics*, **29** (13), 1682–1684.

966 **KORNELIUSSEN T. S., ALBRECHTSEN A., & NIELSEN R., 2014** - ANGSD:
967 Analysis of next generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*, **15** (1), 356.

968 **KRUUK H., 1976** - Feeding and social behaviour of the striped hyaena (*Hyaena vulgaris*
969 Desmarest). *African Journal of Ecology*, **14** (2), 91-111.

970 **KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., & TAMURA K., 2018** - MEGA X :
971 molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology*
972 *and Evolution*, **35** (6), 1547–1549.

973 **KURTÉN B., 1957** - The bears and hyenas of the interglacials. *Quaternaria*, **4**, 69–81.

974 **LARKIN N.R., ALEXANDER J., & LEWIS M.D., 2000** - Using experimental studies of
975 recent faecal material to examine hyaena coprolites from the West Runton Freshwater
976 Bed, Norfolk, U.K. *Journal of Archaeological Science*, **27** (1), 19-31.

977 **LI H., & DURBIN R., 2009** - Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler
978 transform. *Bioinformatics*, **25** (14), 1754–1760.

979 **LI H., HANDSAKER B., WYSOKER A., FENNELL T., RUAN J., HOMER N.,**
980 **MARTH G., ABECASIS G., DURBIN R. & 1000 GENOME PROJECT DATA**
981 **PROCESSING SUBGROUP, 2009** - The Sequence Alignment/Map format and
982 SAMtools. *Bioinformatics*, **25** (16), 2078–2079.

983 **LUMLEY-WOODYEAR H. de., 1971** - Le Paléolithique inférieur et moyen du midi
984 méditerranéen dans son cadre géologique, t. II, Bas-Languedoc – Roussillon – Catalogne.
985 *Gallia préhistoire*, **Suppl. 5-2**, 443 p.

986 **MAGNIEZ P., 2009** - Taphonomic study of the Middle and Upper Palaeolithic large
987 mammal assemblage from Tournal Cave (Bize-Minervois, France). *Journal of*
988 *Taphonomy*, **7** (2-3), 203-233.

- 989 **MAGNIEZ P., 2010** - Étude paléontologique des Artiodactyles de la grotte Tournal (Bize-
990 Minervois) : *Étude taphonomique, archéozoologique et paléoécologique des grands*
991 *Mammifères dans leur cadre biostratigraphique et paléoenvironnemental*. Thèse de
992 Doctorat, Université de Perpignan, Perpignan, France, 916 p.
- 993 **MAGNIEZ P., & BOULBES, N., 2014** - Environment during the Middle to Late
994 Palaeolithic transition in southern France: The archaeological sequence of Tournal Cave
995 (Bize-Minervois, France). *Quaternary International*, **337**, 43-63.
- 996 **MAGOČ T., & SALZBERG S. L., 2011** - FLASH: Fast length adjustment of short reads
997 to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, **27** (21), 2957–2963.
- 998 **MARIN J., RODRIGUEZ-HIDALGO A., SALADIÉ P., BOULBES N., MAGNIEZ P.,**
999 **TESTU A., & MOIGNE A.-M., 2020** - Taphonomic analysis of horse remains from
1000 Mousterian and Aurignacian Units from Bize-Tournal cave (Aude, France). *Comptes*
1001 *Rendus Palevol*, **19** (11), 187-213.
- 1002 **MARSOLIER-KERGOAT M.-C., PALACIO P., BERTHONAUD V., MAKSUD F.,**
1003 **STAFFORD T., BÉGOUËN R., & ELALOUF J.-M., 2015** - Hunting the extinct steppe
1004 bison (*Bison priscus*) mitochondrial genome in the Trois-Frères paleolithic painted cave.
1005 *PLoS One*, **10** (6), e0128267.
- 1006 **MARTIN M., 2011** - Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput
1007 sequencing reads. *EMBnet Journal*, **17** (1), 10–12.
- 1008 **MARTIN P.S., & SHARROCK F.W., 1964** - Pollen analysis of prehistoric human feces :
1009 a new approach to ethnobotany. *American Antiquity* **30**, 168-180.
- 1010 **MASSILANI D., GUIMARAES S., BRUGAL J.-P., BENNETT E.A., TOKARSKA M.,**
1011 **ARBOGAST R.-M., BARYSHNIKOV G., BOESKOROV G., CASTEL J.-C,**
1012 **DAVYDOV S., MADELAINE S., PUTELAT O., SPASSKAYA N.N., UERPMANN**

1013 **H.-P., GRANGE T., & GEIGL E.-M., 2016** - Past climate changes, population dynamics
1014 and the origin of Bison in Europe. *BioMed Central Biology*, **14** (1), 93.

1015 **MONCEL M.-H., 2001** - Le Moustérien de type Quina de la grotte du Figuier (Ardèche)
1016 Fouilles P. et A. Huchard et R. Gilles - Des occupations en grotte de courtes durées pour
1017 une exploitation locale de l'environnement ? *Bulletin de la Société préhistorique*
1018 *française*, **98** (4), 593-614.

1019 **MONCEL M.-H., DAUJEARD C., CRÉGUT-BONNOURE E., BOULBES N., PUAUD**
1020 **S., DEBARD E., BAILON S., DESCLAUX E., ESCUDE E., ROGER T., & DUBAR**
1021 **M., 2010** - Nouvelles données sur les occupations humaines du début du Pléistocène
1022 supérieur de la moyenne vallée du Rhône (France). Les sites de l'Abri des Pêcheurs, de la
1023 Baume Flandin, de l'Abri du Maras et de la Grotte du Figuier (Ardèche). *Quaternaire*, **21**
1024 (4), p. 385-411.

1025 **MONCEL M.-H., PUAUD S., DAUJEARD C., LARTIGOT-CAMPIN A.-S., MILLET**
1026 **J.J., THEODOROPOULOU A., CRÉGUT-BONNOURE E., GÉLY B.,**
1027 **VERCOUTERE C., DESCLAUX E., ROGER T., & BOURGES F., 2012** - La Grotte
1028 du Figuier (Saint-Martin-d'Ardèche) : bilan des travaux récents sur un site du
1029 Paléolithique moyen et supérieur de la moyenne vallée du Rhône (Sud-Est de la France).
1030 *Bulletin de la Société préhistorique française*, **109** (1), 35-67.

1031 **MORIN E., MEIER J., EL GUENNOUNI K., MOIGNE A.-M., LEBRETON L.,**
1032 **RUSCH L., VALENSI P., CONOLLY J., & COCHARD D., 2019** - New evidence of
1033 broader diets for archaic *Homo* populations in the northwestern Mediterranean. *Science*
1034 *advances*, **5** (3), eaav9106.

1035 **NEI M., & KUMAR S., 2000** - Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University
1036 Press, New-York, 333 p.

1037 **PALACIO P., BERTHONAUD V., GUÉRIN C., LAMBOURDIÈRE J., MAKSUD F.,**
1038 **PHILIPPE M., PLAIRE D., STAFFORD T., MARSOLIER-KERGOAT M.-C., &**
1039 **ELALOUF J.-M., 2017** - Genome data on the extinct *Bison schoetensacki* establish it as
1040 a sister species of the extant European bison (*Bison bonasus*). *BioMed Central*
1041 *Evolutionary Biology*, **17** (1), 48.

1042 **PAUTRET-HOMERVILLE C., ARGANT A., COMBIER J., GÉLY B., & ARGANT**
1043 **J., 2011** - La Grotte Aux Ours De Châteaubourg (Ardèche, France) : Synthèse sur un
1044 gisement découvert il y a un siècle et demi. *Quaternaire*, **Hors-série** (4), 185-199.

1045 **PESQUERO, M.D., SALESA, M.J., ESPILEZ, E., MAMPEL, L., SILICEO, G.,**
1046 **ALCALA, L., 2011** - An exceptionally rich hyaena coprolites concentration in the Late
1047 Miocene mammal fossil site of La Roma 2 (Teruel, Spain): Taphonomical and
1048 palaeoenvironmental inferences. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*,
1049 **311**, 30–37.

1050 **POINAR H.N., HOFREITER M., SPAULDING W.G., MARTIN P.S.,**
1051 **STANKIEWICZ B.A., BLAND H., EVERSLED R.P., POSSNERT G., & PÄÄBO**
1052 **S., 1998** - Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops*
1053 *shastensis*. *Science*, **281** (5375), 402-406.

1054 **RAMSEY C.B., 2009** - Bayesian analysis of radiocarbon dates. *Radiocarbon*, **51** (1), 337-
1055 360.

1056 **REIMER P.J., AUSTIN W.E.N., BARD E., BAYLISS A., BLACKWELL P.G.,**
1057 **RAMSEY C.B., BUTZIN M., CHENG H., EDWARDS R.L., FRIEDRICH M.,**
1058 **GROOTES P.M., GUILDERTSON T.P., HAJDAS I., HEATON T.J., HOGG A.G.,**
1059 **HUGHEN K.A., KROMER B., MANNING S.W., MUSCHELER R., PALMER J.G.,**
1060 **PEARSON C., VAN DER PLICHT J., REIMER R.W., RICHARDS D.A., SCOTT**
1061 **E.M., SOUTHON J.R., TURNEY C.S.M., WACKER L., ADOLPHI F., BÜNTGEN**

1062 U., CAPANO M., FAHRNI S.M., FOGTMANN-SCHULZ A., FRIEDRICH R.,
1063 KÖHLER P., KUDSK S., MIYAKE F., OLSEN J., REINIG F., SAKAMOTO M.,
1064 SOOKDEO A., & TALAMO S., 2020 - The IntCal20 Northern hemisphere radiocarbon
1065 age calibration curve (0-55 cal kBP). *Radiocarbon*, **62** (4), 725-757.

1066 REINHARD K.J., & BRYANT V.M. JR., 1992 - Coprolite analysis: a biological
1067 perspective on archaeology. In M.B. Schiffer (ed.), *Archaeological Method and Theory*.
1068 The University of Arizona Press, Tucson & London, **4**, 245-288.

1069 RICHARD M., FALGUERES C., PONS-BRANCHU E., BAHAIN J.-J., VOINCHET
1070 P., LEBON M., VALLADAS H., DOLO J.-M., PUAUD S., RUE M., DAUJEARD C.,
1071 MONCEL M.-H., & RAYNAL J.-P., 2015 - Contribution of ESR/U-series dating to the
1072 chronology of late Middle Palaeolithic sites in the middle Rhône valley, southeastern
1073 France. *Quaternary Geochronology*, **30**, 529-534.

1074 ROHLAND N., POLLACK J.L., NAGEL D., BEAUVAL C., AIRVAUX J., PÄÄBO
1075 S., & HOFREITER M., 2005 - The population history of extant and extinct hyenas.
1076 *Molecular Biology and Evolution*, **22** (12), 2435-2443.

1077 SACCHI D., 1986 - Le Paléolithique supérieur du Languedoc occidental et du Roussillon.
1078 *Gallia-Préhistoire*, **Suppl. 21**, 284p.

1079 SANZ M., DAURA J., ÉGÜEZ N., & BRUGAL J.-P., 2016 - Not only hyenids: A multi-
1080 scale analysis of Upper Pleistocene carnivore coprolites in Cova del Coll Verdaguer (NE
1081 Iberian Peninsula). *Palaeogeography Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **443**, 249-262.

1082 SAOS T., 2003 - *Cadre stratigraphique, paléoclimatique et géochronologie du Languedoc-*
1083 *Roussillon au cours du Pléistocène supérieur d'après l'étude des remplissages de grottes*.
1084 Thèse de doctorat de l'Université de Perpignan, Perpignan, 253 p.

1085 SAOS T., GRÉGOIRE S., BAHAIN J.-J., HIGHAM T., MOIGNE A.-M., TESTU A.,
1086 BOULBES N., BACHELLERIE M., CHEVALIER T., BECAM G., DURAN J.-P.,

- 1087 **ALLADIO A., ORTEGA M.I., DEVIÈSE T., & SHAO Q., 2020** - The Middle and
1088 Upper Palaeolithic at La Cruzade cave (Gruissan, Aude, France) : New excavations and
1089 a chronostratigraphic framework. *Quaternary International*, **551**, 85-104.
- 1090 **SARDELLA R., & PETRUCCI M., 2012** - The earliest Middle Pleistocene *Crocota*
1091 *crocuta* (Erxleben, 1777) at Casal Selce (Rome, Italy). *Quaternary International*, **267**,
1092 103-110.
- 1093 **SOUBRIER J., GOWER G., CHEN K., RICHARDS S.M., LLAMAS B., MITCHELL**
1094 **K.J., HO S.Y., KOSINTSEV P., LEE M.S., BARYSHNIKOV G., BOLLONGINO**
1095 **R., BOVER P., BURGER J., CHIVALL D., CREGUT-BONNOURE E., DECKER**
1096 **J.E., DORONICHEV V.B., DOUKA K., FORDHAM D.A., FONTANA F., FRITZ**
1097 **C., GLIMMERVEEN J., GOLOVANOVA L.V., GROVES C., GUERRESCHI A.,**
1098 **HAAK W., HIGHAM T., HOFMAN-KAMINSKA E., IMMEL A., JULIEN M.-A.,**
1099 **KRAUSE J., KROTOVA O., LANGBEIN F., LARSON G., ROHRLACH A.,**
1100 **SCHEU A., SCHNABEL R.D., TAYLOR J.F., TOKARSKA M., TOSELLO G.,**
1101 **VAN DER PLICHT J., VAN LOENEN A., VIGNE J.-D., WOOLEY O., ORLANDO**
1102 **L., KOWALCZYK R., SHAPIRO B., & COOPER A., 2016** - Early cave art and ancient
1103 DNA record the origin of European bison. *Nature Communications*, **7**, 13158.
- 1104 **STAMATAKIS A., 2014** - RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-
1105 analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, **30** (9), 1312–1313.
- 1106 **STUART A. J., & LISTER A. M., 2014** - New radiocarbon evidence on the extirpation of
1107 the spotted hyaena (*Crocota crocuta* (Erxl.)) in northern Eurasia. *Quaternary Science*
1108 *Reviews*, **96**, 108-116.
- 1109 **TAVOSO A., 1987**. Le Moustérien de la grotte Tournal. *Cypsela*, **6**, 161-174
- 1110 **TOURNAL M., 1827** - Note sur deux cavernes à ossemens (sic), découvertes à Bire (sic),
1111 dans les environs de Narbonne. *Annales des Sciences Naturelles*, **12**, 78-82.

1112 **TURNER A., 1984** - The interpretation of variation in fossil specimens of spotted hyena
1113 (Crocuta crocuta Erxleben, 1777) from Sterkfontein valley sites (Mammalian: Carnivora).
1114 *Annals of the Transvaal Museum*, **33**, 399–418.

1115 **UTGE J., SEVEQUE N., LARTIGOT-CAMPIN A.-S., TESTU A., MOIGNE A.-M.,**
1116 **VEZIAN R., MAKSUD F., BEGOUËN R., VERNA C., SORIANO S., & ELALOUF**
1117 **J.-M., 2020** - A mobile laboratory for ancient DNA analysis. *Public Library of Science*
1118 *One*, **15** (3): e0230496.

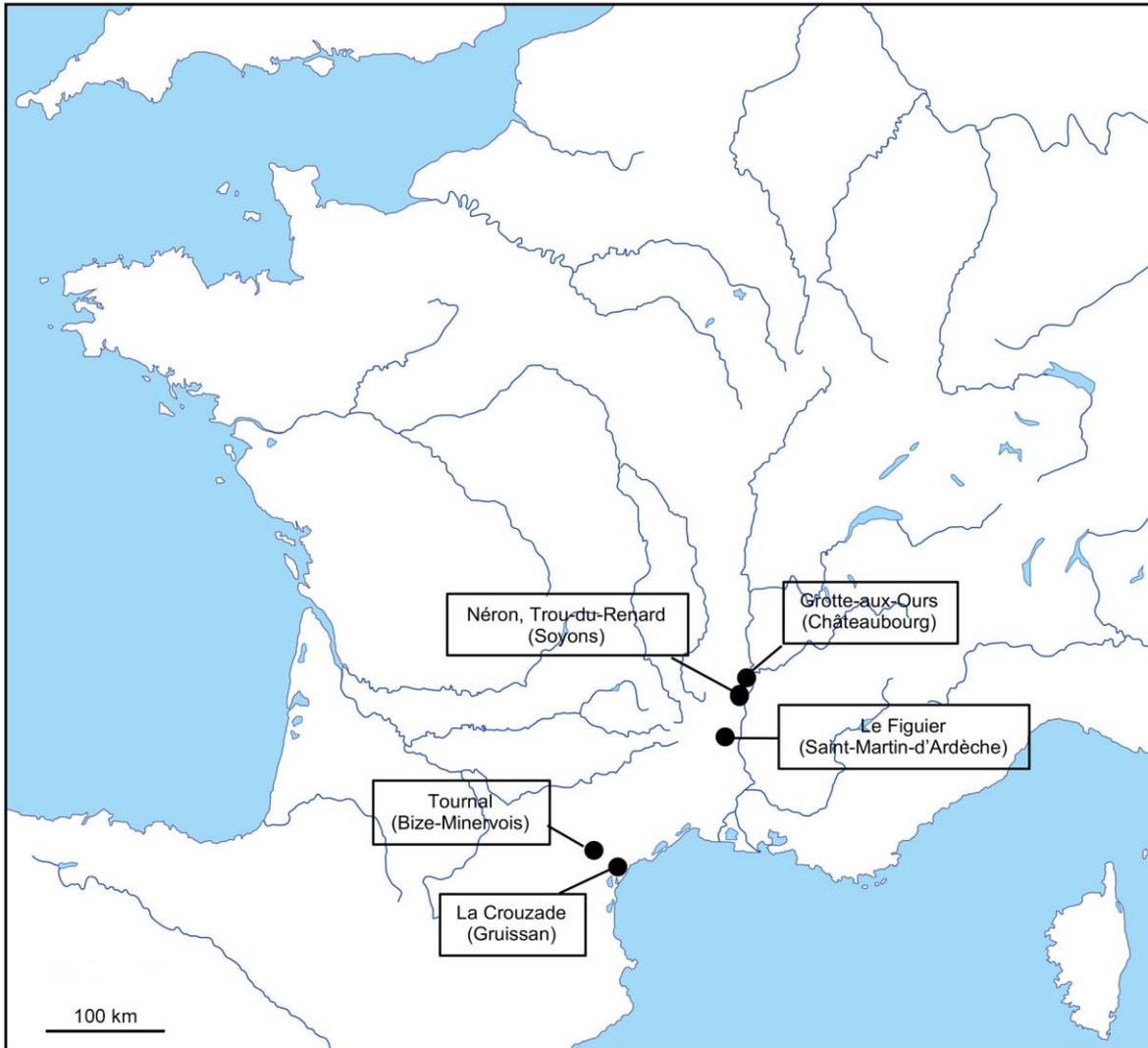
1119 **VEYRIER M., BEAUX E., & COMBIER, J., 1951** - Grotte de Néron à Soyons (Ardèche).
1120 Les fouilles de 1950, leurs enseignements. *Bulletin de la société préhistorique française*,
1121 **48** (1- 2), 70-78.

1122 **WERDELIN L., & SOLOUNIAS N., 1991** - The Hyaenidae: taxonomy, systematics and
1123 evolution. *Fossils and Strata*, **30**, 1-104.

1124 **WESTBURY M.V., HARTMANN S., BARLOW A., WIESEL I., LEO V., WELCH R.,**
1125 **PARKER D. M., SICKS F., LUDWIG A., DALÉN L., & HOFREITER M., 2018** -
1126 Extended and continuous decline in effective population size results in low genomic
1127 diversity in the world's rarest hyena species, the brown hyena. *Molecular Biology and*
1128 *Evolution*, **35** (5), 1225–1237.

1129 **WESTBURY M.V., HARTMANN S., BARLOW A., PREICK M., RIDUSH B.,**
1130 **NAGEL D., RATHGEBER T., ZIEGLER R., BARYSHNIKOV G., SHENG G.,**
1131 **LUDWIG A., WIESEL I., DALEN L., BIBI F., WERDELIN L., HELLER R., &**
1132 **HOFREITER M., 2020** - Hyena paleogenomes reveal a complex evolutionary history of
1133 cross-continental gene flow between spotted and cave hyena. *Science Advances*, **6** (11),
1134 eaay0456.

1135



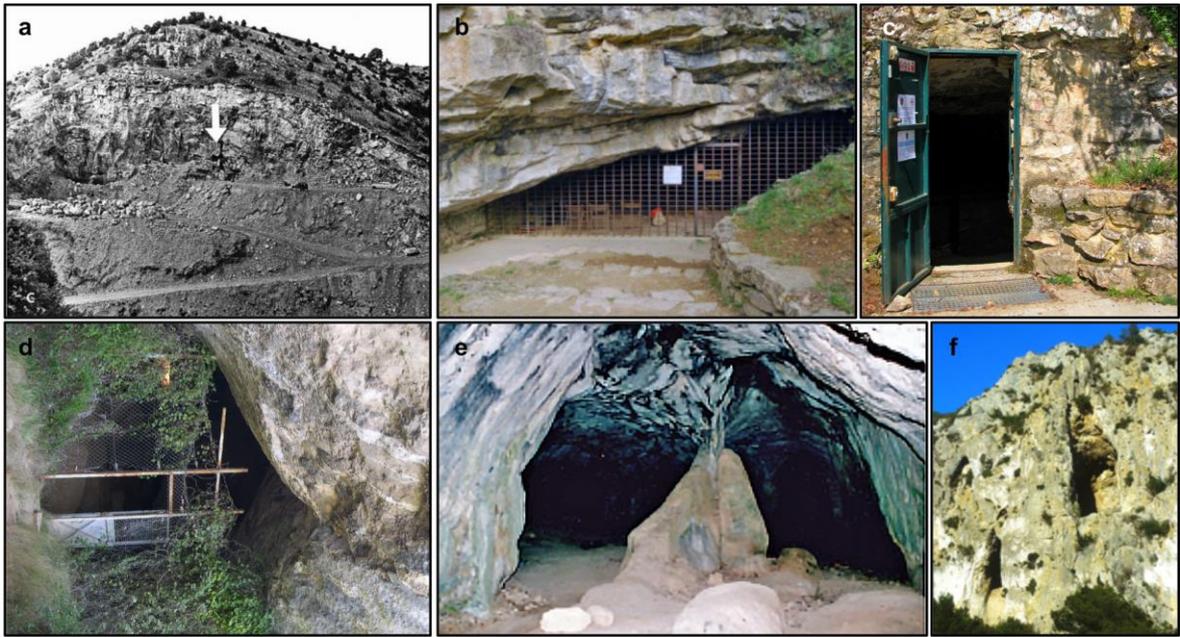
1136

1137

1138 **Fig. 1 : Localisation géographique des sites étudiés.**

1139 *Fig. 1 : Geographic location of cave sites.*

1140



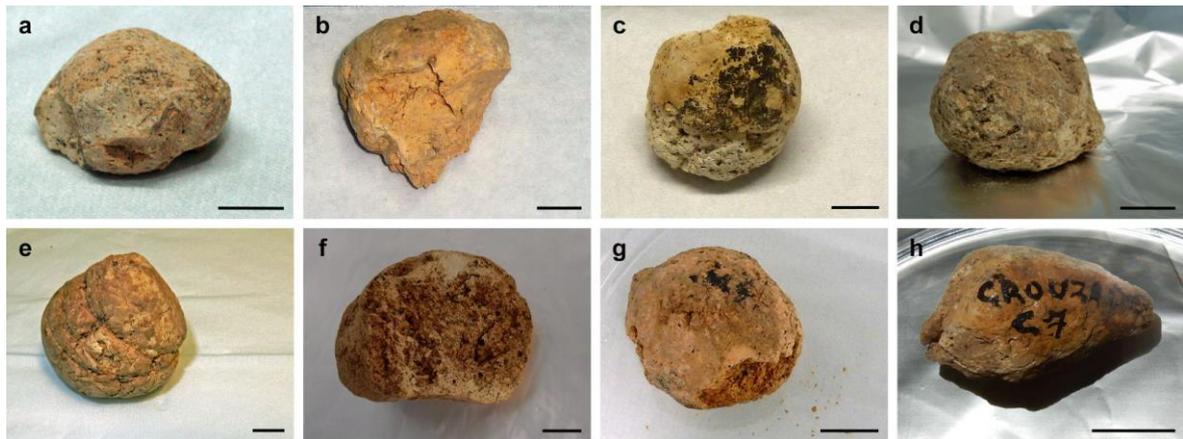
1141

1142

1143 **Fig. 2 : Les six grottes dont sont issus les coprolithes d’hyène.** (a) Grotte-aux-Ours de
 1144 Châteaubourg (la flèche blanche, sur cette photo prise en 1966, montre l’entrée de la grotte
 1145 dans la carrière). (b) Néron. (c) Trou-du-Renard. (d) Le Figuier. (e) Tournal. (f) La
 1146 Crouzade.

1147 *Fig. 2 : The six cave sites containing the coprolites analysed in the present study. (a)*
 1148 *Châteaubourg Grotte-aux-Ours ; the picture is from 1966; the white arrow shows the cave*
 1149 *entrance in 1966. (b) Néron. (c) Trou-du-Renard. (d) Le Figuier. (e) Tournal. (f) La*
 1150 *Crouzade.*

1151



1152

1153

1154 **Fig. 3 : Coprolithes analysés. (a) Châteaubourg 1. (b) Néron 2. (c) Trou-du-Renard 1. (d)**

1155 **Le Figuier 1. (e) Tournal 143. (f) Tournal 106. (g) La Crouzade 71372. (h) La Crouzade**

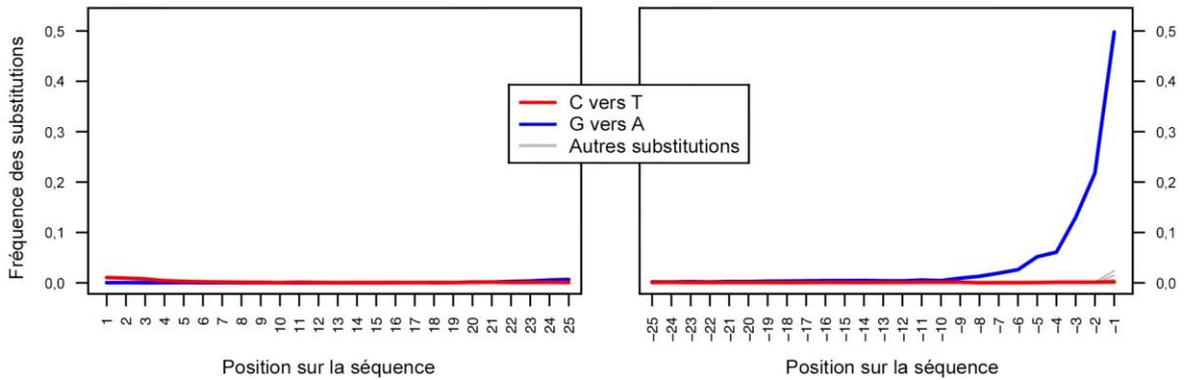
1156 **71377. Échelle : 1 cm.**

1157 *Fig. 3 : Coprolithes analysed in the present study. (a) Châteaubourg 1. (b) Néron 2. (c)*

1158 *Trou-du-Renard 1. (d) Le Figuier 1. (e) Tournal 143. (f) Tournal 106. (g) La Crouzade*

1159 *71372. (h) La Crouzade 71377. Scale : 1 cm.*

1160



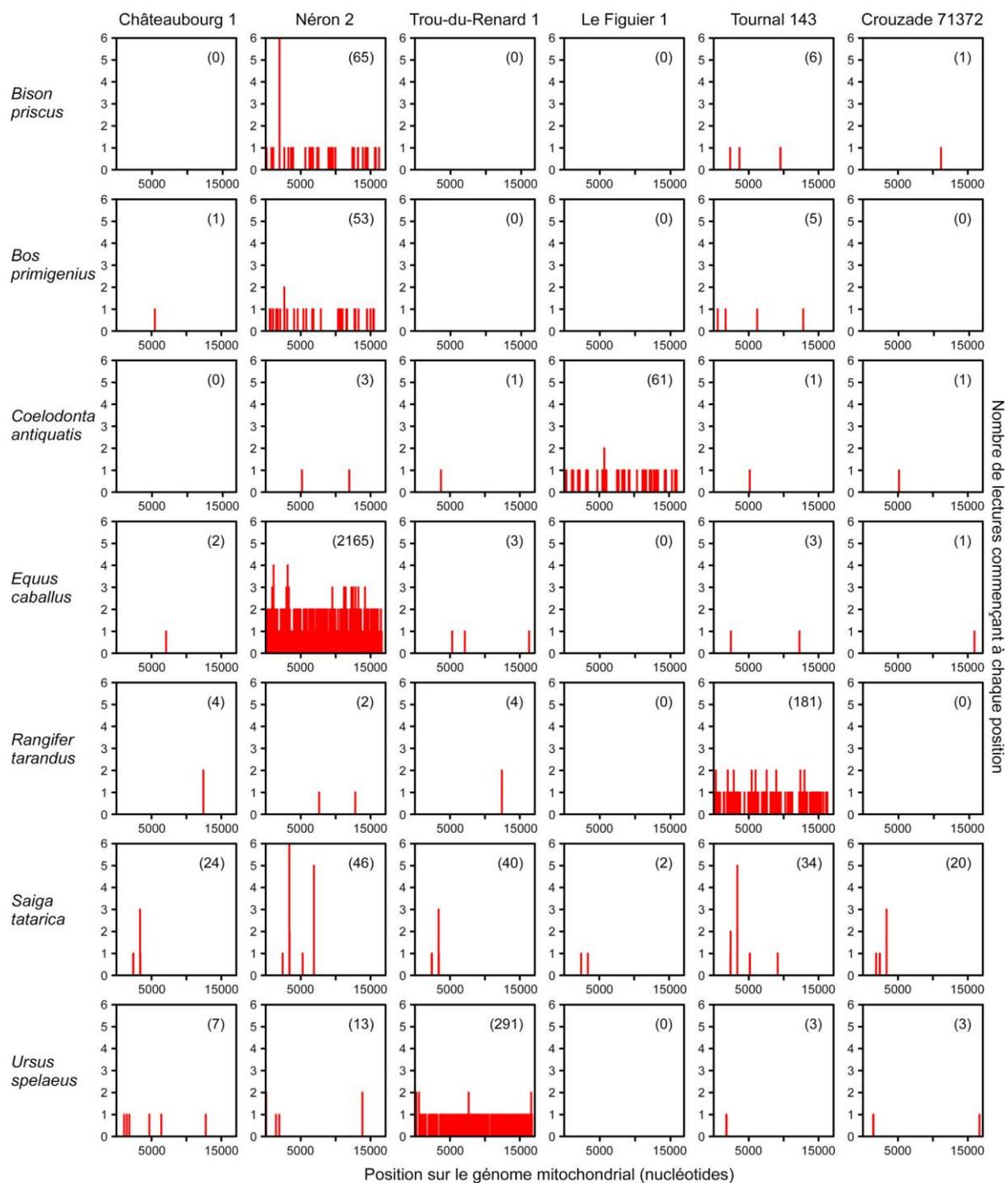
1161

1162

1163 **Fig. 4 : Endommagement de l'ADN.** Position des substitutions sur les lectures utilisées
 1164 pour reconstruire la séquence du génome mitochondrial d'hyène à partir du coprolithe Néron
 1165 2. Les fréquences de substitution par rapport à la séquence consensus sont tracées en fonction
 1166 de la distance aux extrémités 5' (panneau de gauche) et 3' (panneau de droite) des lectures.

1167 *Fig. 4 : Pattern of ancient DNA damage. Positions of the mismatches in DNA reads used to*
 1168 *reconstruct the hyena mitochondrial genome sequence of the Néron 2 coprolite. Substitution*
 1169 *frequencies, calculated by comparing individual reads to the consensus sequence, are*
 1170 *plotted as a function of the distance from the 5' end (left panel) or the 3' end (right panel) of*
 1171 *the reads.*

1172



1173

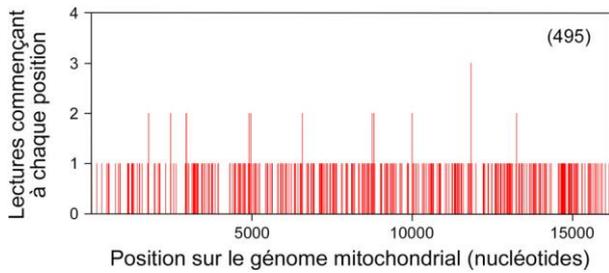
1174

1175 **Fig. 5 : Nombre et position de l'extrémité 5' des lectures s'alignant sur le génome**
 1176 **mitochondrial des espèces indiquées.** Seules les lectures uniques s'alignant sans insertion,
 1177 délétion ou mésappariement sont prises en considération ; les valeurs supérieures à 1
 1178 indiquent que plusieurs lectures de tailles différentes commencent à la même position du

1179 génome. Le nombre total de lectures s'alignant sur le génome de chaque espèce est indiqué
1180 entre parenthèses (voir tab. 3).

1181 *Fig. 5 : Number and 5' end position of unique DNA reads aligning to the mitochondrial*
1182 *genomes of the indicated species. Numbers in brackets indicate the total number of reads*
1183 *that align with a perfect match to each genome (see tab. 3). At a given position of a genome,*
1184 *values greater than 1 indicate the alignment of several reads of different lengths.*

1185



1186

1187

1188 **Fig. 6 : Nombre et position de l'extrémité 5' des lectures du coprolithe de la Baume**

1189 **Néron s'alignant sur le génome mitochondrial du bison des forêts (*Bison***

1190 ***schoetensacki*). Seules les lectures uniques s'alignant sans insertion, délétion ou**

1191 **mésappariement sont prises en considération ; les valeurs supérieures à 1 indiquent que**

1192 **plusieurs lectures de tailles différentes commencent à la même position du génome. Le**

1193 **nombre total de lectures s'alignant sur le génome mitochondrial de *Bison schoetensacki* est**

1194 **indiqué entre parenthèses.**

1195 *Fig. 6 : Number and 5' end position of unique DNA reads aligning to the Bison*

1196 *schoetensacki mitochondrial genome. Number in brackets indicate the total number*

1197 *of reads that align with a perfect match to the Bison schoetensacki mitochondrial genome.*

1198 *At a given position of the genome, values greater than 1 indicate the alignment of several*

1199 *reads of different lengths.*

1200

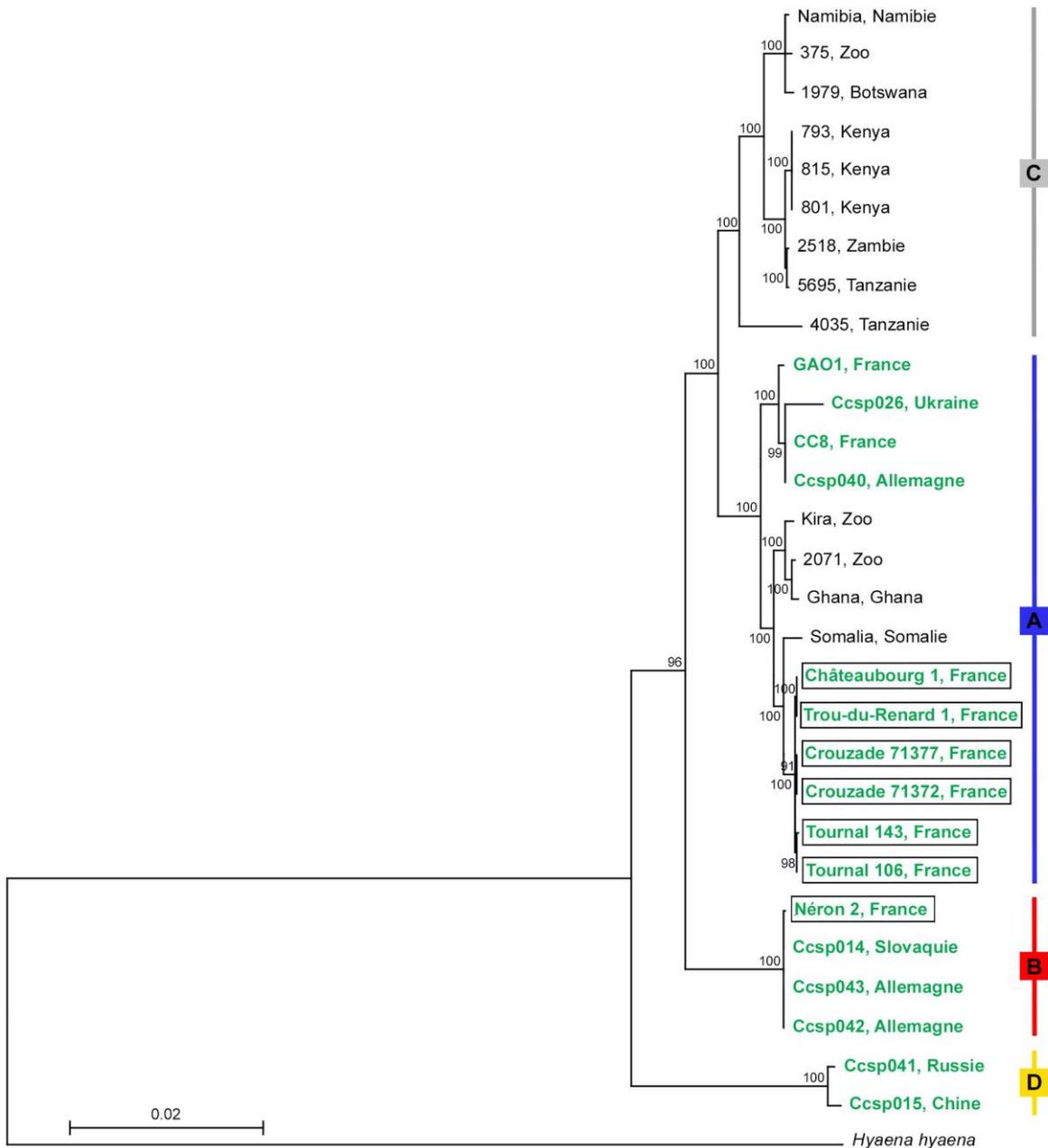
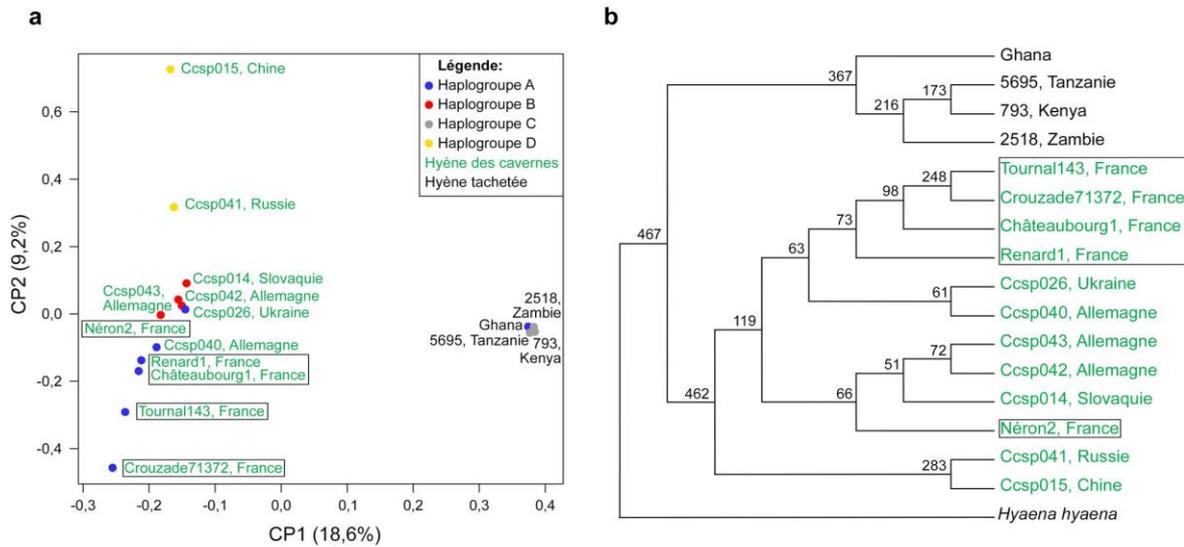


Fig. 7 : Arbre phylogénétique de génomes mitochondriaux d’hyènes établi avec la méthode du maximum de vraisemblance. Les caractères noirs correspondent aux échantillons d’hyènes modernes, les caractères verts aux échantillons d’hyène des cavernes ; ceux de la présente étude sont encadrés. A, B, C et D correspondent aux quatre haplogroupes mitochondriaux. La figure montre l’arbre présentant la plus forte valeur de vraisemblance, avec la longueur des branches proportionnelle au nombre de substitutions par site. Le

1209 pourcentage des arbres contenant les regroupements observés est indiqué à côté des branches
1210 (valeurs déterminées avec 100 répétitions).

1211 *Fig. 7: Phylogenetic analysis of Crocuta crocuta mitochondrial genome sequences.*
1212 *Phylogenetic analysis was performed using the Maximum Likelihood method. The tree with*
1213 *the highest log likelihood is shown, and the percentage of trees in which the associated taxa*
1214 *clustered together is shown next to the nodes (100 bootstrap replicates were performed for*
1215 *this analysis). Black characters correspond to extant spotted hyena specimens, green*
1216 *characters refer to Pleistocene cave hyena samples, and samples analysed in the present*
1217 *study are boxed. A-D: mitochondrial haplogroups.*

1218



1219

1220

1221 **Fig. 8. Analyse des génomes nucléaires d'hyènes actuelles et anciennes.** Les caractères

1222 noirs correspondent aux échantillons d'hyènes modernes, les caractères verts aux

1223 échantillons d'hyène des cavernes, et ceux de la présente étude sont encadrés. **(a)** Analyse

1224 en composantes principales des polymorphismes nucléotidiques. La couleur des points

1225 correspond aux haplogroupes mitochondriaux définis dans la Fig. 7. **(b)** Arbre consensus

1226 pour les génomes nucléaires des hyènes anciennes et modernes. L'arbre a été construit à

1227 partir de 467 arbres partiels déterminés par la méthode du maximum de vraisemblance sur

1228 des segments non chevauchants de 2 millions de paires de bases du génome nucléaire. Les

1229 nombres au niveau des branches représentent le nombre d'arbres partiels contenant les

1230 regroupements observés ici.

1231 *Fig. 8. Analysis of extant and ancient hyena nuclear genomes. Black characters correspond*

1232 *to extant spotted hyena specimens, green characters refer to Pleistocene cave hyena*

1233 *samples, and samples analysed in the present study are boxed. (a) Principal component*

1234 *analysis of genome-wide single nucleotide polymorphisms. Dot colours correspond to the*

1235 *mitochondrial haplogroups characterized in Fig. 7. (b) Consensus phylogenetic tree for*

1236 *extant and ancient hyena genomes. Tree construction was performed using the 467 partial*

1237 *trees obtained using the Maximum Likelihood method applied to non-overlapping 2 Mbp*
1238 *windows of the nuclear genome. Numbers next to nodes correspond to the number of partial*
1239 *trees with the indicated clustering of samples.*
1240

1241 **Tab. 1 : Nombre total des lectures de taille supérieure ou égale à 30 nucléotides**
 1242 **analysées pour chaque échantillon, nombre total de lectures uniques alignées sur le**
 1243 **génom mitochondrial de référence de *Crocota crocuta* et valeur médiane de la**
 1244 **couverture du génom mitochondrial de *Crocota crocuta* reconstruit. § : lectures**
 1245 **alignées en acceptant des mésappariements pour la reconstitution du génome de**
 1246 ***Crocota crocuta* (voir Méthodes 3.7).**

1247 *Tab. 1 : Number of DNA reads with a size greater than or equal to 30 nucleotides for each*
 1248 *coprolite sample, number of reads aligned to the reference mitochondrial *Crocota crocuta**
 1249 *genome, and median value for the reconstructed *Crocota crocuta* mitochondrial genome*
 1250 *sequence. § : reads aligned allowing mismatches to reconstruct the *Crocota crocuta**
 1251 *mitochondrial genome sequence (see Methods 3.7).*

Coprolithe	Total des lectures	Lectures mitochondriales[§]	Couverture du génome mitochondrial
Châteaubourg 1	61 224 425	21 072	53
Néron 2	253 218 903	22 131	53
Trou-du-Renard 1	99 246 370	25 759	65
Figuier 1	159 449 129	1 440	3
Tournal 143	150 442 913	12 394	32
Tournal 106	145 315 673	4 295	9
Crouzade 71372	157 008 871	12 493	34
Crouzade 71377	144 514 555	2 748	6

1252

1253 **Tab. 2 : Nombre de lectures de chaque banque de coprolithe s’alignant sur le génome**
1254 **nucléaire de l’hyène rayée et couverture moyenne du génome nucléaire.**

1255 *Tab. 2 : Number of DNA reads of each coprolite library aligned to the striped hyena genome*
1256 *and mean coverage values of the nuclear genome.*

Coprolithe	Lectures nucléaires	Couverture nucléaire
Châteaubourg 1	20 799 127	0,36
Néron 2	25 075 583	0,40
Trou-du-Renard 1	23 978 322	0,41
Tournal 143	7 564 322	0,13
Crouzade 71372	21 912 482	0,39

1257

1258

1259 **Tab. 3 : Nombre de lectures uniques (non dupliquées) de chaque banque de coprolithe s'alignant sans insertion, délétion ou**
 1260 **mésappariement sur le génome mitochondrial des espèces indiquées.** Le nombre de lectures s'alignant sur chaque génome est indiqué ; les
 1261 valeurs entre parenthèses correspondent au nombre de lectures alignées après normalisation du nombre total de lectures pour chaque banque à
 1262 100 millions. Les espèces sont classées par ordre décroissant de la somme des lectures pour les 8 coprolithes.

1263 *Tab. 3 : Number of unique DNA reads from each library aligning with a perfect match to the mitochondrial genomes sequences of the indicated*
 1264 *species. The table shows the number of reads aligned to each without or with (numbers in brackets) normalization of the total number of reads*
 1265 *for each library to 100 million. Species are sorted in decreasing order according to the total number of reads for the 8 coprolites.*

Génome mitochondrial	Châteaubourg 1	Néron 2	Renard 1	Figuier 1	Tournal 143	Tournal 106	Crouzade 71372	Crouzade 71377
<i>Crocota crocuta</i>	12 853 (20 993)	10 573 (4 175)	16 813 (16 941)	651 (408)	7 294 (4 848)	2 140 (1 473)	7 347 (4 679)	1 312 (908)
<i>Equus caballus</i>	2 (3)	2 165 (855)	3 (3)	0 (0)	3 (2)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
<i>Ursus spelaeus</i>	7 (11)	13 (5)	291 (293)	0 (0)	3 (2)	0 (0)	3 (2)	2 (1)
<i>Rangifer tarandus</i>	4 (7)	2 (1)	4 (4)	0 (0)	181 (120)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Saiga tatarica</i>	24 (39)	46 (18)	40 (40)	2 (1)	34 (23)	2 (1)	20 (13)	5 (3)
<i>Bison priscus</i>	0 (0)	65 (26)	0 (0)	0 (0)	6 (4)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
<i>Coelodonta antiquitatis</i>	0 (0)	3 (1)	1 (1)	61 (38)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
<i>Bos primigenius</i>	1 (2)	53 (21)	0 (0)	0 (0)	5 (3)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
<i>Cervus elaphus</i>	10 (16)	9 (4)	9 (9)	1 (1)	10 (7)	0 (0)	7 (4)	0 (0)
<i>Homo sapiens</i>	6 (10)	2 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)	9 (6)	24 (17)
<i>Martes foina</i>	9 (15)	11 (4)	12 (12)	0 (0)	4 (3)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
<i>Canis lupus</i>	3 (5)	14 (6)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
<i>Mammuthus primigenius</i>	2 (3)	11 (4)	1 (1)	0 (0)	5 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Sus scrofa</i>	3 (5)	4 (2)	2 (2)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	2 (1)	0 (0)
<i>Talpa europaea</i>	3 (5)	4 (2)	4 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Apodemus agrarius</i>	1 (2)	2 (1)	2 (2)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	2 (1)	0 (0)

<i>Alytes obstetricans</i>	0 (0)	2 (1)	2 (2)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	1 (2)	2 (1)	2 (2)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Falco peregrinus</i>	2 (3)	1 (1)	3 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Capra ibex</i>	2 (3)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Erinaceus europaeus</i>	1 (2)	1 (1)	2 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Corvus frugilegus</i>	0 (0)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Lepus europaeus</i>	0 (0)	3 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Anas platyrhynchos</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
<i>Microtus kikuchii</i>	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Otis tarda</i>	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Sorex unguiculatus</i>	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Alectoris chukar</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Anguilla anguilla</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Apis mellifera</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Buteo buteo</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Esox lucius</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Podarcis muralis</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Salmo trutta</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Sciurus vulgaris</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

1266

1267

1268 **Tab. 4 : Datation radiocarbone des coprolithes d'hyène.** L'âge radiocarbone est indiqué en années avant le présent (BP). L'âge calibré
 1269 (cal. BP) avec un intervalle de confiance de 95,4% (2σ) a été déterminé au moyen de la courbe de calibration IntCal20. [§] : masse de carbone (%
 1270 du total) dans la fraction du coprolithe insoluble dans l'acide. [‡] : masse de carbone graphite utilisée pour la datation.

1271 *Tab. 4 : AMS radiocarbon dates for cave hyena coprolites. The measured radiocarbon ages are indicated in years before present (BP).*

1272 *Calibrated dates (cal. BP) were calculated using the IntCal20 calibration curve and are displayed with a 95.4% (2σ) confidence interval. [§] :*

1273 *carbon (% C) is percent of the coprolite insoluble in 0.6N HCl. [‡]: mass of graphitised carbon used for dating.*

Coprolithe	AMS Lab n°	C (%) [§]	C graphite (µg) [‡]	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Âge ¹⁴ C (BP)	Âge ¹⁴ C (cal. BP)	Haplogroupe
Néron 2	UCIAMS-143991	1,3	280	-20,4 ± 0,1	26 270 ± 130	30 890-30 180	B
Trou-du-Renard 1	UCIAMS-143995	0,9	230	-21,2 ± 0,1	21 240 ± 90	25 800-25 290	A
Châteaubourg 1	UCIAMS-143993	5,4	280	-22,0 ± 0,1	33 930 ± 240	39 670-38 000	A

1274