

Analyse de la préservation de l'ADN dans les ossements des rongeurs de Temara, Maroc, en remontant dans le temps

Analysis of DNA preservation in the rodent bones of Temara, Morocco, going back in time

Eva-Maria GEIGL^{1*}, Silvia GUIMARAES¹, Emmanuelle STOETZEL², Yolanda FERNANDEZ-JALVO³, Roland NESPOULET⁴, Christiane DENYS², Thierry GRANGE¹

1. Institut Jacques Monod, Equipe Epigénome et Paléogénome, 15 rue Hélène Brion, 75013 Paris, France

(guimaraes.silvia@ijm.univ-paris-diderot.fr); (thierry.grange@univ-paris-diderot.fr); (geigl.eva-maria@ijm.univ-paris-diderot.fr)

2. Muséum national d'Histoire naturelle, Département Systématique & Evolution, UMR7205 ISYEB CNRS-MNH-EPHE-UPMC, CP51-Mammifères & Oiseaux, 55, rue Buffon, 75005 Paris, France; (stoetzel@mnhn.fr); (denys@mnhn.fr)

3. Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), Département Paleobiología, Jose Gutierrez Abascal, 2, 28006 Madrid, Espagne ; (yff@mncn.csic.es)

4. Muséum national d'histoire naturelle, Département de Préhistoire - UMR 7194 du CNRS, 43 rue Buffon, 75005 Paris, France ; (roland.nespoulet@mnhn.fr)

Résumé : Nous présentons notre étude génétique d'ossements anciens de la macro- et microfaune préservés dans les grottes El Harhoura 2 et El Mnasra à Temara, Maroc, ainsi qu'une étude taphonomique quantitative concernant la dégradation de l'ADN dans les ossements digérés par les rapaces, principaux responsables des accumulations actuelles et fossiles de rongeurs. Les résultats de cette étude sont multiples : (1) Aucun produit d'amplification d'ADN n'a été obtenu à partir des ossements d'aurochs et d'ânes sauvages préservés dans les grottes de Temara datés de ~44 000 ans (date ESR-U/Th) à ~74 000 ans (date OSL) et il en a été conclu que l'ADN n'était pas préservé dans ces ossements. (2) Les processus taphonomiques à l'œuvre dans les ossements de rongeurs, accumulés par les rapaces, sont différents de ceux de ces gros mammifères, accumulés par les êtres humains ou les grands carnivores. Nous avons alors exploré les premiers en quantifiant l'ADN contenu dans les ossements et dents de rongeurs issus de pelotes de réjection actuelles de rapaces provenant du Maroc. Nous avons déterminé que la plupart des molécules d'ADN est dégradée lors de cette digestion initiale et qu'il n'en reste que de 10 à 0.1% de la quantité initiale avec une taille moyenne variant de 40 à 1.000 paires de bases. L'étendue de la dégradation paraît indépendante du rapace et de la partie squelettique de la proie. (3) Le développement d'une nouvelle approche basée sur la PCR multiplexe et le séquençage massivement parallèle de nouvelle génération et son application à des ensembles d'os récupérés aseptiquement à partir de carottes des différents niveaux stratigraphiques des grottes de Temara a permis l'obtention de résultats génétiques pour les os de deux niveaux différents d'El Harhoura 2 datés jusqu'à 70.000 ans. Ces résultats suggèrent une continuité génétique des lignées mitochondriales de mériones dans les environs de Temara depuis le début du Pléistocène supérieur jusqu'à aujourd'hui. La meilleure préservation de l'ADN dans les os de micromammifères que dans ceux de macromammifères anciens suggère que le processus de digestion initiale par le rapace doit créer un terrain favorable à la préservation à long terme de l'ADN résiduel.

Mots clés : Paléogénétique, ADN ancien, rongeurs, phylogénie, écologie, taphonomie

Abstract : We present our genetic study of ancient bones of macro and micro fauna preserved in the caves El Harhoura 2 and El Mnasra in Temara, Morocco, as well as a quantitative taphonomic study concerning the degradation of DNA in bones that had been digested by birds of prey, principal agent for modern and fossil rodent accumulations. This study yielded multiple results : (1) No DNA amplification product had been obtained from the aurochs and ass bones preserved in stratigraphic layers of the caves of Temara dated from ~44,000 years (ESR-U/Th dating) to ~74,000 years BP (OSL dating). We concluded that DNA was not preserved in these bones. (2) Since the taphonomic processes that occur in rodent bones, accumulated by birds of prey, are different from those of the big mammals, accumulated by humans or large carnivores, we have first explored and quantified the DNA preserved in bones and teeth of present-day pellets of birds of prey from Morocco. We determined that the majority of DNA molecules is degraded during this initial digestion and that no more than 10 to 0.1% of the initial DNA amount remains and that DNA molecules have an average size varying from 40 to 1,000 base pairs. The degree of degradation was independent of the species of bird of prey and of the skeletal parts of the prey. (3) We developed a new approach based on multiplex PCR and next generation sequencing and used it to analyze pools of bones that had been recovered aseptically from cores removed from different stratigraphic layers of the caves in Temara. This allowed us to obtain genetic results from bones in two different stratigraphic layers from El Harhoura 2 dated to up to 70,000 years BP. These results suggest genetic continuity of the mitochondrial lineages of meriones in the surroundings of Temara since the beginning of the Late Pleistocene. DNA preservation being better in microfaunal remains than in those of the macromammals we hypothesize that the process of initial digestion through birds of prey is favorable for long-term preservation of residual DNA.

Keywords : Paleogenetics, ancient DNA, rodents, phylogeny, ecology, taphonomy

Abridged English Version

The palaeogenetic study of DNA preserved in skeletal remains from organisms that died long ago is invaluable for the understanding of the evolution of species, population dynamics, the impact of climate change and human activities

on populations, and the interpretation of archaeological sites. DNA in ancient remains, however, is degraded and difficult to analyze. The degree of degradation depends mainly on the temperature; which explains why so far ancient biological

remains from areas with arid or hot-humid climate rarely yielded palaeogenetic results, in contrast to those originating from cold and permafrost regions. The evolution of many species, including humans, however, took place in those areas with tropical dry or wet or with arid climate, such as Morocco, which is a hot spot of biodiversity and of human evolution (Myers, *et al.* 2000, El Hajraoui, *et al.* 2012). We were interested in analyzing faunal remains from two caves, El Harhoura 2 and El Mnasra, in Temara, Central Morocco, despite the methodological challenges we were facing. These caves have a stratigraphy spanning 120,000 years which has recorded major climatic fluctuations such as glaciations and warming periods as well as a succession of human evolutionary stages and cultures (Nespoulet, *et al.* 2008, Jacobs, *et al.* 2012, Stoetzel, *et al.* 2014).

Since DNA preservation among skeletal remains is supposed to be best in long macrofaunal bones with a thick cortex, we started our analysis with bones from aurochs and wild asses preserved in various layers from these two caves. Despite powerful, sensitive analysis methods (Champlot *et al.* 2010), these remains did not yield paleogenetic results. This negative result discouraged the perspectives that DNA would be preserved in the tiny, fragile bones of small mammals with their thin cortex. In addition, prior to burial of the remains in the cave sediments, DNA in the bones of small mammals would have been hydrolyzed through the acidic gastric juices of birds of prey since most of these remains are the regurgitated rests of animals that had been preys of predators (Andrews 1990). Therefore, the chances of long term DNA preservation in rodent bones from these caves appeared slim. In order to assess the chances of success, we sought first to better characterize the extent of DNA degradation in microvertebrate bones following digestion in the stomach of bird of prey.

The determination using quantitative real-time PCR of the quantity of short DNA molecules of various sizes in skeletal remains recovered from three owl and one falcon pellet collected in Morocco (Fig. 1) allowed us to determine that on average only 1% (between 10 and 0.1%) of the DNA contained in the bones of a living mouse “survives” the acidic attack of the gastric juices in the stomach of the raptor (Guimaraes, *et al.* submitted). The DNA molecules had an average size of roughly 121 base pairs (bp) while intact mammal chromosomes have an average size of about 120 million bases, i.e., they are one million times longer (Guimaraes, *et al.* submitted). A very small fraction of the bones, however, proved to contain preserved DNA molecules up to 1,400 bp long. Thus, DNA in skeletal remains recovered from regurgitated pellets of birds of prey is heavily degraded but not in a uniform manner among the different bones. In our experimental data set, this

degradation varied from bone to bone but was independent of the skeletal part of the prey, the owl species, the age of the pellet (up to 26 years) and the degree of digestion of the bone as determined through taphonomic analysis via scanning electron microscopy (Guimaraes *et al.* submitted).

In order to give a chance to the palaeogenetic analysis of skeletal remains of small mammals from the caves of Temara to be successful, we developed a bulk bone approach to increase the likelihood of being able to genotype minute quantities of DNA molecules preserved in a presumably minor fraction of the bones. This approach, which we called aMPlex Torrent, takes advantage of the power and selectivity of the polymerase chain reaction (PCR) combined with the efficiency of next generation sequencing to analyze, at relatively low costs, a large number of samples, independently barcoded, and a large number of genetic markers, through multiplex PCR (Guimaraes *et al.* in preparation). We used this approach on the skeletal remains from the cores that we had aseptically recovered from the different stratigraphic layers of the caves of El Harhoura 2 and El Mnasra (Fig. 2). The bones were ground together, and DNA was extracted and purified from the pooled bone powder and analyzed via the aMPlex Torrent approach. We used a combination of PCR primers allowing to genotype and characterize all rodent species for which mitochondrial DNA was available in the data bank. This procedure yielded DNA sequences from the genus *Meriones* from layers 1 and 4a of El Harhoura 2 (Guimaraes *et al.* in preparation). No DNA sequences were obtained from the other layers of El Harhoura2 and none from El Mnasra. The obtained DNA sequences clustered together with DNA sequences from present-day *Meriones* of Morocco, but not with those from Algeria and Tunisia which had been analyzed previously (Lalis *et al.* submitted). Thus, these results are in agreement with a continuous presence in the area of Temara of the Western clade of *Meriones* from the Middle Pleistocene, ~47,000 to 74,000 years ago, to the present, although we cannot rule out extinction and recolonization of this clade in between the Middle Pleistocene and the Middle Holocene, period for which we have no data. Morphological data, however, do not support extinction events and also argue in favor of a stasis (Stoetzel *et al.* 2012).

To conclude, we found DNA to be better preserved in microfaunal remains than in those of the macromammals. We hypothesize that the process of initial digestion through birds of prey is favorable for long-term preservation of residual DNA preserved in molecular niches, at least in a subset of the bones (Geigl 2002)

INTRODUCTION

Les vestiges d'animaux préservés dans les remplissages sédimentaires stratifiés en grottes peuvent livrer de nombreuses informations sur le passé, du climat jusqu'aux activités humaines. Ces informations enregistrées dans les os et dents d'animaux peuvent être récupérées par des approches scientifiques variées. Une de ces approches est la

paléogénétique, qui étudie tout ou partie des génomes préservés dans les fossiles. L'information génétique ne permet pas seulement l'identification taxonomique des fossiles mais aussi l'étude de l'évolution des espèces et populations dans le temps et dans l'espace. Les vestiges d'animaux préservés dans la stratigraphie d'une grotte peuvent ainsi livrer des informations génétiques traduisant

l'évolution des populations ainsi que leur extinction et remplacement par d'autres.

L'analyse de l'ADN préservé dans les fossiles, appelé « ADN ancien », n'est pourtant pas facile techniquement à cause de la dégradation des molécules au cours du temps. En fait, ces molécules sont fragmentées en tout petits bouts, leur quantité est dramatiquement réduite et leurs extrémités sont transformées chimiquement entraînant des erreurs dans la lecture de la séquence des nucléotides, les unités de base des molécules d'ADN (pour revue voir Geigl & Grange (2014)). Ces caractéristiques de l'ADN ancien font que son analyse n'est pas triviale et requiert des précautions et méthodes particulières, en commençant par un laboratoire de haut confinement minimisant la contamination avec de l'ADN moderne. De plus, il faut adopter des procédures expérimentales très strictes afin de minimiser la contamination des extraits fossiles avec de l'ADN de l'expérimentateur, mais aussi provenant des étapes expérimentales précédentes, ou d'autres sources d'ADN produites dans le laboratoire. Il faut également éliminer les contaminations des réactifs utilisés lors de l'amplification de l'ADN ancien ainsi que celles dues aux molécules produites lors des analyses précédentes (Champlot *et al.* 2010). Enfin, il faut adapter les méthodes d'analyse d'ADN à la faible quantité de matériel génétique fossile et à la petite taille de ces molécules.

Dans le cadre du projet « MOHMIE », nous avons cherché à étudier l'ADN des rongeurs préservés dans la stratigraphie de deux grottes (El Harhoura 2 et El Mnasra) à Témara au Maroc, afin d'identifier et caractériser la dynamique de ces populations au cours du temps. Ces grottes présentent des séquences stratigraphiques couvrant le dernier cycle climatique (~120 000 – 6 000 ans BP) (Daugas *et al.* 1998, Nespoulet *et al.* 2008, El Hajraoui *et al.* 2012, Jacobs *et al.* 2012, Janati-Idrissi *et al.* 2012, Stoetzel *et al.* 2014) et sont les témoins de la mise en place des hommes modernes et des faunes associées sur le littoral du Maroc. Les populations de rongeurs sont généralement considérées comme des bio-indicateurs environnementaux, aussi bien des changements climatiques que des migrations, implantations et activités humaines (Vigne & Valladas 1996, Hadly *et al.* 2004, Brace *et al.* 2012). La dynamique de la diversité génétique des populations de rongeurs au cours du temps est donc révélatrice des changements climatiques et du peuplement d'une région géographique, et c'est pour cela qu'il s'agit d'un objet d'étude privilégié (Hadly *et al.* 2004). Le but principal de la présente étude était donc d'analyser l'évolution au cours des derniers 120.000 ans de la diversité génétique des rongeurs préservés dans les différents niveaux des grottes de Témara afin d'identifier la durée des lignées mitochondriales ainsi que des éventuelles ruptures dues à des extinctions et/ou remplacements de populations.

Le deuxième but de la présente étude s'inscrit dans une analyse taphonomique. En effet, le climat chaud et aride au Maroc n'est pas favorable à la préservation de l'ADN car la dégradation est surtout fonction de la température (Smith *et al.* 2001). Les os des rongeurs anciens accumulés sur un site archéologique ou paléontologique sont essentiellement des vestiges de repas de différents prédateurs, le plus souvent des rapaces, et ont donc subi un passage dans leur tube

digestif au début de leur histoire taphonomique (Andrews 1990). L'acidité des sucs gastriques étant élevée chez tout prédateur, et l'ADN étant sensible à l'hydrolyse acide, on peut s'attendre à ce que l'ADN soit déjà fortement dégradé quand la pelote contenant les restes du repas, et surtout les os, dents et poils, est régurgitée. Bien qu'il ait été montré que l'ADN peut être analysé dans les os de rongeurs récupérés de pelotes actuelles (Taberlet & Fumagalli 1996), il était souhaitable de mieux caractériser et quantifier la dégradation de l'ADN dans des os de rongeurs dans les pelotes fraîches afin de connaître l'état biochimique du matériel génétique avant l'enfouissement des os dans le sédiment. Nous cherchions à savoir quelle était la qualité et la quantité d'ADN que l'on pouvait extraire à partir de cette source de matériel, quelles étaient les pièces squelettiques les plus favorables à la récupération et quelle était la variabilité de la conservation de l'ADN observée dans les échantillons. L'objectif était de quantifier l'étendue et la variabilité de la dégradation initiale de l'ADN lors du processus de digestion de la proie par le rapace. Il s'agissait d'explorer les paramètres pouvant affecter les résultats obtenus à partir de deux stratégies différentes d'analyse des échantillons. La première stratégie consistait à analyser individuellement chaque marqueur génétique et chaque ossement, ce qui (i) représentait une tâche délicate et ardue compte tenu de la très petite taille et du nombre élevé d'ossements, (ii) augmentait le risque de pertes lors de la purification dues à la faible quantité de matériel analysé à chaque fois, (iii) pouvait amener un fort taux de résultats négatifs si la conservation de l'ADN était mauvaise, (vi) entraînait un risque de production de faux positifs dus à des traces de contamination qui seraient difficiles à dépister compte tenu du nombre élevé d'échantillons qui auraient été traités. La seconde approche considérée consistait à effectuer une analyse globale de la diversité génétique en analysant simultanément l'ensemble des marqueurs génétiques d'intérêt dans des extraits préparés à partir des ensembles d'ossements plutôt qu'os par os. Le nombre d'os qu'il serait pertinent d'analyser dans chaque ensemble dépend de la quantité moyenne d'ADN résiduel par os, de la proportion d'os contenant encore de l'ADN, et de la capacité de réassocier les différents marqueurs génétiques analysés dans le cas de données générées à partir de plusieurs individus dans le même ensemble, cette dernière capacité étant essentielle pour capturer correctement la diversité des espèces qui sont à l'origine de ces ossements. Nous avons mis en œuvre une approche expérimentale unissant la sensibilité de la PCR et la puissance du séquençage massivement parallèle de nouvelle génération qui nous a permis d'explorer le potentiel d'une approche d'analyse globale des os anciens pour chaque ensemble. Ainsi, nous avons analysé les ossements de rongeurs prélevés aseptiquement dans les différentes couches des grottes El Harhoura 2 et El Mnasra.

RESULTATS ET DISCUSSION

Macrofaune

Compte tenu des difficultés anticipées pour analyser l'ADN à partir de petits os de rongeurs datés de 6 000 à 120 000 ans BP dans l'environnement chaud du Maroc, nous avons tout d'abord exploré la conservation de l'ADN dans

des ossements de grande taille dont l'étude est moins délicate à mettre en œuvre. De plus, comparés à ces petits os de rongeurs, des gros ossements à cortex épais de grands herbivores devraient offrir un environnement mieux isolé des interactions avec le sol d'enfouissement, et devrait, donc, être plus favorable à la préservation de l'ADN. De plus, les os d'animaux de grande taille étudiés ici n'ont pas été digérés dans l'estomac de prédateurs, contrairement aux os de rongeurs qui constituaient la cible principale de cette étude. Nous nous sommes focalisés sur des os de bovins (aurochs) et d'équins (ânes). Des ossements de macrofaune originaires d'El Mnasra et d'El Harhoura 2 ont été sélectionnés dans les réserves de la fouille à l'INSAP à Rabat. Il s'agissait de neuf ossements de *B. primigenius* et de trois ossements d'équidés asiniens provenant tous de la couche 4a d'El Harhoura 2 datée de ~44 000 ans (date ESR-U/Th ; (Janati-Idrissi *et al.* 2012)) à ~74 000 ans (date OSL ; (Jacobs *et al.* 2012)). Quatre de ces ossements étaient entièrement ou partiellement brûlés et noirs. Deux étaient couverts d'une couche de concrétion calcaire et ont été traités au vinaigre pour faciliter l'analyse archéozoologique (E. Campmas, com. pers.). Ces ossements ont été soumis à l'analyse paléogénétique. Pour cette analyse, nous avons utilisé la PCR quantitative en temps réel (PCRq) (Pruvost *et al.* 2005, Champlot *et al.* 2010) et ciblé des amplicons d'une taille comprise entre 79 et 152 paires de bases (bp). L'analyse par PCRq de trois ossements d'équidés asiniens et de sept ossements de *B. primigenius* n'a pas été couronnée de succès, aucun amplicon n'ayant été obtenu quel que soit l'os analysé. L'ADN semble, donc, très mal ou pas préservé dans ces ossements.

L'absence de molécules d'ADN de cette taille pourrait être due aux conditions taphonomiques dans le site, qui s'avèreraient alors défavorable à la préservation de l'ADN. En particulier, la plupart des ossements a été brûlée avant leur enfouissement, ce qui peut entraîner la dégradation totale de l'ADN en fonction de la température du feu. L'échec de ces analyses pourrait aussi être dû au traitement post-fouille de ces ossements qui ont été lavés et ensuite stockés dans des conditions non-optimales pour la préservation de l'ADN, surtout à une température élevée. Notre équipe avait montré que l'ADN se dégrade très vite après prélèvement des ossements du milieu dans lequel ils étaient enfouis pendant des milliers d'année, et surtout après lavage (procédure archéologique standard), la différence entre taux de dégradation durant l'enfouissement et après exhumation pouvant facilement atteindre un facteur 70 (Pruvost *et al.* 2007). Moins il y a d'ADN préservé dans les ossements, plus cette dégradation secondaire est susceptible d'entraîner l'échec de l'analyse. Dans le cas des ossements analysés, l'ADN pourrait aussi avoir été totalement dégradé par le traitement au vinaigre qui a été employé pour nettoyer les ossements lorsqu'ils étaient recouverts d'un dépôt calcaire. Pour cela, ils ont été trempés dans du vinaigre blanc non-dilué entre une minute et plusieurs heures, puis rincés à l'eau et séchés (E. Campmas com. pers.). Ce traitement pourrait contribuer à la dégradation totale de l'ADN par hydrolyse acide.

Deux des cinq ossements analysés d'une patte de bovidé de la couche 4a d'El Harhoura 2 qui n'avaient pas été brûlés ou traités avec du vinaigre ont fourni un mélange d'au moins

trois séquences différentes dont l'origine est à chercher en dehors du laboratoire du fait des procédures employées (Champlot *et al.* 2010). L'analyse des procédures suivies tout au long de la collecte des échantillons suggère que la contamination a pu se produire lors des prélèvements et du stockage des fossiles dans les collections à proximité d'os de référence issus de cadavres frais traités sur place.

Dégradation de l'ADN dans les os des pelotes actuelles

Les ossements anciens de rongeurs proviennent de l'activité prédatrice de rapaces qui ont occupé les grottes et y ont accumulé les restes de petits vertébrés caractéristiques de la diversité des populations qui occupaient la région aux différentes époques (Stoetzel *et al.* 2011, Stoetzel *et al.* 2012, Stoetzel *et al.* 2014). Le but de la présente étude était donc d'effectuer le typage génétique des ossements des rongeurs préservés dans les différentes couches stratigraphiques des grottes de Témara. La question de la préservation de l'ADN était un enjeu majeur compte tenu de la petite taille et de la fragilité des ossements et dents de rongeurs. C'est pour cette raison que nous avons exploré la dégradation de l'ADN des ossements de rongeurs dans les pelotes de rapaces, en s'intéressant aussi bien à la dégradation lors de la phase de digestion par les rapaces qu'aux aspects de la conservation à long terme de cet ADN lors du vieillissement des pelotes. L'objectif était de pouvoir apprécier avec quelle efficacité et fiabilité il serait possible de reconstituer la diversité des espèces de rongeurs basée sur le génotypage avec une approche génétique à partir d'ossements d'âges divers, afin de choisir la meilleure stratégie d'analyse, soit à partir d'os isolés, soit à partir d'ensemble d'os.

Pour cela, il était nécessaire de disposer d'une référence fiable d'ossements de rongeurs qui n'ont pas subi la digestion par les rapaces. La mise en œuvre du prélèvement d'os frais d'animaux sauvages s'est avérée complexe. En effet, il a fallu identifier la meilleure procédure de préparation de l'ADN après la mort de l'individu. Selon la méthode de capture sur le terrain, le délai du prélèvement après la mort peut être variable, voire difficile à contrôler. De plus, comme on ne peut pas facilement préparer l'ADN sur le terrain, il a fallu identifier la meilleure manière de conserver les échantillons. Nous avons, donc, comparé des protocoles de congélation de l'individu entier avec une dissection rapide et conservation des ossements dans l'EDTA avant d'extraire l'ADN au laboratoire. La congélation/décongélation s'est avérée provoquer une forte dégradation de l'ADN, probablement lors de la phase de décongélation qui induit vraisemblablement la libération des nucléases lysozomales. La dissection rapide et la conservation dans l'EDTA a donné de meilleurs résultats mais ne nous a pas permis d'analyser un grand nombre de pièces squelettiques différentes, car une dissection exhaustive sur le terrain est une procédure très lourde à mettre en œuvre. L'analyse de fémur et de tibia d'*Apodemus* ayant subi un tel traitement montre que l'ADN y est, toutefois, déjà significativement dégradé avec une taille moyenne des fragments de l'ordre de quelques centaines de paires de bases. Il s'est, donc, avéré très difficile d'obtenir une bonne référence de la quantité d'ADN initiale dans les ossements des différentes espèces sauvages capturées puisqu'aucune méthode de traitement des captures

d'animaux sauvages n'a permis d'obtenir un ADN d'aussi bonne qualité que celui obtenu à partir de souris de laboratoire. Par contre, nous avons observé que la quantité d'ADN obtenue était plus importante dans les animaux sauvages, une observation à mettre en parallèle avec la plus grande robustesse des ossements de ces animaux. Nos résultats montrent l'importance d'une bonne gestion des prélèvements biologiques pour la qualité de l'ADN récupéré. Finalement, nous avons analysé l'ADN extrait d'un os long d'une souris de laboratoire (*Mus musculus*) fraîchement sacrifiée et immédiatement disséquée.

Nous avons ensuite exploré la variabilité de la qualité et la quantité d'ADN extrait à partir de différentes pièces squelettiques après digestion et régurgitation des pelotes par les rapaces. Les os de rongeurs anciens provenant des rejets de rapaces ayant digérés les animaux entiers, nous avons d'abord cherché à apprécier l'impact de cette digestion sur la conservation de l'ADN indépendamment de la conservation à long terme sur les sites. Nous avons entamé une analyse systématique de la préservation de l'ADN dans différents os originaires de différentes pelotes fraîches de différents rapaces diurnes et nocturnes. A cette fin, nous avons analysé en parallèle dans les os de la souris de laboratoire (*Mus musculus*) fraîchement sacrifiée, ainsi que dans les os de mériones (*Meriones shawii*) récupérés à partir de pelotes fraîches de faucon (probablement *Falco tinnunculus*) et de chouettes (*Asio otus*, *Tyto alba* et rapace non-déterminé) dans différentes régions du Nord du Maroc (Ouled Boughadi, Sidi Chiker, Mechra Benabbou). Nous avons comparé particulièrement os longs et dents à partir de ces quatre pelotes marocaines actuelles. Les résultats de l'analyse spectrophotométrique des extraits préparés à partir de la souris de laboratoire d'un côté et des pelotes de l'autre ont montré que la quantité d'ADN récupéré à partir des pelotes ($\mu\text{g/g}$ os) était au moins de deux ordres de grandeurs inférieure après digestion par les rapaces. Ceci concerne la quantité d'ADN total, c'est-à-dire, l'ADN endogène des rongeurs auquel pouvait s'ajouter l'ADN du rapace et de l'ADN bactérien.

Puis, nous avons cherché à mesurer avec précision l'impact de la digestion sur la taille des molécules d'ADN de rongeurs afin d'apprécier la taille moyenne des fragments que l'on pouvait espérer amplifier par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Nous avons, donc, déterminé et quantifié la dégradation de l'ADN des rongeurs dans les ossements des trois pelotes actuelles de chouette en effectuant des PCRs quantitative en temps réel. En première approximation, on peut considérer que la dégradation de l'ADN suit une cinétique de premier ordre, entraînant une distribution poissonnienne de la taille des fragments. Celle-ci peut, donc, être décrite par l'équation $A_x = N \cdot \exp(-\lambda \cdot x)$ où A_x est le nombre de copies amplifiables de taille x , N est le nombre total de copies, et λ est la probabilité pour un nucléotide d'être dégradé (Deagle *et al.* 2006). La taille moyenne de l'ADN conservé est égale à $1/\lambda$. Pour estimer λ , plusieurs fragments d'ADN de taille variable, pour pouvoir tracer la droite décrivant la relation entre le log de cette quantité et la taille de ces fragments d'ADN (Fig. 1). Pour cela, nous avons défini des amorces de PCR

universelles qui permettaient d'amplifier à partir de la très grande majorité des rongeurs des fragments d'ADN mitochondrial de différentes tailles. Nous avons sélectionné des amorces qui fonctionnaient bien en PCR quantitative en temps réel et qui ciblaient des amplicons de 73, 125 et 158 pb. Nous avons appliqué cette stratégie aux différents ossements et dents récupérés à partir des trois pelotes actuelles analysées. En parallèle, tous les ossements et mandibules analysés génétiquement ont été analysés par microscopie électronique à balayage au MNCN à Madrid afin de déterminer le degré de digestion visible sur la surface et par histologie.

Lors de l'analyse des ossements, nous avons observé une forte dégradation de l'ADN après digestion et régurgitation, mais aussi une forte hétérogénéité dans l'étendue de la dégradation. En effet, environ 99% de l'ADN initialement présent a été dégradé lors de la digestion (Guimaraes *et al.* en préparation). La taille moyenne des fragments préservés a varié, quant à elle, de 40 à 1400 pb sans que le pourcentage de molécules « survivantes » et la taille moyenne soient corrélés entre différents os (Guimaraes *et al.*, en préparation). De plus, nous n'avons pas observé de corrélation entre l'étendue de la dégradation de l'ADN et l'origine anatomique des os analysés, l'âge de la pelote (entre quelques jours et 26 ans), l'espèce de rapace à l'origine de la pelote, l'espèce de rongeur (*Meriones* et *Mus*) et le degré de digestion déterminé par l'analyse microscopique (Guimaraes *et al.*, en préparation). Cette forte variabilité et cette absence de corrélation avec des critères observables suggère que des phénomènes non observables dans les pelotes, comme la différence de durée de séjour dans le suc gastrique, voire de position occupée dans l'estomac du rapace lors de la digestion, jouent un rôle plus important sur la préservation de l'ADN. D'autre part, le fait que l'on puisse observer que certains os contiennent de l'ADN de plus haut poids moléculaire, bien que celui-ci ne corresponde qu'à une fraction infime de l'ADN initial, suggère une hétérogénéité de l'étendue de la digestion au sein de chaque os. Nos résultats suggèrent qu'il existe dans l'os digéré deux populations d'ADN, une population majoritaire fortement dégradée, et une population minoritaire plus résistante possiblement préservée dans des niches moléculaires de préservation (Geigl 2002). Ces résultats indiquent que si l'on peut espérer trouver de l'ADN conservé à long terme dans des os de rongeurs après digestion par les rapaces, la variabilité d'un os à l'autre a toutes les chances d'être extrême, ce qui plaide en faveur de la réalisation d'une analyse par ensemble d'os plutôt que par os individuels. Le fait que certains os puissent contenir des traces d'ADN de plus haut poids moléculaires (jusqu'à 1.400 pb) après avoir été nettoyé par le processus de digestion pouvait rendre relativement optimiste quant à la possibilité d'identifier des os de rongeurs contenant encore de l'ADN plusieurs milliers d'années après la digestion si un nombre suffisants d'os était criblé. Tout ceci plaide en faveur de l'utilisation d'une analyse génétique sur des ensembles d'échantillons.



Figure 1 : Quantification de la dégradation de l'ADN dans les ossements préservés dans les pelotes analysées. A. Pelote actuelle de faucon prélevée peu de temps avant l'analyse à Ouled Boughadi, Maroc, et ossements isolés. B. Quantité d'ADN pour des fragments de taille de 73, 125 et 158 pb dans différents os analysés et déduction de la probabilité de dégradation d'un lien inter-nucléotidique; métapode (triangles verts), radius (étoiles bleu clair), humérus (losanges bleu foncé) provenant d'une pelote de chouette; humérus (étoiles rouges) et métapode (croix violettes) provenant d'une pelote de faucon; les équations décrivant les droites de régression sont indiquées dans la même couleur que les données.

Figure 1 : Quantification of DNA degradation in bones preserved in the analyzed pellets. A. Pellet from a falcon sampled in Ouled Boughadi, Morocco, shortly before the analysis, as well as the isolated bones. B. DNA quantity for fragments of 73, 125 and 158 bp in the different bones analyzed and calculation of the probability of degradation of an internucleotide bond; metapodial (green triangles), radius (light blue stars), humerus (dark blue diamonds); originating from owl pellets; humerus (red stars) and metapodial (purple crosses) originating from a falcon pellet; the equations describe the regression lines and are indicated in the same color as the data.

L'ADN dans les ossements de rongeurs préservés à El Harhoura 2 et à El Mnasra

Pour minimiser les risques de contamination, nous avons effectué des prélèvements aseptiques dans les grottes El Harhoura 2 et El Mnasra sous forme de carottes dans des tubes javellisés qui après prélèvement ont été congelés à -20°C (Figure 2). Afin d'analyser les restes de rongeurs préservés dans les différentes couches des grottes de Témara, nous avons décongelé ces carottes. Nous avons désintégré le sédiment et récupéré par tamisage stérile les ossements et dents préservés dans les carottes. Ensuite, la partie anatomique et l'attribution zoologique a été effectuée sous une loupe binoculaire (Figure 2). Cette procédure s'est déroulée dans le laboratoire de haut confinement en respectant les précautions nécessaires pour éviter la contamination. Seuls des os longs de mériones ont été identifiés avec certitude.

Le résultat sur les pelotes actuelles présageait une relative conservation de l'ADN dans les os de rongeurs préservés dans les grottes de Témara, qui est compatible avec l'obtention des résultats escomptés à partir des ossements de rongeurs. Nous avons, donc, entrepris une caractérisation des paramètres importants pour définir la stratégie optimale pour l'analyse génétique de ces ossements. Plusieurs options étaient envisageables et il fallait choisir au mieux la stratégie la plus efficace. Premièrement, on pourrait chercher à n'analyser que des os bien préservés pour lesquels l'espèce d'origine peut être déterminée sans ambiguïté et analyser ces os un par un en utilisant des amorces spécifiques de l'espèce déterminée. Une telle approche aurait un débit très faible mais

permettrait d'apprécier plus précisément la variabilité génétique des populations de rongeurs, car il serait possible de quantifier avec précision le nombre d'individus à l'origine des résultats obtenus. Toutefois, si la conservation est mauvaise et que seulement une petite proportion des os analysés ne permette d'obtenir des résultats, l'efficacité risque d'être trop mauvaise pour obtenir les résultats visés. Une solution alternative, un peu plus efficace et qui permettrait de s'affranchir d'une caractérisation précise des espèces d'origine des os analysés, serait d'analyser tous les os, un par un, en utilisant des amorces universelles permettant l'amplification des régions d'intérêt chez toutes les espèces de rongeurs. Les inconvénients d'une telle approche sont que le débit reste faible et que les résultats sont plus susceptibles d'être falsifiés par la contamination. La troisième option serait d'analyser tous les os en masse et d'utiliser le séquençage massivement parallèle de nouvelle génération des produits de PCR obtenus avec des amorces universelles. Cette approche aurait le débit permettant de réaliser une étude d'envergure avec efficacité, mais elle est sensible à la contamination qu'il faudra contrôler avec prudence, et l'analyse de la diversité peut être faussée si seulement une très petite proportion des os est à l'origine des produits de PCR séquencés en blocs.

Au vu des résultats obtenus dans notre étude taphonomique des pelotes actuelles, nous avons poursuivi l'option trois, c'est-à-dire, l'analyse commune de tous les ossements d'une carotte. Cette approche nous paraissait le meilleur choix pour augmenter la probabilité de pouvoir amplifier des rares molécules d'ADN ancien préservés.





Figure 2 : Procédure de prélèvement d'ossements de rongeurs des grottes d'El Mnasra et d'El Harhoura 2. A. Prélèvement aseptique de carottes dans les différentes couches stratigraphiques. B. Vue de la coupe stratigraphique d'El Mnasra après prélèvement des carottes. C. Carottes congelées à -20°C jusqu'à leur analyse. D. Ouverture des carottes. E. Tamisage du sédiment au laboratoire confiné. F. Isolement des ossements de rongeurs. G. Identification taxonomique des ossements de rongeurs sous la loupe binoculaire. H. Analyse paléogénétique au laboratoire d'ADN ancien de haut confinement de l'Institut Jacques Monod, CNRS, Université Paris Diderot, Paris, France.

Figure 2 : Procedure of sampling of the rodent remains from the caves of El Mnasra and El Harhoura2. A. Aseptic sampling of cores from the different stratigraphic layers. B. View of the stratigraphy of El Mnasra after sampling of the cores. C. Cores frozen at -20° until their analysis. D. Opening of the cores. E. Sieving of the sediment in the high containment laboratory. F. Isolation of the rodent remains. G. Taxonomic identification of the rodent remains under the binocular. H. Paleogenetic analysis in the high containment ancient DNA laboratory of the Jacques Monod Institute, CNRS, University Paris Diderot, Paris, France.

Le risque d'une amplification d'ADN contaminant de souris présentes dans les laboratoires de biotechnologie produisant les réactifs a été évalué préalablement. Ainsi, nous avons montré que les réactifs utilisés, une fois décontaminés avec la procédure de décontamination développée au laboratoire (Champlot *et al.* 2010), ne contiennent plus de molécules d'ADN murin d'une taille correspondant aux amplicons ciblés. L'approche expérimentale a, ainsi, pu être validée pour l'analyse des ossements anciens. Les ossements d'une carotte ont, donc, été mis en commun et l'ADN extrait de ces ensembles d'os. Pour réaliser leurs analyses génétiques, nous avons développé une nouvelle approche de multiplexing d'une série de marqueurs mitochondriaux qui nous permettait de caractériser l'espèce de rongeurs, avec une meilleure résolution au sein des espèces de souris et de mériones suffisante pour une analyse phylogéographique. Pour les mériones, nous nous sommes basés sur la caractérisation de la phylogéographie de l'ADN mitochondrial de cette espèce en Afrique du Nord (Lalis *et al.* in préparation). Afin de satisfaire aux contraintes spécifiques de l'ADN ancien, les différents marqueurs ont été analysés en ciblant des fragments d'ADN très courts (entre 50 et 100 bp). L'ensemble des marqueurs a été amplifié par PCR multiplex, les ensembles d'ossements de chaque niveau stratigraphique ont été étiquetés avec des codes-barres spécifiques et le tout a été analysé par séquençage massivement parallèle sur la plateforme « Ion Torrent » en utilisant cette approche que nous avons développé pour l'ADN ancien et intitulé « aMPLEX Torrent » (Guimaraes *et al.* en préparation). Nous avons, ainsi, pu génotyper de l'ADN qui était préservé dans des ossements de la couche 1 et de la couche 4a d'El Harhoura 2, datées respectivement à 5 800 ans BP (Daugas *et al.* 1998) et ~44 ou 74 000 ans BP selon la méthode de datation employée

(OSL : (Jacobs *et al.* 2012); ESR-U/Th : (Janati-Idrissi *et al.* 2012)), alors que les autres couches d'El Harhoura 2 ainsi que celles de la grotte El Mnasra ne contenaient pas d'ADN préservé détectable. Nous avons, ainsi, pu montrer que cet ADN provenait de mériones et pu caractériser quatre séquences mitochondriales qui sont apparentées aux deux clades marocains de mériones actuels (Lalis *et al.* in préparation). Une des séquences obtenues n'est pas (encore) connue dans les populations actuelles de mériones, les trois autres séquences sont présentes dans les populations actuelles du Maroc, mais pas en Algérie ou en Tunisie. Ces résultats indiquent une continuité de certaines lignées mitochondriales des mériones sur au moins 70.000 ans. Cette absence de rupture est surprenante au vu des fluctuations climatiques pendant cette longue période, mais cette relative « stabilité » a été aussi constatée dans les études morphométriques sur les souris (Stoetzel *et al.* 2013) et les mériones (Stoetzel *et al.* en préparation) fossiles de la grotte d'El Harhoura 2.

CONCLUSION

Nous avons pu mettre en évidence l'évolution en continu de lignées mitochondriales dans les populations de mériones au Maroc depuis le Pléistocène supérieur. Ceci a été possible grâce au développement méthodologique basé sur le séquençage massivement parallèle de nouvelle génération. Notre étude taphonomique des ossements dans des pelotes actuelles a fourni des éléments qui permettent d'émettre l'hypothèse que le passage des animaux dans le tube digestif des rapaces, bien qu'engendrant la dégradation de la plus grande partie (>99%) de l'ADN dans les ossements, permet aux molécules d'ADN résiduelles de bénéficier de conditions favorables pour la préservation à long terme. Il est ainsi frappant que l'on ait pu obtenir de l'ADN à partir

des petits os de rongeurs de la couche 4a d'El Harhoura 2 (44-74 000 ans) alors que cela n'a pas été possible pour les gros os de mammifères de la même couche. Nous nous étions plutôt attendu à ce que la plus grande taille des os aurait permis qu'il y ait moins d'échanges avec le sol et donc une meilleure conservation de l'ADN. Ceci suggère que les événements affectant le corps juste après la mort joueraient un rôle plus déterminant pour la conservation de l'ADN à long terme. Nous proposons l'hypothèse que la digestion par les rapaces laisse dans l'os peu de nutriments permettant la croissance bactérienne post-régurgitation, permettant ainsi à l'ADN enfoui dans l'os ayant échappé à la digestion par le suc gastrique d'échapper aussi à l'attaque bactérienne, alors que si les bactéries avaient pu proliférer, elles auraient pu pénétrer plus profondément dans l'os. Le suc gastrique des rapaces serait alors plus « doux » qu'une intense prolifération bactérienne.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Violaine Nicolas et Aude Lalis pour la mise à disposition des séquences d'ADN des mériones avant leur publication, ainsi qu'Emilie Campmas pour les ossements de macrofaune. Nos remerciements s'adressent aussi à l'INSAP Maroc, Mission archéologique à Témara. Ce travail a été financé par le projet ANR-PEX 004 – MOHMIE.

REFERENCES

- Andrews P. 1990. *Owls, Caves and Fossils*. Natural History Museum, London
- Brace S., Palkopoulou E., Dalen L. *et al.* 2012. Serial population extinctions in a small mammal indicate Late Pleistocene ecosystem instability. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109, 20532-6.
- Champlot S., Berthelot C., Pruvost M. *et al.* 2010. An efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications. *PLoS One*, 5.
- Daugas J.P., El Idrissi A., Ousmoi M. *et al.* 1998. *Synthèse radiochronométrique concernant la séquence néolithique au Maroc*. Presented at 3rd International Congress "14C et Archéologie"
- Deagle B.E., Eveson J.P. & Jarman S.N. 2006. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples--a case study on DNA in faeces. *Frontiers in Zoology*, 3, 11.
- El Hajraoui M.A., Nespoulet R., Debénath A. *et al.* 2012. *Préhistoire de la Région de Rabat-Témara. Villes et Sites Archéologiques du Maroc*. INSAP Editions, Rabat, Morocco.
- Geigl E.-M. 2002. On the circumstances surrounding the preservation of very old DNA. *Archaeometry*, 44, 337-342
- Geigl E.M. & Grange T. 2014. Taphonomie de l'ADN ancien. *In*: ed. Denys C. & Patou-Mathis M. *Manuel de Taphonomie*. Editions Errance, Arles, France, 147-165 pp.
- Hadly E.A., Ramakrishnan U., Chan Y.L. *et al.* 2004. Genetic response to climatic change: insights from ancient DNA and phylochronology. *PLoS Biol*, 2, e290.
- Jacobs Z., Roberts R.G., Nespoulet R. *et al.* 2012. Singlegrain OSL chronologies for Middle Palaeolithic deposits at El Mnasra and El Harhoura 2, Morocco: implications for Late Pleistocene human-environment interactions along the Atlantic coast of northwest Africa. *Journal of Human Evolution*, 62 377-394.
- Janati-Idrissi N., Falgueres C., Haddad M. *et al.* 2012. Datation par ESR-U/Th combinées de dents fossiles de la région de Rabat-Témara: Grottes d'El Mnasra et d'El Harhoura 2. *Quaternaire*, 23 25-35.
- Nespoulet R., El Hajraoui M.A., Amani F. *et al.* 2008. Palaeolithic and Neolithic occupations in the Temara Region (Rabat, Morocco): recent data on Hominin contexts and behavior. *African Archaeological Review*, 25 21-39.
- Pruvost M., Grange T. & Geigl E.-M. 2005. Minimizing DNA contamination by using UNG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies. *BioTechniques*, 38, 569-575.
- Pruvost M., Schwarz R., Bessa Correia V. *et al.* 2007. Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 739-744.
- Smith C.I., Chamberlain A.T., Riley M.S. *et al.* 2001. Neanderthal DNA. Not just old but old and cold? *Nature*, 410, 771-2.
- Stoetzel E., Campmas E., Michel P. *et al.* 2014. Context of modern human occupations in North Africa: contribution of the Témara caves data. *Quaternary International*, 320, 143-161.
- Stoetzel E., Denys C., Bailon S. *et al.* 2012. Taphonomic analysis of amphibian and squamate remains from El Harhoura 2 (Rabat- Témara, Morocco): contributions to palaeoecological and archaeological interpretations. *International Journal of Osteoarchaeology*, 22, 616-635.
- Stoetzel E., Denys C., Michaux J. *et al.* 2013. *Mus* in Morocco: a Quaternary sequence of intraspecific evolution. *Biological Journal of the Linnean Society*, 109, 599-621
- Stoetzel E., Marion L., Nespoulet R. *et al.* 2011. Taphonomy and palaeoecology of the late Pleistocene to middle Holocene small mammal succession of El Harhoura 2 cave (Rabat-Temara, Morocco). *Journal of Human Evolution*, 60, 1-33.
- Taberlet P. & Fumagalli L. 1996. Owl pellets as a source of DNA for genetic studies of small mammals. *Molecular Ecology*, 5, 301-5.
- Vigne J.D. & Valladas H. 1996. Small mammal fossil assemblages as indicators of environmental change in northern Corsica during the last 2500 years. *Journal of Archaeological Science*, 23, 199-215.