

Diagenèse des os de rongeurs fossiles d'El Harhoura 2 (Maroc) : microstructure versus composition globale

Rodent fossil bone diagenesis of El harhoura 2 cave (Morocco) : microstructure versus bulk composition

Yannicke DAUPHIN & Pierre MASSARD

Géosciences, bât. 504, Université Paris Sud, 91405 Orsay, France (yannicke.dauphin@upmc.fr ; pierre.massard@u-psud.fr)

Résumé : L'abondance des restes fossiles de rongeurs dans les sédiments de la grotte d'El Harhoura 2 en fait un matériel privilégié pour étudier leur conservation. De plus certaines espèces sont encore représentées dans la faune actuelle. La composition globale d'os longs de *Meriones* actuels et fossiles a été analysée par thermogravimétrie (ATG), spectrométrie infrarouge (FTIR). Leur structure a été observée au microscope électronique à balayage (MEB) et au microscope à force atomique (AFM). Tous les os sont en apatite, mais la comparaison des données ATG et FTIR montrent que les os fossiles sont appauvris en composés organiques. Après un chauffage progressif jusqu'à 900°C, les composés minéraux ne sont pas totalement détruits. La perte de poids la plus rapide intervient à des températures différentes chez les os actuels et les fossiles. Les caractéristiques générales des os fossiles sont proches, mais les profils ATG des deux niveaux les plus récents ainsi que le niveau 10 sont nettement différents. La microstructure des os de ces niveaux ne permet pas d'expliquer ces particularités. Ces résultats confirment que l'évaluation des états de conservations d'échantillons fossiles d'après un seul critère n'est pas souhaitable.

Mots clés : os, rongeurs, diagenèse, El Harhoura 2, analyse thermogravimétrique, spectrométrie infrarouge

Abstract: Sedimentary layers of El Harhoura 2 cave have yielded abundant rodent fossil bones, so that their preservation state can be easily studied. Moreover, some species still exist. The bulk composition of modern and fossil long bones of *Meriones* has been studied using thermogravimetric analysis (ATG) and infrared spectroscopy (FTIR). The microstructure of the bones has been observed using a scanning electron microscope (MEB) and an atomic force microscope (AFM). Despite the mineralogy of bones is preserved (apatite), ATG and FTIR data show that the fossil bones are depleted in organic components. At 900°C, the mineral components are not destroyed. Thermograms differ for modern and fossil bones. Bones from layers 1, 2 and 10 differ, but the microstructure does not allow to explain why. These data confirm that it is not possible to infer the state of preservation of fossils from a single criterion.

Key words : bone, rodents, diagenesis, El Harhoura 2, thermogravimetric analyses, infrared spectrometry

Abridged English version

Introduction

The reconstruction of palaeoenvironments and the establishment of phylogenies rests more and more on biogeochemical parameters of bones and teeth. However, all these parameters depend upon the quality of the fossil record. It is thus becoming essential to differentiate between the primary components of these tissues and what has been introduced by diagenetic processes during fossilisation. This differentiation needs to be established before any attempt can be made to estimate biases. The differential preservation of an organism is well known : in vertebrate, bones and teeth are more resistant to the diagenetic alteration than the soft parts. Numerous examples have shown the heterogeneity in preservation of fossils in different sites, and between samples in a single fossil site (Deniro & Schoeniger 1983, Nelson *et al.* 1986, Dauphin & Denys 1992, Dauphin & Lange-Badré 2000, Lee-Thorp & Sponheimer 2003). Moreover, the microstructural preservation is not a guarantee of a well-preserved nanostructure or composition (Dauphin & Badré 2000, Dauphin *et al.* 2007).

Thus, to estimate the state of preservation is not easy. A bone is composed of minerals, but also cells, water, and extracellular organic components. All these components have different behaviours when submitted to the fossilization mechanisms. In this report, we propose a cheap, no time-consuming, to evaluate the state of preservation in fossils.

Material and methods

Modern bones (*Rattus*, *Meriones*) come from the Museum national d'histoire naturelle de Paris. Fossil bones of *Meriones* have been collected in the El Harhoura 2 cave. Eleven stratigraphic layers have been described from Middle Palaeolithic to Neolithic (Nespoulet et El Hajraoui, 2012).

The microstructures of the samples have been observed using scanning electron microscopes (SEM) ; the nanostructures have been observed using an atomic force microscope (AFM). The composition of modern and fossil bones has been studied on powdered samples with an infrared spectrometer (DRIFT) and thermogravimetric analyses (TGA).

Results

Modern bones show the usual features such as osteons, Haversian structure ... (for details, see Farre *et al.* 2014). The shape of the fossil bones is preserved, even in broken samples. The main microstructures are preserved, and secondary deposits in the natural cavities of the spongy bone or medullary channel are scarce (Fig. 1). Desquamation of the external surface and some cupules are visible. Nanostructural observations show flat polygonal crystallites, but collagen seems to be destroyed (Fig. 2).

Infrared spectra of modern bones show the mineral-organic composition (Fig. 3). Mineral bands are assigned to CO₃ and PO₄, whereas organic bands are a mixture of proteins, sugars and lipids. Thermograms show that the main weight loss is at about 350°C (Fig. 4), assigned to the burning of organic matrices and the loss of structural water. In post TGA infrared spectra, organic bands are very reduced (Fig. 3), but mineral bands are still present. Nevertheless, the ratios between bands assigned to CO₃ and PO₄ are modified.

Infrared spectra of fossil bones show they are still in apatite, but crystallinity and organo-mineral ratios are modified (Farre *et al.* 2014). Thermograms evidence the low amounts of organic components (Fig. 6, table 1). Three layers are clearly different: C1, C2 and C10. Layers C1 and C2 are the upper levels and are rich in organic components. Profiles of the layers C1 and C10 are indicative of a different initial composition. Only the bone of the layer C1 has a first order derivative similar to those of modern bones (Fig. 7). The derivatives of other layers are similar, except for the layer C10. All samples show the loss of adsorbed water between 120 and 150°C. Infrared spectra done after TGA are similar (Fig. 8), but not identical. Mineral bands (CO₃ and PO₄) are visible, but their ratios are modified. Organic bands are absent or very reduced. Bands between 3500 and 4000 cm⁻¹ are probably due to the adsorption of atmospheric water.

Discussion

A comparison of the obtained results with published data is not easy: experimental data of the TGA are too diverse. Lozano *et al.* (2003) have focussed their study on human

modern bones the lipids of which being removed. Mkukuma *et al.* (2004) have shown that for a given sample, the gas used in TGA induced different thermograms. Trueman *et al.* (2004) have assigned the main weight loss (between 200 and 250°C) to the burning of the organic matrices. The correlation between the organo-mineral ratio calculated from infrared spectra and that calculated from TGA is $r^2 = 0.86$. Etok *et al.* (2007) have identified three stages in thermograms of modern bones. On archaeological bones, the weight losses vary from 7.9 to 17.2% depending on the site. More recently, Pasteris *et al.* (2014) demonstrate that the weight loss between 200-250°C and 550-600°C is not only the result of the burning of the organic matrices (Fig. 9).

Modern bones have similar but not identical composition, the origin of which is complex (taxonomy, more or less dried sample...). The microstructure of the fossil bones from El Harhoura 2 cave seems to be well preserved, but the nanostructure, composition, crystallinity are altered. The organic components are the less resistant to the diagenesis, but the mineral is not intact. The correlation calculated according to Trueman *et al.* (2004) is $r = 0.89$, but is mainly constrained by the modern samples (Fig. 10a). The ratios of the intensities of infrared bands at 1455 cm⁻¹ (CO₃) and 1040 cm⁻¹ (PO₄) show that there is no clear trend throughout the stratigraphic sequence (Fig. 10b). In these bones, carbonates are more degraded than phosphates.

Conclusion

The experimental sequence FTIR - TGA - FTIR performed on long bones of modern and fossil *Meriones*, as well as modern *Rattus* show that despite a well-preserved morphology and microstructure, the fossil bones are altered by the fossilisation processes. No regular trend is visible from the low to the top of the deposits. Similar results have been obtained from the colour, crystallinity, etc. on the same samples (Dauphin *et al.* 2012, Farre *et al.* 2014). Thus, to estimate the preservation of a fossil sample from a single parameter is not possible. Diagenesis depends upon the sample and the geological history. Henderson *et al.* (1983) have shown that within a bone, diagenesis is variable. Up to now, laws or equations cannot be established to predict diagenetic alterations.

INTRODUCTION

Les évaluations de la biodiversité et des paléoenvironnements au cours des temps géologiques sont basées (i) sur la présence/absence de taxons, (ii) sur les rapports d'abondance de certains taxons, (iii) sur des données géochimiques. Cependant, ces critères dépendent d'un autre phénomène: la qualité de l'enregistrement fossile, c'est à dire l'égalité ou plutôt l'inégalité des organismes vivants dans leur probabilité de se fossiliser. Connus depuis longtemps, ce facteur est toutefois rarement pris en compte dans les reconstitutions, faute de références. L'examen de la littérature met rapidement en évidence l'inégalité de la conservation des divers éléments squelettiques. L'hétérogénéité des modifications

géochimiques dans les spécimens d'un site donné, ou dans un même type d'os ou de dents entre différents sites a été signalée à de multiples reprises (Deniro & Schoeniger 1983, Nelson *et al.* 1986, Dauphin & Denys 1992, Dauphin & Lange-Badré 2000, Lee-Thorp & Sponheimer 2003). L'échelle d'observation des spécimens est un paramètre important. En effet, une structure qui semble bien conservée à une échelle micrométrique s'avère parfois mal conservée à une échelle nanométrique (Dauphin & Badré 2000, Dauphin *et al.* 2007).

Diverses catégories de paramètres permettent d'estimer l'état de conservation des os: morphologie et fragmentation, micro- et nanostructure, et enfin composition. La composition est probablement le plus complet, mais est

également le plus complexe. En effet, les os ne sont pas de purs minéraux, ils contiennent des cellules, de l'eau et des composés organiques extracellulaires. Tous ces composés ont leurs propres mécanismes de dégradation au cours de la fossilisation, et ces mécanismes varient selon l'environnement : un critère peut indiquer une bonne conservation du fossile, alors qu'un autre démontrera que la conservation est médiocre. La mise en oeuvre des analyses servant à qualifier ou quantifier l'état de conservation peut être aisée ou très difficile. Un critère relativement simple est la modification des quantités des composés organiques et minéraux. Le rapport organo-minéral peut être déterminé par spectrométrie infrarouge ou FTIR (Dauphin 1993a, b, Farre *et al.* 2014). Il peut être également obtenu par analyse thermogravimétrique ou ATG. En fait, les deux techniques sont souvent associées en archéologie, afin de déterminer si le feu était utilisé à des fins culinaires (Berna *et al.* 2012), pour identifier les aliments brûlés ou bouillis (Munro *et al.* 2007) ou pour différencier des os brûlés ou des os enrichis en oxydes métalliques (Shahack-Gross *et al.* 1997).

Dans cette étude, les observations microstructurales sont associées aux analyses en spectrométrie infrarouge et thermogravimétrique pour évaluer l'état de conservation des os du rongeur le plus abondant dans la grotte El Harhoura 2 : *Meriones cf. shawii* (Duvernoy, 1842).

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Les os récents (*Rattus*, *Meriones*) proviennent des collections du Museum national d'histoire naturelle de Paris. Les os fossiles proviennent de la grotte El Harhoura 2 située à proximité de Rabat (Maroc). Onze niveaux stratigraphiques ont été décrits, couvrant des périodes culturelles allant du Paléolithique moyen au Néolithique. La terminologie utilisée est celle définie par Nespoulet et El Hajraoui (2012). Ces niveaux sableux sont riches en os et dents de micro-vertébrés, dont les rongeurs. Parmi les taxons identifiés, *Meriones* est le plus abondant (Stoetzel 2009, Stoetzel *et al.* 2010). Dans cette étude, seuls des os longs ont été utilisés. Ils sont généralement fragmentés, et de couleur variable (Dauphin *et al.* 2012). Une étude préalable a montré que dans l'ensemble, la microstructure et la minéralogie de ces échantillons étaient peu modifiées (Farre *et al.* 2014).

Méthodes

Microscopie électronique à balayage (MEB)

Des surfaces externes et internes, des sections transversales et longitudinales ont été observées. Tous les spécimens ont été nettoyés par ultrasons (30 sec.) dans l'eau afin d'éliminer les rares particules de sédiments, puis séchés à l'air à température ambiante.

Les observations ont été réalisées avec un microscope électronique à balayage Philips XL30 (FEI) en utilisant les électrons secondaires. Les échantillons ont été métallisés Au-Pd, avec un système Polaron refroidi par effet Peltier. Une autre série d'observations a été effectuée avec un microscope électronique PHENOM PROX (FEI) qui utilise les électrons rétrodiffusés. Les échantillons ont alors été observés recouverts de C avec un système Polaron refroidi

par effet Peltier, ou n'ont pas été rendus conducteurs.

Microscope à force atomique (AFM)

Les dimensions et la morphologie des cristallites osseux sont encore un sujet de controverse (Bonucci 2013). Cependant, il y a un consensus pour affirmer que les dimensions sont inférieures à 1 micron. La microscopie à force atomique (AFM) permet d'obtenir une résolution comparable à celle des microscopes électroniques à transmission, mais sans avoir à réaliser des coupes ultra-minces, dont la confection entraîne souvent des artefacts. La surface des échantillons est directement observée, sans métallisation. Par contre, le relief de la surface ne doit pas dépasser quelques microns. Les sections ont été polies avec des pâtes diamantées de plus en plus fines, nettoyées aux ultrasons dans l'eau pendant quelques secondes, puis dans une solution HCl à 1% pendant 20 secondes ou 30 secondes avant d'être rincés à l'eau. Ils sont ensuite séchés à température ambiante. Le balayage de l'échantillon génère simultanément divers types d'images : une image topographique, comparable à celle du MEB, et une image de contraste de phase qui reflète principalement les modifications de propriétés physico-chimiques internes à l'échantillon. Les observations ont été réalisées sur un AFM Dimension 3100 (Veeco), en mode tapping, à l'air, avec une pointe en Si et à faible rayon de courbure (moins de 10 nm en moyenne).

Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'analyse thermogravimétrique mesure la variation de masse d'un échantillon en fonction de la température. Les os comportant une proportion importante de matière non minérale, ce matériel est particulièrement bien adapté à de telles mesures puisque, d'une part, les variations de poids de ces divers composés interviennent à des températures différentes, et d'autre part, dépendent largement de l'état de conservation des spécimens. Les os ont été décontaminés à l'eau de Javel à concentration commerciale. Ils ont été soumis aux ultrasons pendant 1 min. Ils ont été rincés à l'eau Milli-Q et séchés à l'air à température ordinaire avant d'être réduits en poudre.

L'appareil utilisé est la TGA 4000 (Perkin Elmer). La montée en température entre 90 et 100°C s'effectue à 5°C par minute. Puis, un stade isotherme est maintenu à 100°C pendant 5 min afin d'assurer une température homogène au sein de l'échantillon. La montée en température de 100 à 900°C s'effectue à 10°C par minute. Toutes les étapes se font sous atmosphère d'azote. De 10 à 100 mg d'os réduits en poudre de granulométrie régulière ont été utilisés pour chaque mesure. La courbe dérivée d'ordre 1 de la perte de poids indique le point auquel cette perte de poids est le plus visible.

Spectrométrie infrarouge en transformée de Fourier

Les spectres infrarouges ont été obtenus sur des poudres de granulométrie régulière, en utilisant un accessoire DRIFT (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform). Ceci permet d'éviter la confection de pastilles pressées habituellement utilisées, qui dénaturent partiellement les composés organiques (Okada *et al.* 1990). Quelques mg d'os sont mélangés à du KBr. Les spectres sont enregistrés avec

une résolution de 4 cm^{-1} et 16 balayages, dans un intervalle de 450 à 4000 cm^{-1} sur un spectromètre Frontier (Perkin Elmer). Un fond continu est établi sur du KBr, et les spectres des échantillons sont automatiquement corrigés pour minimiser les bandes dues à H_2O et CO_2 atmosphériques. Les spectres sont ensuite corrigés par la fonction de Kubelka-Munk.

Les spectres infrarouges ont été acquis avant et après l'analyse thermogravimétrique sur le même échantillon de poudre.

RESULTATS

Micro-nanostructures

Une abondante littérature décrit les microstructures osseuses de spécimens actuels, et les os longs de rongeurs présentent les caractéristiques habituelles, ainsi que le montrent les illustrations des os de *Rattus* et *Meriones* (Farre *et al.* 2014). Dans l'ensemble, les os fossiles ont une forme aisément identifiable, et ne sont pas encroûtés. Leurs cavités internes (cavité de la moelle, os spongieux, canaux des vaisseaux sanguins) sont généralement vides (Fig. 1a, i), les dépôts secondaires étant rares et peu abondants (Fig. 1d). Leur surface externe est parfois écaillée et présente quelques cupules (Fig. 1b). La microstructure avec les lamelles en contre-plaqué (Fig. 1c), les traces des ostéones (Fig. 1e, f) ou encore des vestiges des fibres de collagène minéralisées (Fig. 1f, h) sont visibles. Il n'y a pas de différence évidente entre les niveaux les plus récents et les plus anciens à ce niveau d'observation.

La microscopie à force atomique montre, sur des rongeurs actuels, la présence de cristallites osseux plats et hexagonaux (Fig. 2a, b), mais aussi des formes allongées (Fig. 2c). La disposition lamellaire préservée chez les fossiles (Fig. 2d) est mise en évidence par les images de contraste de phase (Fig. 2e, f). La majorité des cristallites a une dimension inférieure à 100 nm (Fig. 2g, i). Aucune zonation pouvant correspondre à du collagène n'a été observée, même si les cristallites sont parfois disposées en rangées (Fig. 2i).

Os actuels : composition

Les deux spécimens actuels (*Rattus* et *Meriones*) ont des profils en spectrométrie infrarouge similaires mais non identiques (Fig. 3). La composition mixte organo-minérale est nettement démontrée par la présence de bandes de CO_3 et PO_4 , associées aux bandes amides. Toutefois, il n'est pas possible de préciser si ces bandes amides sont dues à des protéines, des sucres ou des lipides. Compte-tenu des données publiées sur la composition des os actuels, il s'agit d'un mélange de ces trois catégories.

Les thermogrammes sont légèrement différents, notamment vers les températures les plus élevées. Pour les deux spécimens, à la température maximale définie (900°C) tous les composés ne sont pas détruits (Fig. 4a). La dérivée de premier ordre indique que la perte de poids la plus apparente se produit à des températures voisines, vers 350°C , ce qui correspond à une diminution des composés organiques et d'eau structurale.

Après chauffage (ATG), les profils infrarouges sont modifiés (Fig. 3). Les bandes les plus affectées sont les bandes organiques dont les intensités sont devenues très faibles. Les bandes dues au phosphate (PO_4) persistent, mais leurs proportions ont changé. Les bandes dues au carbonate (CO_3) sont également affectées, mais restent visibles. De nouvelles bandes apparaissent entre 2000 et 2500 cm^{-1} probablement dues à CO_2 , et vers 3600 cm^{-1} .

Os fossiles : composition

Les os fossiles ont des profils FTIR montrant que la minéralogie initiale : apatite, est conservée. Toutefois, des modifications de composition et des paramètres cristallins ont été mises en évidence (Farre *et al.* 2014). Dans l'ensemble, les quantités de matrices organiques sont moindres que dans les spécimens actuels (Fig. 5). Les niveaux 5 et 10 sont légèrement différents entre 2500 et 4000 cm^{-1} .

Les thermogrammes confirment les quantités plus faibles de composés organiques, puisque les pertes de poids sont moins importantes (Fig. 6, Tab. 1). Trois niveaux se différencient : les os des couches 1 et 2 ont les pertes de poids les plus importantes, probablement liées à une plus grande quantité de matrice organique. En outre, si le profil de la couche 2 montre des inflexions similaires à celles de la majorité des autres échantillons (intensité mise à part), cela n'est pas le cas de la couche 1. La composition des os n'est, donc, pas identique. Pour la plupart des échantillons, le thermogramme tend vers un plateau à partir de 850°C environ, ce qui indique que la plus grande partie des composés organiques de l'os est détruite, mais ce n'est pas le cas pour la couche 10 dont la pente est encore très forte à 900°C (Fig. 6).

Tableau 1 - Pertes de poids (en %) dans différents intervalles de température dans les analyses ATG.

Table 1 - Weight loss (%) in various temperature stages in TGA analyses.

	100°C	100°C	100°C	200°C
	200°C	600°C	900°C	550°C
<i>Rattus</i>	2,41	23,32	30,71	19,54
<i>Meriones</i>	3,06	21,11	24,53	16,62
C1	2,31	16,58	19,36	13,36
C2	2,14	6,56	15,75	3,94
C3	2,54	5,83	10,75	3,05
C4a	2,86	6,12	11,46	3,00
C4b	2,72	5,77	10,70	2,84
C5	2,68	5,64	11,12	2,72
C6	2,17	5,08	9,50	2,74
C7	2,50	5,54	10,69	2,77
C8	2,59	5,16	9,90	2,41
C9	2,62	5,26	10,30	2,44
C10	2,10	4,90	13,61	2,37
C11	2,73	5,39	11,09	2,49

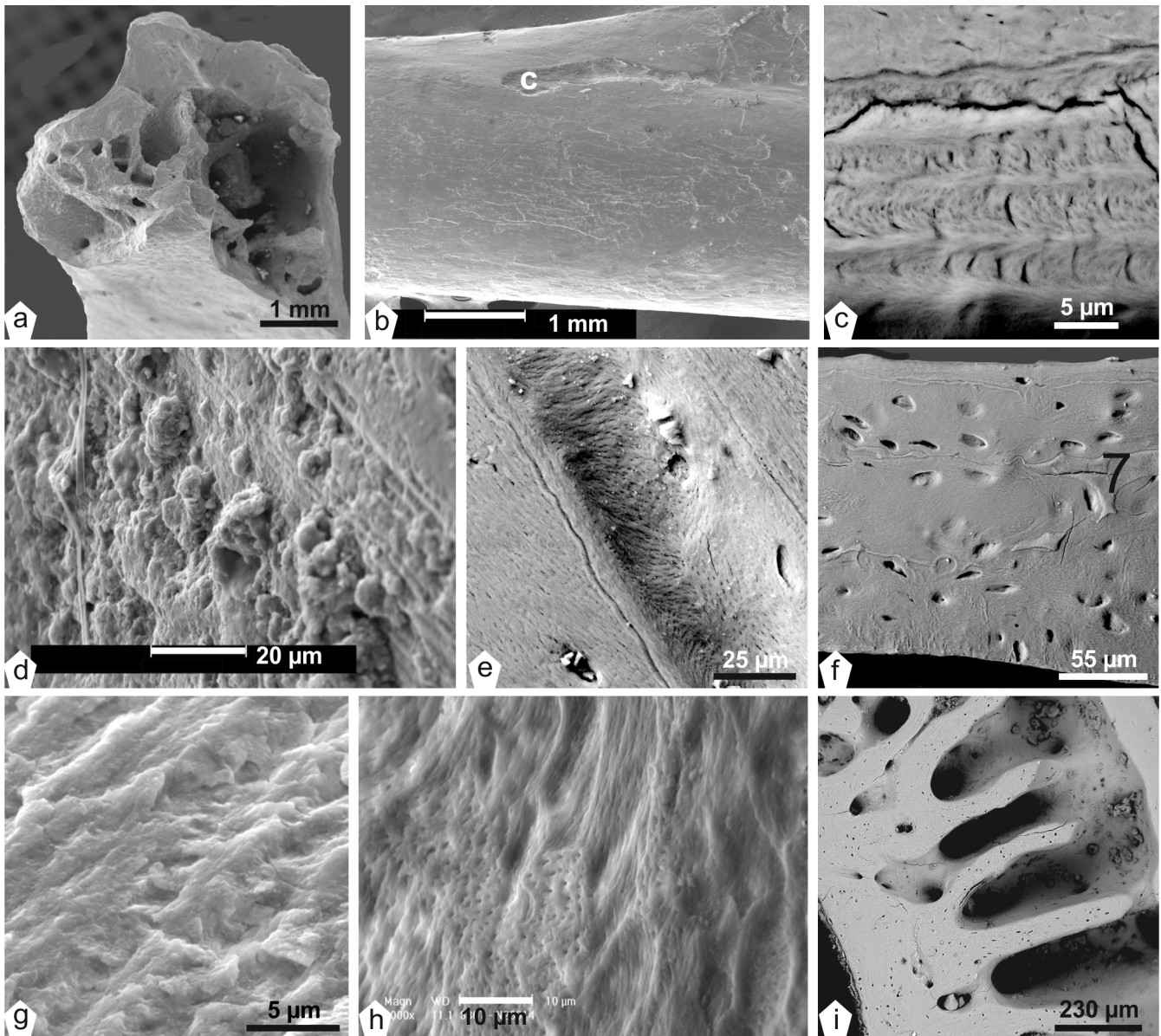


Figure 1- Microstructures osseuses fossiles d'El Harhoura 2 ; os longs de *Meriones* (microscopie électronique à balayage).

a : fracture d'une épiphyse d'un os de la couche 2 montrant que les cavités naturelles ne sont pas comblées par du sédiment ou des précipitations minérales secondaires. b : diaphyse avec cupule (C) et écaillage de la couche 4a ; la forme allongée de la cupule résulte peut-être de l'altération du passage d'un vaisseau sanguin. c : structure en arceaux de l'os lamellaire de la couche 4b ; surface polie nettoyée à HCl 1% pendant 10 sec. d : fracture montrant la cavité médullaire de la couche 4b, avec quelques dépôts secondaires. e : os de la couche 5, montrant un vaisseau dont la structure est bien conservée ; surface polie nettoyée à HCl 1% pendant 30 sec. f : coupe montrant toute l'épaisseur de la diaphyse dans un os de la couche 7 ; surface polie nettoyée à HCl 1% pendant 30 sec. g : fracture montrant la structure lamellaire d'un os de la couche 8. h : fracture ancienne montrant la structure bien conservée dans la couche 9. i : les cavités naturelles de l'os trabéculaire de l'épiphyse ne contiennent que quelques faibles dépôts secondaires dans la couche 10 ; surface polie nettoyée à HCl 1% pendant 1 mn.

Figure 1 – Microstructures of the fossil bones from El Harhoura 2 ; long bones of *Meriones* (scanning electron microscope).

a : broken epiphysis of a layer 2 bone, showing that the natural cavities are not filled with sediment or secondary minerals. b- cupule (C) on the diaphysis and desquamation in the layer 4a ; the elongated shape of the cupule can be the result of the alteration of a blood vessel. c : curved structures in the sublayers of the lamellar bone, layer 4b ; polished surface cleaned with HCl 1 % for 10 sec. d : fracture showing the medullary cavity in layer 4b, with some secondary deposits. e : layer 5 bone, showing a well preserved blood vessel ; surface cleaned with HCl 1 % for 30 sec. f : section showing all the diaphysis thickness in a layer 7 bone ; polished surface cleaned with HCl 1 % for 30 sec. g : fracture showing the lamellar structure in a layer 8 bone. h : old fracture showing the well preserved structure of a layer 9 bone. i : the natural cavities of the trabecular bone in the epiphysis zone contains only a few secondary deposits in a layer 10 sample ; surface cleaned with HCl 1 % for 1 mn.

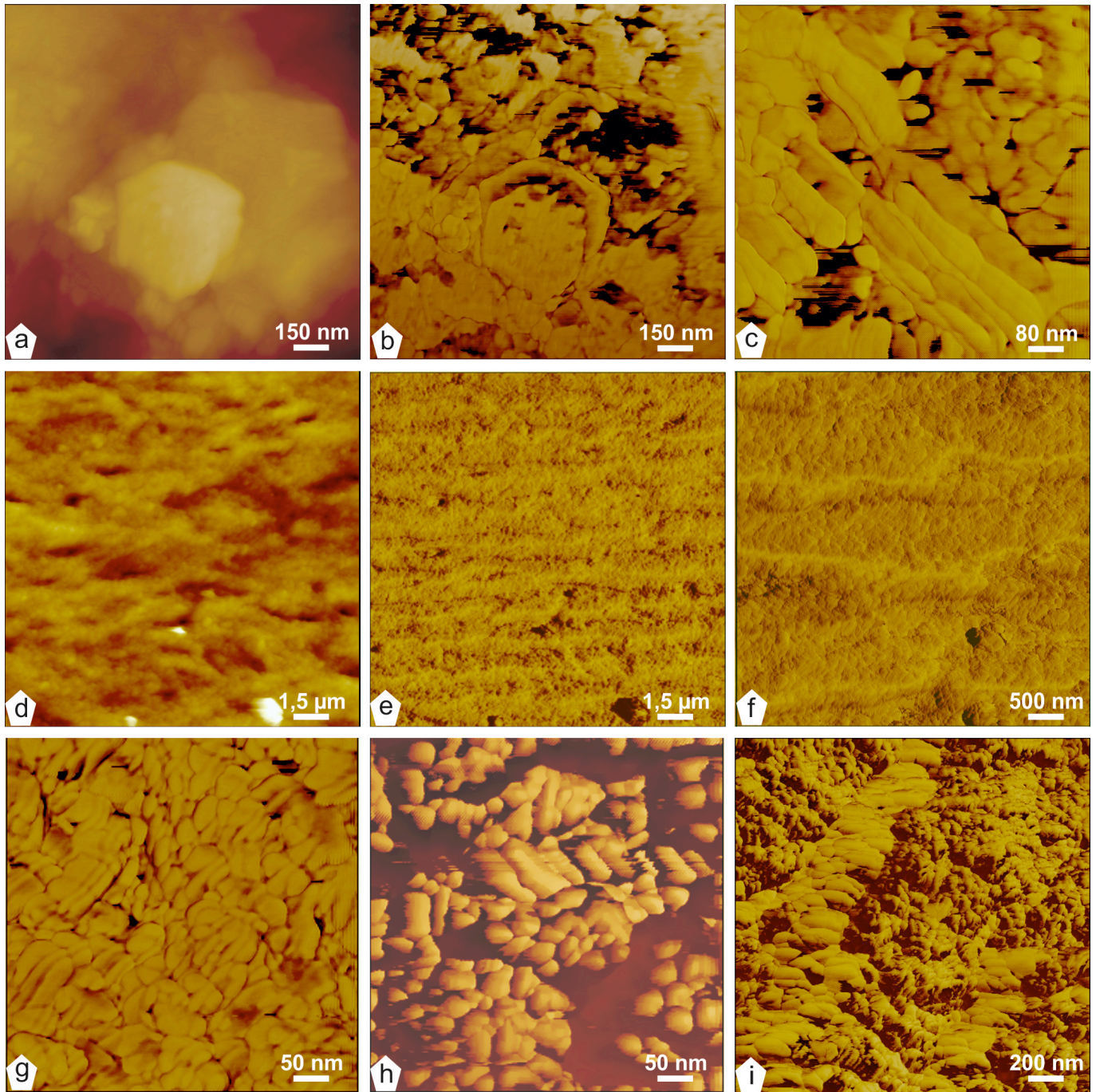


Figure 2 - Nanostructures osseuses (microscopie à force atomique). a - c : *Rattus* sp. actuel; d-i : *Meriones* fossiles. a : cristaux polygonaux en plaquettes superposés dans une phalange, image topographique ; surface polie nettoyée à l'EDTA disodique pendant 6 h à température ordinaire. b : id., image en contraste de phase. c : cristallites allongés sur le même spécimen ; image en contraste de phase. d : structure lamellaire de la diaphyse d'un os de la couche 4b, surface polie nettoyée avec HCl 1% 10 sec., image topographique. e : id., image en contraste de phase. f : détail de 2e, image en contraste de phase. g : cristallites allongés dans le niveau 5, surface polie nettoyée à HCl 1% pendant 30 sec. ; image en contraste de phase. h : surface polie nettoyée à l'acide formique 0.1% pendant 10 sec., puis à HCl 1% pendant 15 sec., montrant des cristallites allongés, couche 11 ; image en contraste de phase. i : même spécimen nettoyé à l'acide formique 0.1% pendant 10 sec, montrant des cristallites allongés disposés en une rangée ; image en contraste de phase.

Figure 2 – Bone nanostructures (atomic force microscope).

a - c : *Rattus* sp. Modern sample; d-i : fossil *Meriones* from El Harhoura 2. a : superimposed polygonal crystals in a phalanx ; topographic (or height) image ; polished surface cleaned with disodic EDTA for 6 hours at room temperature. b : id., phase image contrast. c : elongated crystals in the same sample ; phase image contrast. d : lamellar structure in the diaphysis of a layer 4b bone ; polished surface cleaned with HCl 1% for 10 sec. ; height image. e : id., phase image contrast. f : detail of figure 2^e, phase image contrast. g : elongated crystallites in layer 5, polished surface cleaned with HCl 1% for 30 sec. ; phase image contrast. h : polished surface cleaned with formic acid 0.1% for 10 sec., then HCl 1% for 15 sec., showing elongated crystallites in a layer 11 bone ; phase contrast image. i : same sample cleaned with formic acid 0.1% for 10 sec. showing elongated crystallites arranged in a row ; phase image contrast.

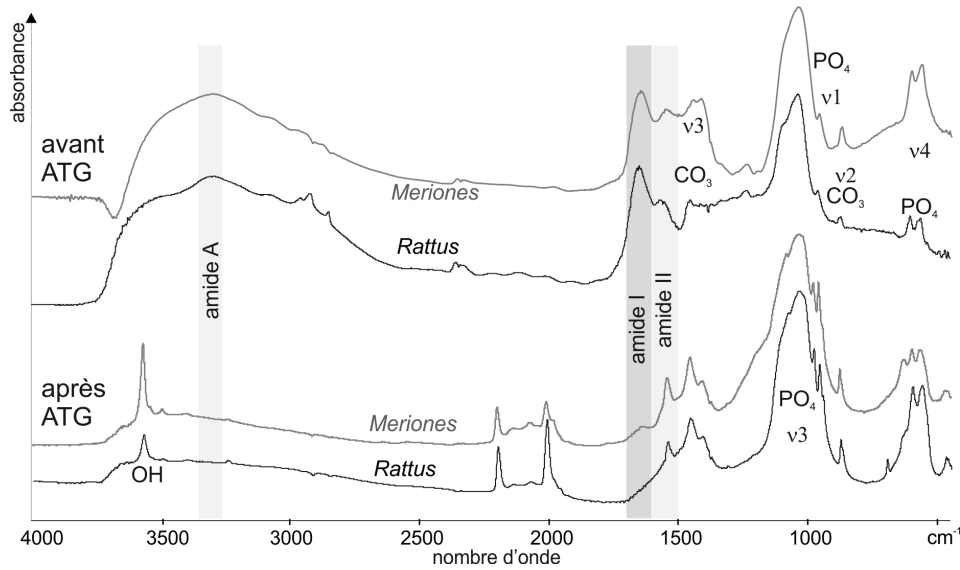


Figure 3 - Spectres infrarouges (DRIFT) de deux fémurs actuels (*Rattus* et *Meriones*) avant et après analyse thermogravimétrique (ATG), montrant la persistance des bandes attribuées au minéral (PO_4 et CO_3) et la réduction des bandes organiques (amide) après l'ATG.

Figure 3 - Infrared spectrum (DRIFT) of two modern femurs (*Rattus* and *Meriones*) before and after a thermogravimetric analysis (TGA), showing that bands assigned to the mineral components are still visible (PO_4 and CO_3), whereas bands assigned to the organic components (amide) are reduced after TGA.

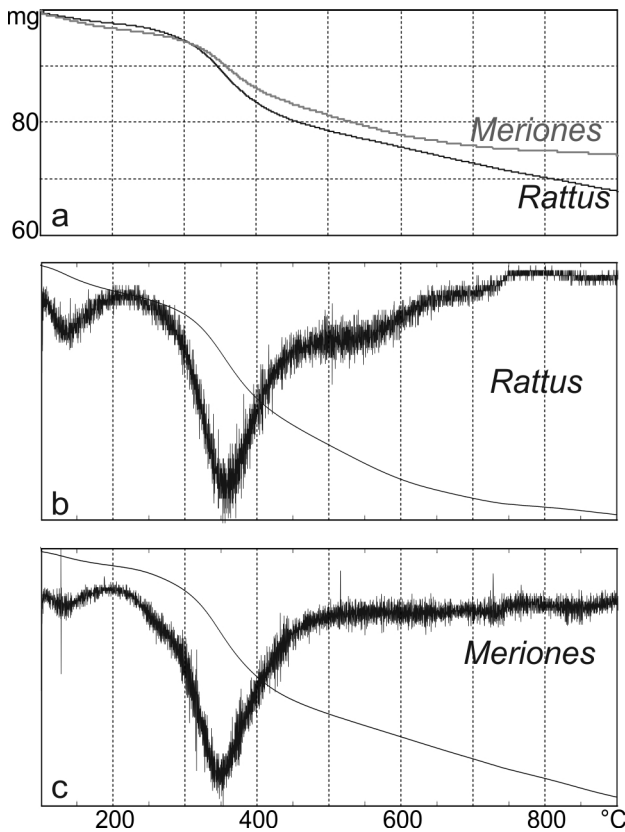


Figure 4 - Fémurs de deux rongeurs actuels. a : thermogrammes. b : dérivée de premier ordre du thermogramme de *Rattus*, montrant la perte de poids la plus visible vers 350°C. c : dérivée de premier ordre du thermogramme de *Meriones*.

Figure 4 – Modern rodent femurs. a : thermograms. b : first derivative order of the *Rattus* thermograms showing that the major weight loss is at about 350°C. c : first derivative order of the *Meriones* thermogram.

Les courbes dérivées de premier ordre des pertes de poids mettent en évidence les différences de comportement des os des différents niveaux de la grotte (Fig. 7). Alors que l'os du niveau 1 a un profil similaire à celui des os actuels, il n'en est pas de même pour tous les autres niveaux. En effet la perte de poids la plus importante intervient légèrement avant 750°C pour le niveau 2, et ensuite plutôt vers 800°C. Une fois encore, la dérivée du niveau 10 a un profil différent (Fig. 7). Dans tous les spécimens, la dérivée montre la perte de l'eau superficielle entre 120 et 150°C.

Les spectres infrarouges sur les résidus de l'ATG sont relativement similaires (Fig. 8). On peut, cependant, noter la grande similitude des spectres des niveaux 1 et 4b dans la région entre 1700 et 2700 cm^{-1} . Les bandes PO_4 et CO_3 sont visibles, mais leurs intensités respectives ont été modifiées par rapport à l'os actuel. Les bandes organiques sont très réduites ou inexistantes, notamment l'amide A. Des bandes à partir de 3500 cm^{-1} correspondent à des liaisons OH, probablement dues à l'absorption d'humidité atmosphérique à la surface des échantillons.

DISCUSSION

Données de la littérature

Les comparaisons avec les données de la littérature sont difficiles à effectuer, car les conditions expérimentales en ATG sont diverses (gaz, gradient de température, température maximale..), et parfois ne sont pas indiquées.

Par exemple, Lozano *et al.* (2003) ont comparé le comportement du collagène et de l'os (un fragment de radius et de crâne humain actuels) en les chauffant sous air jusqu'à plus de 800°C, après avoir éliminé les lipides. Environ 10% de perte de poids intervient avant 200°C, dans les os et le collagène. Ensuite, jusqu'à 800°C, les os perdent moins de

30% de leur poids, le collagène en perdant jusqu'à 90%. Les spectres FTIR du matériel chauffé en isotherme à 600°C montrent les bandes minérales et la quasi disparition des bandes organiques.

Mkukuma *et al.* (2004) ont confirmé que les thermogrammes différaient, pour un même échantillon, selon le gaz utilisé. En effet, l'oxygène de l'air joue un rôle

important et contribue à une meilleure combustion. Ces auteurs ont, également, montré que divers types d'os produisaient des profils légèrement différents. Il s'agit probablement de variations dans les rapports os spongieux - os compacts, mais aussi de la fraîcheur des os, plus ou moins secs.

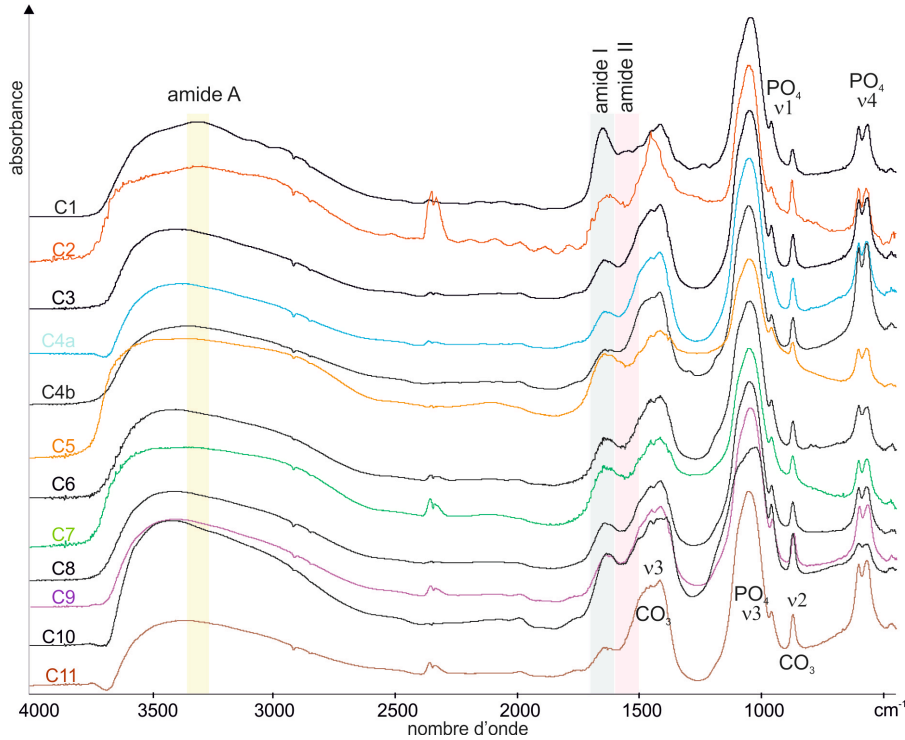


Figure 5 - Spectres infrarouges (DRIFT) d'os longs de *Meriones* des niveaux fossiles de la grotte El Harhoura 2, avant ATG. C1, C2... : niveaux fossiles de la grotte selon la terminologie de Nespoulet et El Hajraoui (2012).

Figure 5 - Infrared spectrum (DRIFT) of fossil long bones of *Meriones* collected in the layers of El Harhoura 2 cave, before TGA. C1, C2... : stratigraphic layers according to Nespoulet and El Hajraoui (2012).

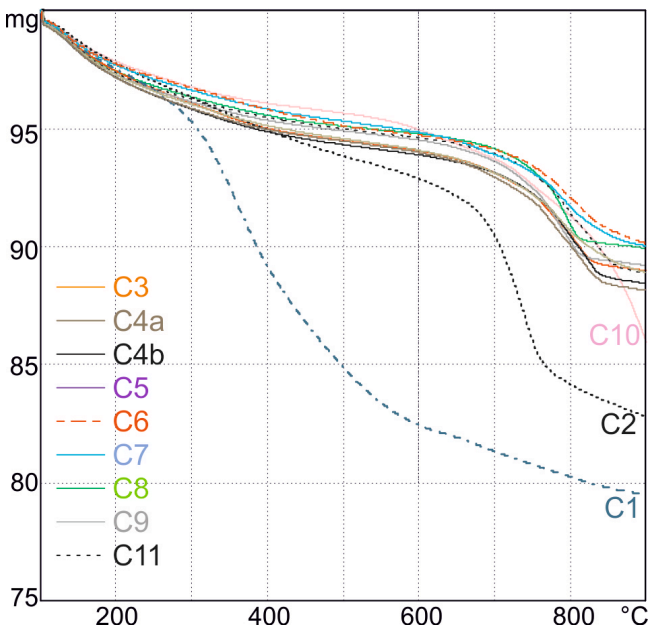


Figure 6 - Thermogrammes établis sur les poudres d'os longs de *Meriones* des niveaux fossiles de la grotte d'El Harhoura 2.

Figure 6 - Thermogrammes performed on powdered long bones of fossil *Meriones* collected in the layers of El Harhoura 2 cave.

L'os humain compact, chauffé de 25 à 1250° C sous argon perd 41,5% de son poids (Miculescu *et al.* 2011). Une première étape à 250 °C correspond à une perte d'eau. Jusqu'à 600° C, la perte de poids est attribuée à la disparition du collagène, qui continue moins rapidement jusqu'à 800 °C. Sur des os récents de carcasses de grands mammifères ayant été exposées aux intempéries sur des sols en savane, Trueman *et al.* (2004) considèrent que la perte principale de poids entre 200 et 550°C résulte de la combustion des composés organiques. La corrélation avec le rapport organique/minéral calculé d'après les spectres infrarouges et celui déterminé par ATG atteint r2 = 0,86. De même, Etok *et al.* (2007) ont identifié trois phases majeures au cours des ATG sous une atmosphère composée de 20% d'oxygène et 80% d'hélium : de 25 à 250°C l'eau superficielle et celle liée aux protéines disparaît ; de 300 à 500°C, les composés organiques se transforment en charbon; au-delà de 500°C, tous les résidus organiques sont brûlés.

Metcalfe *et al.* (2009) ont utilisé des os archéologiques chauffés jusqu'à 950°C sous air. Les pertes de poids varient de 7,9 à 17, 2% selon le site, et les thermogrammes sont différents. Les spectres FTIR après TGA montrent la persistance des bandes PO₄ et CO₃, et une forte réduction des bandes amides.

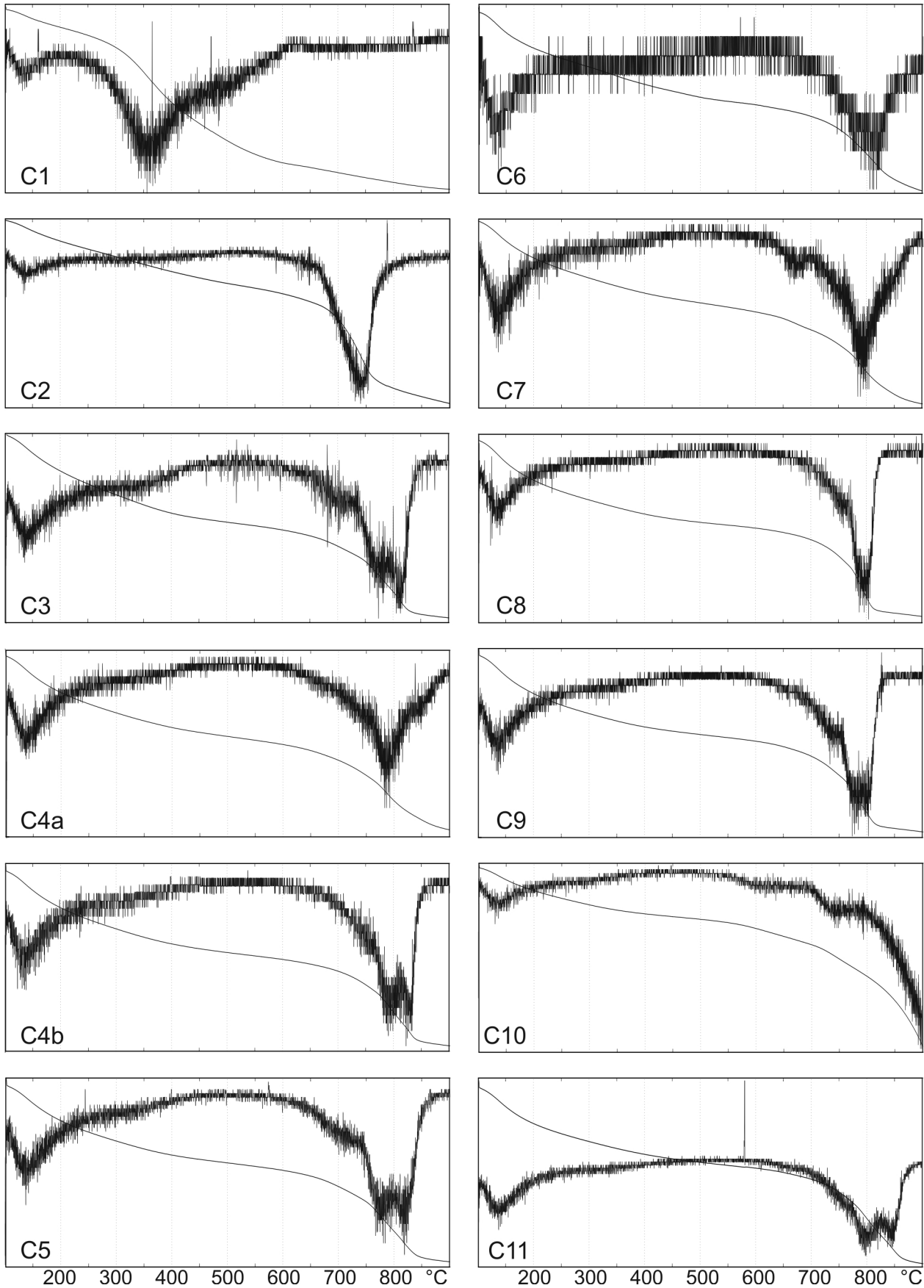


Figure 7 - Dérivées de premier ordre des courbes de perte de poids, montrant les conservations différentes des os fossiles, et les particularités du niveau 10.

Figure 7 – First order derivatives of the thermograms (weight loss curves), showing that the preservation of the fossil bones differs in the stratigraphic layers (especially the layer 10 sample).

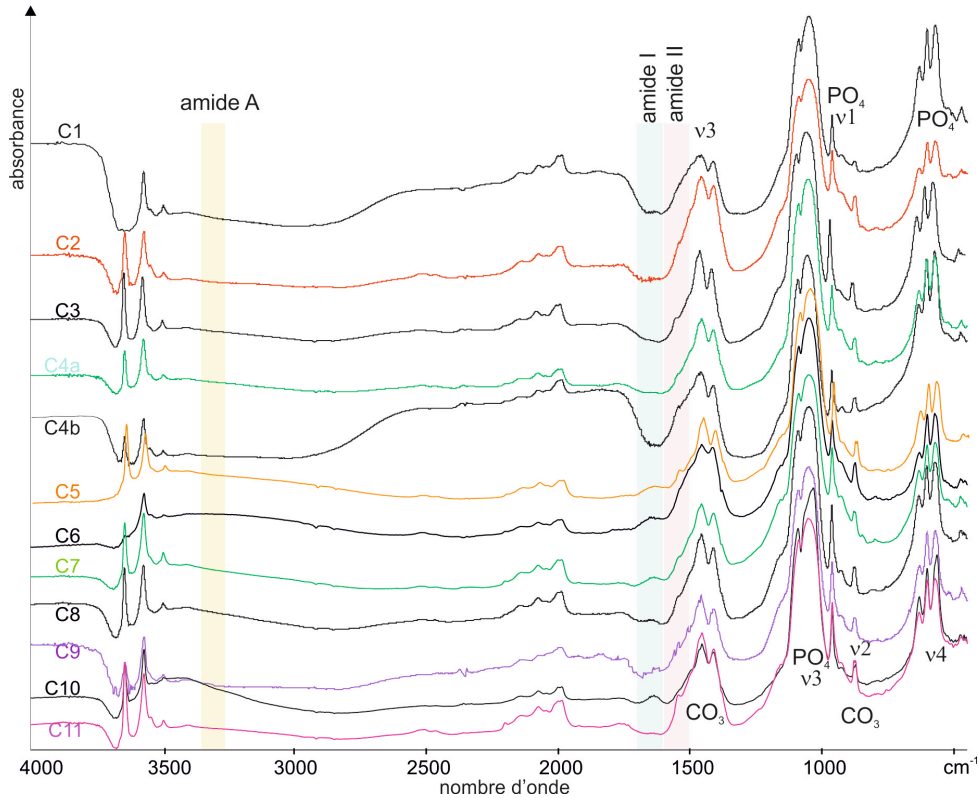


Figure 8 - Spectres infrarouges des os longs de *Meriones* fossiles après ATG. A noter : la persistance de bandes minérales et la disparition quasi totale des bandes organiques (amides A, I et II).

Figure 8 – Infrared spectrum of the fossil bones of *Meriones*, after TGA. Mineral bands are still visible, but the organic bands are absent or very weak (amides A, I and II).

Très récemment, le consensus attribuant la perte de poids entre 200-250°C et 550-600°C aux composés organiques a été nettement remis en cause par les travaux de Pasteris *et al.* (2014). Dans des apatites de synthèse contenant des taux variés de carbonate, l'eau de constitution est présente dans la structure cristalline. Les os contiennent également de l'eau dans le composé minéral, ce qui confirme les observations de Mc Connell (1970).

Les principales étapes identifiées dans la littérature sont résumées dans la figure 9.

Comparaison des rongeurs actuels et fossiles

Les os actuels ont des profils infrarouges et ATG similaires, mais pas identiques. Les différences peuvent avoir plusieurs causes : différence de taxon, âge de l'animal, régime alimentaire, différence d'état (durée du stockage en collection), etc.

Les fossiles, malgré une minéralogie et une microstructure peu modifiées, ont subi des altérations de cristallinité et de composition, notamment la disparition de composés organiques. Certaines bandes PO4 sont absentes chez les fossiles : ainsi la bande à 1037 cm-1, utilisée dans le rapport CO3/PO4. Un rapport organique - minéral a été déduit à partir des intensités des bandes amide I (organique) et PO4 (minéral) avant ATG (Farre *et al.* 2014). La corrélation linéaire entre ce rapport et la perte de poids entre 200 et 550°C en ATG est $r = 0.89$ (Fig. 10a).

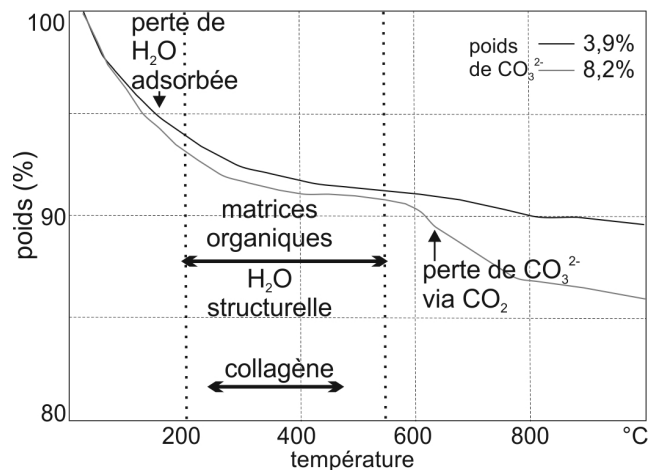


Figure 9 - Thermogrammes de deux apatites dont le contenu en CO₃ est différent, résumant les principales étapes de la dégradation et les hypothèses actuelles.

Figure 9 – Thermograms of two apatites with different CO₃ contents, showing the main stages of the alteration and the main hypotheses.

Cependant, la corrélation est contrainte essentiellement par les deux spécimens actuels, et la couche 1 est nettement située en dehors de l'intervalle de confiance. Les autres

niveaux sont regroupés sans qu'une relation entre perte de poids et âge stratigraphique puisse être établie. Dans la mesure où cette corrélation est relativement élevée, la perte de poids entre 200 et 550°C correspond partiellement à la combustion de la matrice organique. Cependant, les travaux de Pasteris *et al.* (2014) montrent la contribution de l'eau de constitution dans cet intervalle de température, alors que dans les interprétations traditionnelles, elle est achevée vers 200 - 250°C.

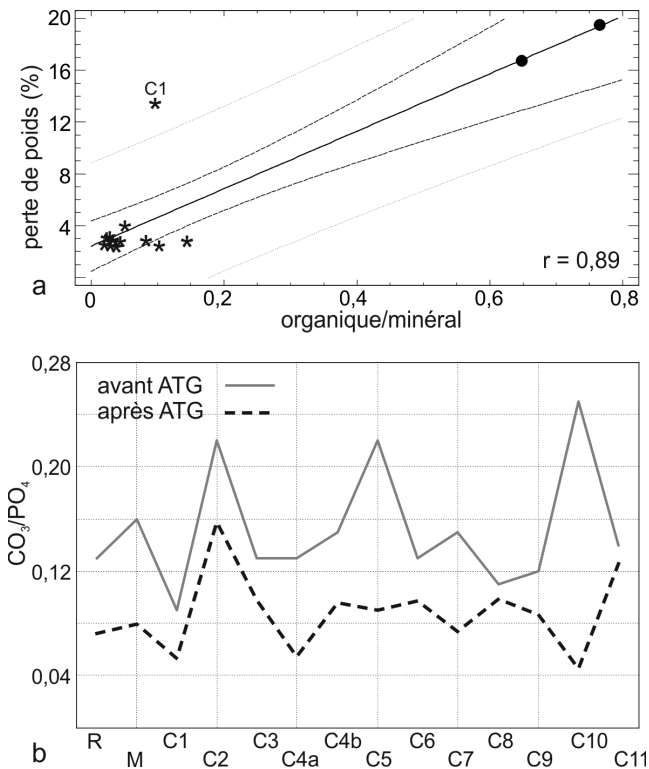


Figure 10 - a : corrélation linéaire entre le rapport de teneurs en composés organiques et minéraux établis par FTIR, et la perte de poids en ATG. Cercles : os actuels, étoiles : os fossiles des niveaux sédimentaires d'El Harhoura 2. --- b : rapport carbonate - phosphate avant et après ATG sur les os récents et fossiles. R: *Rattus*, M: *Meriones*, C1, C2... : os des niveaux sédimentaires de la grotte d'El Harhoura 2.

Figure 10 – a : linear correlation between the organo-mineral ratio contents calculated from DRIFT analyses, and the TGA weight loss. Circles : modern bones, stars : fossil bones of El Harhoura 2 cave. --- b : carbonate – phosphate ratio before and after TGA on modern and fossil bones. R : *Rattus*, M : *Meriones*, C1, C2... : bones from the sedimentary layers of El Harhoura 2 cave.

La spectrométrie infrarouge permet d'estimer le rapport carbonate/phosphate, à partir des intensités des bandes situées vers 1455 cm^{-1} pour les carbonates et 1040 cm^{-1} pour les phosphates. La comparaison de ce rapport avant et après ATG montre les différences de comportement des os fossiles le long de la séquence stratigraphique (Fig. 10b). Dans l'ensemble, ce rapport est plus faible après l'ATG, montrant que les carbonates se dégradent plus que les phosphates au cours de la combustion, chez les os actuels comme chez les fossiles. Cependant, si ce rapport avant et après ATG évolue de façon parallèle chez les actuels et les fossiles jusqu'à la couche 4b, la seconde partie des profils de la couche 5 à la

couche 11 correspond à une corrélation négative. Les paramètres de structure et de composition précédemment étudiés (Farre *et al.* 2014) ne permettent pas d'expliquer cette différence de comportement des carbonates à partir du niveau 5. En ce qui concerne ces deux composés (carbonate et phosphate), la fossilisation a induit des différences, mais pas de tendance régulière.

CONCLUSION

La séquence expérimentale FTIR - ATG - FTIR a été réalisée sur les os longs de *Meriones* actuels et fossiles, ainsi que sur un autre rongeur actuel: *Rattus sp.* Malgré la diagenèse peu intense subie par ces spécimens, d'une part, la variabilité des résultats ne peut être négligée, et d'autre part, aucune tendance n'est visible le long de la coupe. Cette constatation est similaire à celle des études précédentes sur les mêmes échantillons, basée sur la couleur, la cristallinité, etc. (Dauphin *et al.* 2012, Farre *et al.* 2014). Estimer une qualité de conservation d'après un seul critère n'est, donc, pas réaliste, étant donné l'absence de corrélation entre les divers paramètres étudiés.

Deux questions générales découlent de ces résultats.

La diagenèse est irrégulière en intensité pour un paramètre donné, et dans les types de modifications observées. De plus, les corrélations entre les divers paramètres sont faibles. Pour un spécimen donné, la diagenèse varie selon le type d'os. Mais, elle varie également pour un os donné dans des taxons différents. Dans d'autres sites, il a également été montré que la diagenèse variait dans un os donné (Henderson *et al.* 1983). Dans ces conditions, quels sont les biais induits dans les paramètres géochimiques habituellement utilisés pour les datations et les reconstructions paléoenvironnementales ? De même, que valent les rapports de taxons, ou les tableaux de présence - absence de taxons également utilisés pour le paléoenvironnement ? Les divergences d'interprétation à partir des listes fauniques d'un site ne sont pas rares selon que l'on utilise les gros ou les petits mammifères.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par le projet ANR-09-PEXT-004 MOHME. Nous avons également bénéficié du support logistique du Pr. M.A. El Hajraoui et des membres de l'Institut National des Sciences de l'Archéologie et du Patrimoine (Rabat, Maroc). R. Nespoulet et E. Stoetzel (UMR 7194, Muséum national d'histoire naturelle de Paris) ont sélectionné et trié les échantillons à analyser.

REFERENCES

- Berna F., Goldberg P., Horwitz L.K. *et al.* 2012. Microstratigraphic evidence of in situ fire in the Acheulean strata of Wonderwerk Cave, Northern Cape province, South Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109, 20, 1215-1220.
- Bonucci E. 2013. The mineralization of bone and its analogies with other hard tissues. *In* : Advances topics on crystal growth, Ferreira S.O., Intech, pp. 145-184.
- Dauphin Y. 1993. Potential of the Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT) method in paleontological studies of bones. *Applied Spectrometry*, 47, 1, 52-55.

- Dauphin Y. 1993. Spectrométrie infrarouge (DRIFT) des os de rongeurs fossiles de Tighenif (Pléistocène, Algérie). *Palaontologische Zeitschrift*, 67, 3/4, 377-395.
- Dauphin Y. & Brugal J.P. 2013. Taphonomy. In: Archaeology (UNESCO-EOLSS joint committee eds), Encyclopedia of life support systems (EOLSS), developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss publ., Oxford, UK. <http://www.eolss.net>
- Dauphin Y. & Denys C. 1992. Diagenèse différentielle chez les rongeurs fossiles - validité des paramètres géochimiques pour les reconstitutions des régimes alimentaires. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 99, 213-223.
- Dauphin Y., Kowalski C. & Denys C. 1994. Assemblage data and bone and teeth modifications as an aid to paleoenvironmental interpretations of the open-air pleistocene site of Tighenif (Algeria). *Quaternary Research*, 42, 340-342.
- Dauphin Y. & Lange-Badré B. 2000. Evaluation de la conservation de l'os fossile : intégration des différents niveaux d'observation. *Palaontologische Zeitschrift*, 74, 3, 441-457.
- Dauphin Y., Montuelle S., Quantin C. *et al.* 2007. Estimating the preservation of tooth structures: towards a new scale of observation. *Journal of Taphonomy*, 5, 1, 43-56.
- Dauphin Y., Nespoulet R., Stoetzel E. *et al.* 2012. Can colour be used as a proxy for paleoenvironmental reconstructions based on archaeological bones? El Harhoura 2 (Morocco) case study. *Journal of Taphonomy*, 10, 2, 69-84.
- Deniro M.J. & Schoneinger M.J. 1983. Stable carbon and nitrogen isotope ratios of bone collagen : variations within individuals, between sexes, and within populations raised on monotonous diets. *Journal of Archaeological Science*, 10, 3, 199-203.
- Etok S.E., Valsami-Jones E., Wess T.J. *et al.* 2007. Structural and chemical changes of thermally treated bone apatite. *Journal of Materials Science*, 42, 9807-9816.
- Farre B., Massard P., Nouet J. *et al.* 2014. Preservation of rodent bones from El Harhoura 2 cave (Morocco, Neolithic - Middle Palaeolithic): microstructure, mineralogy, crystallinity and composition. *Journal of African Earth Sciences*, 92, 1-13.
- Henderson P., Marlow C.A., Molleson T.I. *et al.* 1983. Patterns of chemical change during bone fossilization. *Nature*, 306, 358-360.
- Lee-Thorp J. & Sponheimer M. 2003. Three case studies used to reassess the reliability of fossil bone and enamel isotope signals for paleodietary studies. *Journal of Anthropological Archaeology*, 22, 208-216.
- Lozano L.F., Pena-Rico M.A., Heredia A. *et al.* 2003. Thermal analysis study of human bone. *Journal of Materials Science*, 38, 4777-4782.
- McConnell D. 1970. Crystal chemistry of bone mineral: hydrated carbonate apatites. *American Mineralogist*, 55, 1659-1669.
- Metcalfe J.Z., Longstaffe F.J., White C.D. 2009. Method-dependent variations in stable isotope results for structural carbonate in bone bioapatite. *Journal of Archaeological Science*, 36, 110-121.
- Miculescu F., Antonic J., Ciocan L.T. *et al.* 2011. Complex analysis of heat treated human compact bones. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, B73, 4, 203-212.
- Mkukuma L.D., Skakle, J.M.S., Gibson I.R. *et al.* 2004. Effect of the proportion of organic material in bone on thermal decomposition of bone mineral : an investigation of a variety of bones from different species using thermogravimetric analysis coupled to mass spectrometry, high-temperature X-ray diffraction, and Fourier Transform infrared spectroscopy. *Calcified Tissue International*, 75, 321-328.
- Munro L.E., Longstaffe F.J., White C.D. 2007. Burning and boiling of modern deer bone: effects on crystallinity and oxygen isotope composition of bioapatite phosphate. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 249, 90-102.
- Nelson B.K., Deniro M.J., Schoeninger M.J. *et al.* 1986. Effects of diagenesis on strontium, carbon, nitrogen and oxygen concentration and isotopic composition of bone. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 50, 9, 1941-1949.
- Nespoulet R. & El Hajraoui M.A. 2012. Présentation du site et archéostratigraphie. In : Préhistoire de la région de Rabat - Témara, Villes et sites archéologiques du Maroc, Vol. III, El Hajraoui M.A., Nespoulet R., Debénath A., Dibble H.L. eds., Inst. Nat. Sci. Archéol. Patrimoine, 27-30.
- Nespoulet R., El Hajraoui M.A., Amani F. *et al.* 2008. Palaeolithic and Neolithic occupations in the Témara region (Rabat, Morocco): Recent data on hominin contexts and behavior. *African Archaeological Review*, 25: 21-39.
- Okada K., Ozaki Y., Kawauchi K. *et al.* 1990. The usefulness of infrared microspectroscopy for IR spectroscopic measurements of solid proteins. *Applied Spectroscopy*, 44, 1412-1414.
- Pasteris J.D., Yoder C.H., Wopenka B. 2014. Molecular water in nominally unhydrated carbonated hydroxylapatite: the key to a better understanding of bone mineral. *American Mineralogist*, 99, 16-27.
- Shahack-Gross R., Bar-Yosef O., Weiner S. 1997. Black-coloured bones in Hayonim cave, Israel: differentiating between burning and oxide staining. *Journal of Archaeological Science*, 24, 439-446.
- Stoetzel E. 2009. *Les microvertébrés du site d'occupation humaine d'El Harhoura 2 (Pléistocène supérieur - Holocène, Maroc) : systématique, évolution, taphonomie et paléoécologie*. Thèse du Museum National d'Histoire naturelle de Paris, 432 p.
- Stoetzel E., Bailon S., Nespoulet R. *et al.* 2010. Pleistocene and Holocene Small Vertebrates of El Harhoura 2 cave (Rabat - Témara, Morocco) : an annotated preliminary taxonomic list. *Historical Biology*, 22, 303-319.
- Trueman C.N.G., Behrensmeyer A.K., Tuross N. *et al.* 2004. Mineralogical and compositional changes in bones exposed on soil surfaces in Amboseli National Park, Kenya: diagenetic mechanisms and the role of sediment pore fluids. *Journal of Archaeological Science*, 31, 721-739.