Sols, sédiments et biominéraux phosphatés : expériences *in vitro*

Pierre Massard[1], Yannicke Dauphin[2]

[1] Département « Géosciences », Université Paris 11

[2] Institut de systématique, Evolution, Biodiversité, ISYEB - UMR 7205 CNRS MNHN UPMC EPHE
Muséum national d'Histoire naturelle, Paris

1 Introduction

La composition des sols et des sédiments joue un rôle majeur dans la conservation des organismes qu'ils renferment. Lorsque les sols sont étudiés, c'est pour identifier les micro-organismes (bactéries et champignons), les phytolithes et pollens, mesurer leur pH, etc. Cependant, les échanges entre sols / sédiments et restes squelettiques dans les sites archéologiques ou fossiles et leurs implications dans la conservation des os, dents ou coquilles sont encore assez peu étudiés.

L'une des méthodes possibles pour tenter de comprendre les interactions entre sols et restes squelettiques consiste à reproduire *in vitro* les phénomènes naturels. Les expérimentations *in vitro* sur les dents peuvent être divisées en deux grandes catégories ; la première, qui donne lieu à la littérature la plus abondante, concerne les effets des acides organiques et des sucres dans les caries de l'émail. Les éléments chimiques libérés par ces attaques et les modifications de structure de l'émail, plus rarement de la dentine, sont analysés. Réalisées en milieu médical, ces expériences sont de très courtes durées [1-9]. Mais sucres et acides existant dans les sols et/ou étant libérés par les micro-organismes qu'ils contiennent, les résultats de ces expériences sont à prendre en considération. La seconde catégorie, notamment sur les os, consiste à assimiler la diagenèse à une élévation de température [10-13]. Si le chauffage des échantillons est utile pour cerner les habitudes alimentaires ou les pratiques funéraires, cette technique ne reflète que quelques très rares cas de mécanismes diagénétiques naturels.

2 Expérimentations *in vitro* : données générales

Le phosphore est un composant essentiel des tissus dentaires et osseux, et de nombreuses études *in situ* et *in vitro* ont confirmé l'action chimique des micro-organismes et des racines. Ainsi, les champignons des sols augmentent la disponibilité du P en dissolvant les minéraux phosphatés [14]. Par ailleurs, l'accumulation de cristaux d'oxalate de calcium sur certains champignons montre l'importance de l'acide oxalique dans les sols forestiers ; cet acide oxalique est lui-même produit par des champignons [15, 16]. Ces productions d'oxalate et les dégradations du tissu peuvent être très rapides (quelques jours) ainsi que le montrent les expériences faites sur la dentine [17]. Dans l'ensemble, les expériences *in vitro* réalisées sur des os montrent des modifications de certaines propriétés (perte de la biréfringence par exemple), mais les perforations observées sur les fossiles ne sont pas souvent visibles. L'action des bactéries est elle aussi limitée par la structure du tissu ; elles semblent suivre les cavités naturelles de l'os et les fibres de collagène [18].

Pour la plupart, les études *in vitro* analysent les quantités de P ou Ca libérées par une attaque acide en solution. Cependant, les éléments chimiques mineurs (c'est à dire en très faibles teneurs) jouent également un rôle dans les modifications diagénétiques. En effet, les échanges ne sont pas à sens unique. La comparaison des os et dents fossiles et actuels montre que les fossiles peuvent être enrichis en terres rares (REE) [19, 20]. Les variations observées sont dues à la structure et à la composition initiales du tissu (os, émail et dentine), et à celles du sol [21]. *In vitro*, la dentine « capture » ainsi des éléments chimiques de deux à quatre fois plus vite que l'émail, la limite entre l'émail et la dentine (EDJ) agissant comme une barrière (Figure 1). Les comportements des terres rares d'une part, et de U, Ba et Sr d'autre part dans l'os sont très différents, ce qui entraine des biais quand ces éléments sont utilisés pour dater ou reconstituer un paléoenvironnement (redox par exemple).

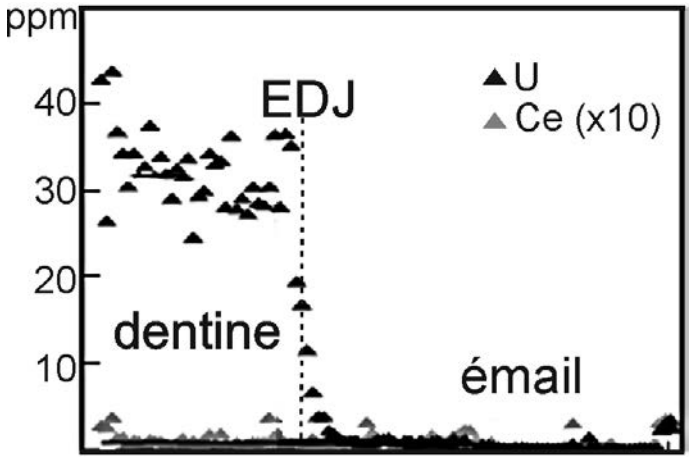


Figure 1 – Distribution de Ce et U dans une molaire actuelle d'*Equus*, montrant la différence de teneurs entre l'émail et la dentine. EDJ = *enamel dentine junction* [21].

De nombreux auteurs ont effectué des attaques de tissus minéralisés récents dans des conditions expérimentales variées. Certains ont procédé de façon analogue, notamment en ce qui concerne le type de tissu étudié, le domaine de pH concerné, les espèces chimiques et les concentrations des agents de ces attaques. La comparaison qualitative de ces attaques permet de dégager trois traits communs essentiels (Figures 2, 3) :

- Quels que soient le type de tissu étudié et la technique employée (composition constante, milieu tamponné, force ionique imposée...), l'attaque est d'autant plus rapide que le pH est plus faible [2, 22].

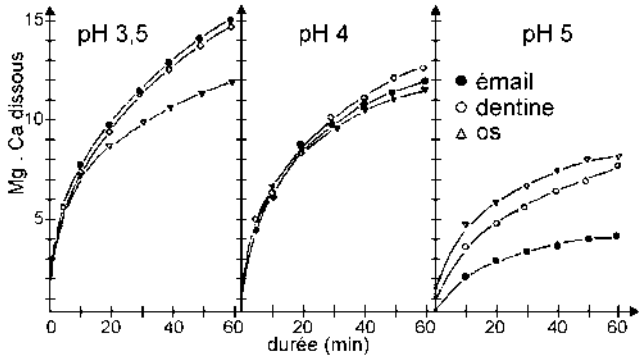


FIGURE 2 – Taux de dissolution de l'os, émail et dentine réduits en poudre, en fonction du pH [22].

- Dans tous les cas, le système réactionnel tend vers un équilibre correspondant à des concentrations limites des espèces chimiques solubilisées d'autant plus élevées que le pH est plus faible [2, 22]. Ces concentrations limites varient apparemment avec le type de tissu traité et les concentrations initiales des agents de ces attaques.
- Dans tous les cas également, la matrice organique semble avoir sur la réaction un effet complexe, principalement inhibiteur et dépendant du tissu étudié. L'aptitude du Ca en solution à former des sels phosphatés et/ou à réticuler les polyélectrolytes non collagéniques pourrait être la cause de cet effet inhibiteur de la matrice organique [22, 23].

Dans ces études, il est rare de voir l'analyse microstructurale du tissu soumis aux attaques *in vitro* associée à l'évolution chimique des solutions utilisées. Toutefois, en solutions tamponnées, les cristaux apatitiques de l'os se dissolvent, mais re-précipitent ensuite quand le pH est compris entre 7,6 et 8,1 [24]. De plus, les nouveaux cristaux résultant de cette recristallisation sont plus insolubles que les cristaux initiaux. Lorsque le tissu osseux est soumis à des solutions non saturées à pH 5,5, les nanoparticules osseuses d'un diamètre de 20-50 nm ne semblent pas affectées par la dissolution. Les différents types de phosphate de Ca ne réagissent pas de façon identique, montrant ainsi l'influence des dimensions des cristaux et de la matrice organique [25, 26].

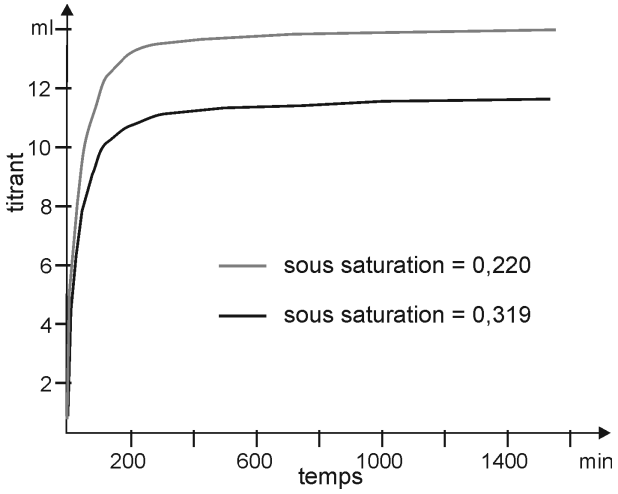


FIGURE 3 – Dissolution de l'os à composition constante : la dissolution est pratiquement nulle à la fin de l'expérience [2].

3 Mise en place d'une expérience *in vitro* sur les dents de *Sus scrofa*

La différence de conservation entre émail et dentine d'une même dent dans les sites fossiles a été maintes fois signalée. Afin de mieux cerner les paramètres contrôlant les attaques subies par les dents en cours d'enfouissement, nous avons mis en place des expériences *in vitro* associant analyses des solutions d'incubation et examens microstructuraux de dents d'un gros mammifère, le sanglier (*Sus scrofa*). Ces dents ont été soumises à l'action d'extraits solubles d'un sol de son milieu de vie (bois de la région parisienne), et de solutions contenant les produits identifiés dans ces extraits. Les analyses régulières des solutions permettent de suivre l'évolution des altérations des matériaux.

3.1 Rappels sur la structure et la composition des dents

Comme celles des autres mammifères, les dents de *Sus scrofa* sont fondamentalement constituées de deux tissus minéralisés distincts : l'émail et la dentine. Ces tissus sont eux-mêmes essentiellement formés d'apatites (phosphates de calcium), famille de minéraux de même structure, mais présentant de larges variations de composition par le biais de nombreuses substitutions [27]. Bien que chimiquement et minéralogiquement proches, ces tissus montrent des micro- et des nanostructures très différentes (Figure 4) (*cf.* chapitre 2). En outre, émail et dentine présentent des teneurs non négligeables en matière organique, notamment dans la dentine où elle peut représenter jusqu'à 20 % en poids. Enfin, la composition et la structure des matrices organiques de ces deux tissus diffèrent. Il faut donc s'attendre à des comportements différenciés de ces tissus au cours de la diagenèse comme au cours des attaques expérimentales.

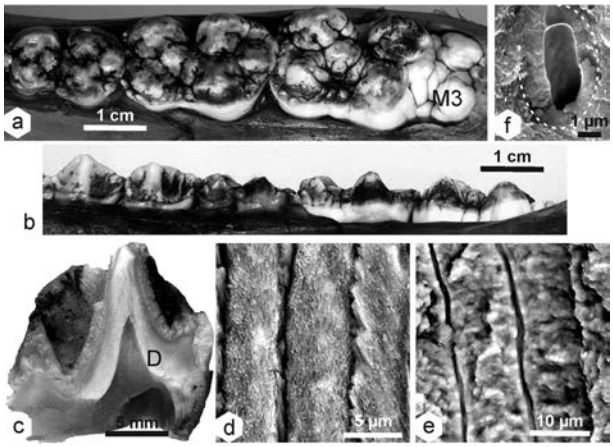


FIGURE 4 – (a-b) mâchoires inférieures de *Sus scrofa* adulte, montrant les molaires utilisées dans l'expérience ; (c) fracture montrant l'émail épais externe et la dentine (D) ; (d) fracture montrant l'organisation prismatique de l'émail ; (e) cassure montrant les trajets parallèles des tubules de la dentine ; (f) cassure oblique de la dentine, avec zone péritubulaire (ligne blanche en pointillés).

3.2 Conditions expérimentales

Les conditions des attaques expérimentales réalisées sur les dents de *Sus scrofa* ont été choisies en se fondant sur les analyses des extraits solubles de l'humus du Luvisol FAO 1998 [28]. Outre de faibles quantités de sucres (glucose et fructose principalement), et d'acides humiques et fulviques, ces extraits solubles sont essentiellement composés d'acide acétique (HCO_2CH_3) et d'acide oxalique ($H_2C_2O_4$) (Figure 5).

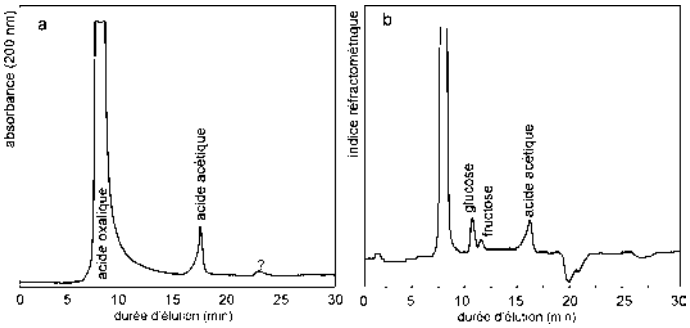


FIGURE 5 – Profils chromatographiques des extraits solubles de sol montrant la présence d'acides organiques (acétique et oxalique) et de sucres (fructose et glucose).

Les solutions utilisées pour ces attaques sont donc de trois types :

- solution d'acide acétique HCO_2CH_3 seul à $5*10^{-3}$ M ;
- solution d'acide oxalique $H_2C_2O_4$ seul à $5*10^{-3}$ M ;
- solution équimolaire HCO_2CH_3 + $H_2C_2O_4$ à $2{,}5*10^{-3}$ M chaque.

Des surfaces polies de fragments de molaires et prémolaires, comportant émail et dentine, ont été soumises à ces solutions acides, pendant 24 heures, à température ambiante.

En parallèle, des prémolaires et des molaires ont été broyées, et la dentine a été triée. La fraction granulométrique 0,2 à 2 mm a été utilisée. Seule la dentine a été prise en considération pour les expériences de dissolution, l'émail étant quantitativement minoritaire et de plus difficile à séparer complètement des fragments de dentine.

Dans les bilans réactionnels, cette dentine est assimilée en première approximation à de l'hydroxyapatite pure $Ca_5(PO_4)_3OH$. Dans chacun des trois types d'attaques réalisées, 200 mg d'échantillon sont placés dans 200 ml de solution acide sous atmosphère STP (298 K, 1 bar), avec agitation magnétique continue. Chaque attaque a été menée durant 59 jours, et des prélèvements réguliers ont permis de suivre les évolutions des concentrations respectives en solution du Ca et des phosphates. En milieu acide l'espèce chimique dominante stable des phosphates est $H_2PO_4^-$ [29]. De plus, en présence de Ca^{2+} en solution, il se forme le complexe neutre $Ca(H_2PO_4)_2$. Le Ca est donc présent en solution sous deux spéciations : Ca^{2+} et $Ca(H_2PO_4)_2$. Le bilan réactionnel global de l'attaque acide de la dentine assimilée à de l'hydroxyapatite pure peut alors s'écrire :

$$Ca_5(PO_4)_3OH + 7\ H^+ \rightleftharpoons 7/2\ Ca^{2+} + 3/2\ Ca(H_2PO_4)_2 + H_2O$$

Bilan dans lequel n'interviennent que les espèces chimiques dominantes stables en milieu acide.

Dans les deux expériences (24 heures et 59 jours), l'état des tissus dentaires a été observé aux microscopes électronique à balayage et à force atomique [28].

Une autre série d'expériences a été conduite en utilisant des fragments de granulométrie inférieure à 2 mm, comprenant émail et dentine de prémolaires et molaires d'un animal adulte. Ces fragments ont été incubés dans des extraits solubles du sol forestier, à température ambiante et avec une agitation modérée, pendant 56 jours. Des prélèvements réguliers de la solution ont permis un suivi de l'évolution du pH et de sa composition [30]. L'état des fragments a été observé aux microscopes électronique à balayage et à force atomique.

4 Attaque par la solution d'acide acétique HCO_2CH_3 seul à $5*10^{-3}$ M

4.1 Évolution chimique des solutions

Outre quelques fluctuations initiales probablement dues à une forte hétérogénéité des interfaces réactionnelles solide - solution (orientations anisotropes des tubules dans les fragments [28, 30], distribution irrégulière des tailles des fragments de dentine, etc.), il s'établit après 17 jours un état d'équilibre interprété ici comme caractérisant la solubilité limite de la dentine dans les conditions imposées :

- le calcium total se stabilise à 300 mg/l $\simeq$ 7,5*10^{-3} M ;
- les phosphates se stabilisent en équivalent PO_4^{3-} à 400 mg/l $\simeq$ 4,2*10^{-3} M ;
- le pH se stabilise à 4,35.

La validation du bilan réactionnel global proposé peut alors s'effectuer en comparant la valeur de la constante de la loi d'action de masse (LAM) associée, déduite des données de l'expérience, à la valeur théorique K de cette constante calculée à partir des données thermodynamiques standard, soit :

$$(|Ca^{2+}|^{7/2} * |Ca(H_2PO_4)_2|^{3/2}) / |H^+|^7 = K$$

Dans cette expression :

- l'hydroxyapatite et l'eau sont assimilées à des espèces chimiques quasi pures ayant des activités égales à l'unité ;
- les activités des solutés Ca^{2+}, $Ca(H_2PO_4)_2$ et H^+ sont corrélativement identifiées à leurs concentrations respectives, c'est à dire que la solution est considérée comme diluée [31, 32].

(a) Le calcul à partir des données expérimentales nécessite la prise en compte des différentes spéciations des espèces en solution déduites des concentrations totales mesurées, soit ici :

$|Ca^{2+}| + |Ca(H_2PO_4)_2| = 7{,}5*10^{-3}$ M pour le calcium total, et
$|Ca(H_2PO_4)_2| = 2{,}1*10^{-3}$ M pour les phosphates, puisque le complexe neutre comporte deux groupes PO_4/mole.

D'où : $|Ca^{2+}| = 5{,}4*10^{-3}$ M

Et pour pH = 4,35, soit $|H^+| = 10^{-4,35}$

Il vient alors par substitution :

$$(|Ca^{2+}|^{7/2} * |Ca(H_2PO_4)_2|^{3/2}) / |H^+|^7 = 10^{+18,5}$$

(b) Le calcul de la valeur théorique K de la constante de la loi d'action de masse dans les conditions STP s'effectue à partir de la relation générale :

$$\ln K = -\Delta G^\circ / RT$$

dans laquelle ΔG° est l'enthalpie libre standard réactionnelle déduite des enthalpies libres standard de formation des espèces chimiques concernées, R la constante des gaz parfaits, et T la température absolue standard (298 K) [31, 33-34]. Il vient finalement :

$$\ln K = +44{,}39 \text{ soit } K \simeq 10^{+19,3}$$

Il y a donc moins d'un ordre de grandeur entre la valeur expérimentale ($10^{+18,5}$) et la valeur théorique ($10^{+19,3}$) de la constante K de la loi d'action de masse (LAM)

associée au bilan réactionnel global. Aussi, d'une part compte tenu des approximations admises notamment en ce qui concerne :

- la dentine assimilée à de l'hydroxyapatite pure exempte de matière organique ;
- la solution d'attaque assimilée à une solution diluée ;

et d'autre part :

- vu la forte dépendance de la valeur expérimentale de K vis-à-vis des données intervenant dans l'expression de la LAM ;
- vu la précision délicate à estimer à partir des données tabulées pour le calcul théorique de la valeur K ;

la validation du bilan réactionnel global proposé peut être considérée satisfaisante.

4.2 Altérations microstructurales

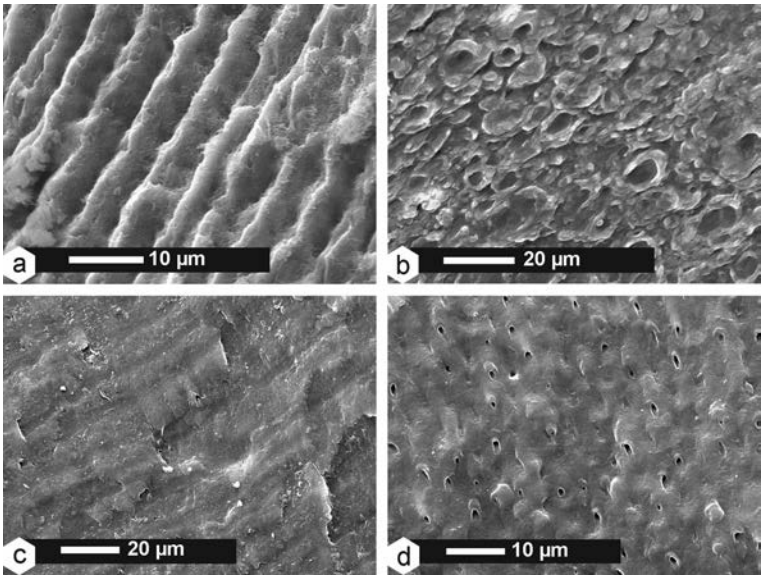


Figure 6 – Altérations dues à une attaque à l'acide acétique. (a) prismes de l'émail après une attaque de 24 heures sur une surface polie ; (b) aspect d'un fragment de dentine après une attaque de 59 jours ; (c) *idem*, sur une fracture parallèle aux tubules ; (d) *idem*, sur une fracture perpendiculaire aux tubules dont la section est visible.

Les surfaces polies de l'émail traitées à l'acide acétique montrent encore les structures prismatiques (Figure 6a), mais la surface des prismes semble lisse et leur structure interne en cristallites allongés n'est pas révélée. La dentine des mêmes fragments montre des orifices arrondis et alignés, entourés d'une zone plus résistante. Leur diamètre est irrégulier, mais supérieur à celui des tubules (Figure 6b). La différence entre les tubules et le tissu dentinaire intertubulaire généralement bien visible sur les cassures est réduite sur les fragments soumis à une attaque de 59 jours (Figure 6c). Dans ce plan de fracture, le relief de la surface est atténué, et en coupe perpendiculaire à la précédente, les tubules ne semblent pas modifiés (Figure 6d).

5 Attaque par la solution d'acide oxalique $H_2C_2O_4$ seul à 5*10^{-3} M

5.1 Évolution chimique

Cette attaque étant menée comme précédemment en milieu acide, le bilan réactionnel global associé est inchangé (*cf.* § 3.2). Mais $H_2C_2O_4$ est un diacide dont la première acidité ($pK_1 \simeq 1{,}3$) est beaucoup plus forte que celle de l'acide acétique ($pK \simeq 4{,}7$), tandis que la seconde est comparable ($pK_2 \simeq 4{,}3$). La solution d'attaque est donc nettement plus agressive que dans le cas précédent. De plus, dès que le Ca de l'hydroxyapatite attaquée passe en solution, la forme libre Ca^{2+} réagit en présence de l'ion oxalate $C_2O_4{}^{2-}$ pour former l'oxalate de calcium monohydrate $Ca(C_2O_4)H_2O$, sel très peu soluble qui précipite instantanément suivant :

$$Ca^{2+} + C_2O_4{}^{2-} + H_2O \rightarrow Ca(C_2O_4)\ H_2O \downarrow$$

C'est donc une contrainte supplémentaire imposée à l'attaque acide de l'hydroxyapatite.

Dans ces nouvelles conditions, et après 8 jours environ :

- le calcium total se stabilise à environ 3 mg/l soit environ 7,5*10^{-5} M ;
- les phosphates, toujours en équivalent $PO_4{}^{3-}$, s'accumulent continûment avec quelques fluctuations ;
- le pH se stabilise à environ 2,75.

La validation du bilan réactionnel global proposé dans le cas précédent (acide acétique) impose donc, dans ces nouvelles conditions, une évaluation du produit ionique Q des espèces chimiques libres en solution Ca^{2+} et $C_2O_4{}^{2-}$, afin de le comparer au produit de solubilité théorique K_s de l'oxalate $Ca(C_2O_4)H_2O$, les approximations précédemment admises (solides purs, solution diluée...) étant bien entendu conservées.

(a) De la valeur expérimentale du calcium total en solution, la stoechiométrie (c'est à dire la proportion des éléments dans une formule chimique) du bilan réactionnel global permet de tirer la concentration minimale du Ca^{2+} libre, qui est la forme dominante soit :

$$[Ca^{2+}| \simeq (3{,}5/5) * 7{,}5.10^{-5} \simeq 5{,}25*10^{-5}\ M$$

Par ailleurs, le pH mesuré (environ 2,75) et les constantes respectives pK_1 et pK_2 des deux acidités de l'acide oxalique permettent de déduire la concentration de l'espèce $C_2O_4{}^{2-}$ à l'équilibre de dissociation au tout début de la précipitation de l'oxalate $Ca(C_2O_4)H_2O$. Les équilibres concernés sont alors [29] :

$$H_2C_2O_4 \rightleftharpoons HC_2O_4{}^- + H^+ \qquad pK_1 \simeq 1{,}3$$
$$HC_2O_4{}^- \rightleftharpoons C_2O_4{}^{2-} + H^+ \qquad pK_2 \simeq 4{,}3$$

Avec, au début de la précipitation :

$$|H_2C_2O_4| + [HC_2O_4^-] + [C_2O_4^{2-}| = 5*10^{-3} \text{ M}$$

Pour $|H^+| \simeq 10^{-2,75}$, le calcul par substitution dans les expressions respectives des LAM associées aux deux acidités de $H_2C_2O_4$ donne alors :

$$|C_2O_4^{2-}| \simeq 1,35*10^{-4} \text{ M}$$

Le produit ionique Q des espèces chimiques concernées dans la solution diluée ($|H_2O| = 1$) s'écrit donc en concentrations :

$$Q = |Ca^{2+}| * |C_2O_4^{2-}| \simeq 5,25*10^{-5} * 1,35*10^{-4} \simeq 10^{-8,15}$$

(b) L'équilibre de saturation de l'oxalate $Ca(C_2O_4)H_2O$ s'exprime par le bilan :

$$Ca(C_2O_4)H_2O \rightleftharpoons Ca^{2+} + C_2O_4^{2-} + H_2O$$

Et la constante thermodynamique de la LAM associée à cet équilibre théorique est par définition le produit de solubilité K_s de ce sel, soit dans les conditions standard de pression et de température [33] :

$$K_s \simeq 10^{-8,60}$$

Ainsi, dans la limite des approximations précédemment admises, il existe bien une sursaturation modérée dès le début de la précipitation de l'oxalate, puisque $Q > K_s$. Cette précipitation se poursuit tant que la quantité d'acide $H_2C_2O_4$ en solution est suffisante. Le palier observé en calcium total est donc un palier « dynamique » en ce sens que tout le calcium libéré par l'attaque acide est continûment éliminé de la solution sous forme d'oxalate insoluble : ce n'est donc pas un équilibre. Corrélativement en effet, le complexe neutre $Ca(H_2PO_4)_2$ demeure limité en solution à $2,25*10^{-5}$ M suivant la stoechiométrie du bilan réactionnel global, car il est instable en présence de l'ion $C_2O_4^{2-}$ et se décompose pour également former l'oxalate insoluble, suivant :

$$Ca(H_2PO_4)_2 + C_2O_4^{2-} + H_2O \rightarrow Ca(C_2O_4)H_2O_{\downarrow} + 2H_2PO_4^-$$

Les ions phosphates s'accumulent donc en solution au fur et à mesure que l'attaque se poursuit.

5.2 Altérations microstructurales

Les surfaces polies de l'émail montrent des zones de dissolution plus ou moins remplies de cristallisations secondaires. Entre ces zones, la structure prismatique est visible (Figure 7a). Les processus cellulaires des tubules de la dentine sont partiellement détachés de la partie minérale (Figure 7b). La dentine des fragments non polis a des tubules légèrement agrandis, et remplis de cristallisations secondaires (Figure 7c). Des

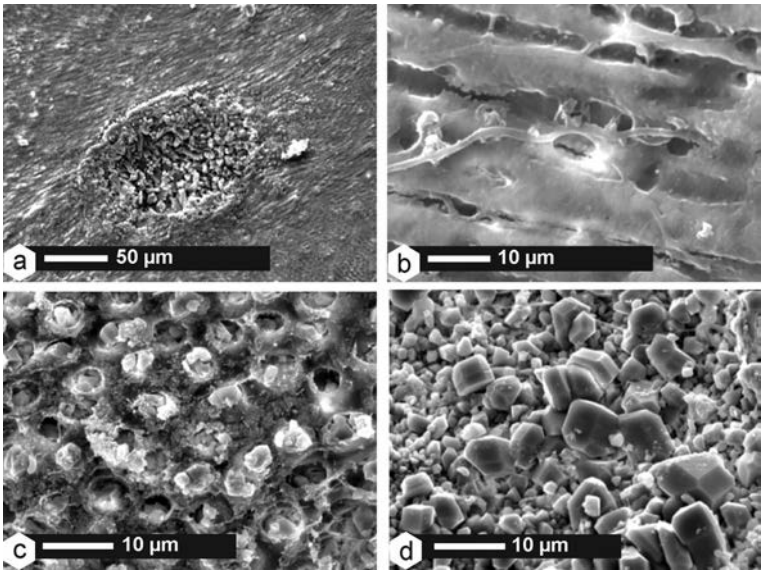


FIGURE 7 – Altérations dues à l'acide oxalique. (a) l'émail est creusé par l'attaque acide (24 heures) et des cristaux d'oxalate comblent partiellement les trous de la surface polie ; (b) les processus cellulaires des tubules de la dentine sont mis en évidence par l'attaque acide (24 heures) d'une surface polie ; (c) surface altérée d'un fragment de dentine par une attaque de 59 jours ; (d) cristaux d'oxalate formés pendant cette attaque acide.

cristaux similaires, mais plus grands, sont irrégulièrement répartis sur la surface du fragment (Figure 7d).

Du point de vue microstructural, l'attaque par l'acide oxalique provoque des dissolutions de l'émail plus forte que l'acide acétique, ce dernier tendant plutôt à lisser le relief. En outre, on n'observe pas de cristaux secondaires avec l'acide acétique.

6 Attaque par le mélange équimolaire acide oxalique – acide acétique

6.1 Évolution chimique

La solution d'attaque est ici constituée par un mélange des deux acides précédents à $2{,}5*10^{-3}$ M en chacun d'eux, et le pH initial de la solution (environ 2,1) est imposé par la première acidité quasi forte de $H_2C_2O_4$ ($pK_1 \simeq 1{,}3$). Qualitativement, les résultats expérimentaux obtenus apparaissent très clairement comme étant la succession de deux étapes bien distinctes :

- La première étape est l'attaque de l'hydroxyapatite par l'acide oxalique $H_2C_2O_4$, avec précipitation corrélative de l'oxalate $Ca(C_2O_4)H_2O$ comme observé précédemment. Cette première étape dure un peu plus de 50 jours et prend fin lorsque tout l'acide oxalique a été consommé par la précipitation de l'oxalate. La quantité initiale d'hydroxyapatite attaquée étant toujours voisine de $4*10^{-4}$ mole (environ 200 mg), les stoechiométries respectives des composés mis

en jeu et la quantité d'acide initialement disponible dans les 200 ml de solution à $2{,}5*10^{-3}$M en $H_2C_2O_4$ (environ $0{,}5*10^{-3}$ mole) permettent de déduire qu'il s'est formé environ $5*10^{-4}$ mole d'oxalate $Ca(C_2O_4)H_2O$. Cette première étape a donc fait disparaitre très sensiblement $1*10^{-4}$ mole d'hydroxyapatite $Ca_5(PO_4)_3OH$. Il subsiste donc à la fin de cette étape environ $3*10^{-4}$ mole d'hydroxyapatite au contact de la solution résiduelle acétique à $2{,}5*10^{-3}$ M.

- La seconde étape débute alors avec l'attaque de l'hydroxyapatite restante par la solution acétique résiduelle. Cette seconde étape est essentiellement caractérisée par l'évolution rapide de la concentration en Ca qui atteint en quelques jours un palier très sensiblement comparable à celui observé lors de l'attaque par l'acide acétique seul (*cf.* 4.1)

6.2 Altérations microstructurales

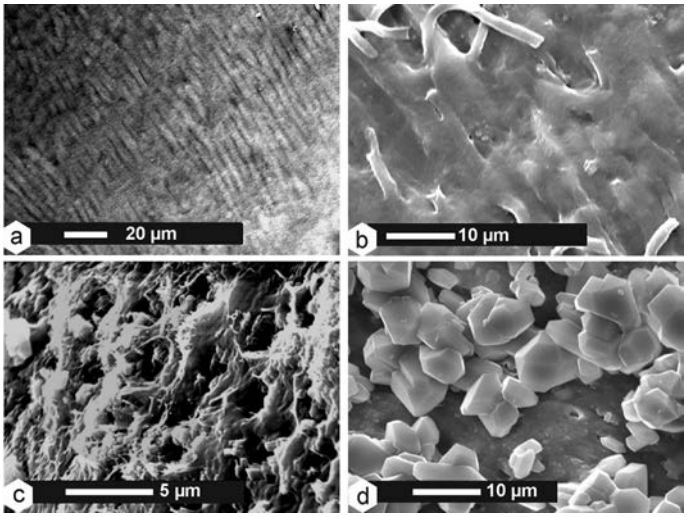


Figure 8 – Altérations dues au mélange équimolaire acides acétique et oxalique. (a) surface polie de l'émail avec la structure prismatique visible ; (b) surface de la dentine avec processus cellulaires intratubulaires visibles ; (c) surface des fragments de la dentine avec tubules agrandis ; (d) cristaux secondaires sur la surface des fragments de dentine.

Les surfaces polies traitées par le mélange des acides acétique et oxalique ont un aspect proche de celui des surfaces attaquées par l'acide oxalique seul (Figure 8a-b). La structure prismatique de l'émail est visible, et les processus cellulaires des tubules de la dentine se détachent partiellement. Le tissu dentinaire lui-même est très lisse. Les tubules de la dentine des fragments sont agrandis, et partiellement remplis de cristaux secondaires (Figure 8c). Des cristaux similaires, mais plus développés, recouvrent partiellement la surface (Figure 8d).

Les deux acides ont des actions différentes : pour les aspects chimique et microstructural, l'acide oxalique est plus agressif que l'acide acétique. Les cristaux secondaires (oxalate) sont tout à fait similaires à ceux décrits dans le cas de contaminations par des champignons [17].

7 Attaque par les extraits solubles du sol forestier

7.1 Évolution chimique

L'évolution du pH dans la solution d'incubation composée des extraits solubles dans l'eau de la fraction du sol est complexe (Figure 7). Après une augmentation dans les dix premiers jours, atteignant un pH basique, on observe une diminution puis une stabilisation à une valeur moyenne de 6. Les teneurs en Ca et P libérés dans les solutions par l'attaque des dents ont un profil parallèle (Figure 9) : une nette augmentation se produit à partir de 28 jours, puis ralentit à la fin de l'expérience. Dans la solution extraite du sol, Ca Mg, Na, K et Al étaient présents en très faible quantité [30].

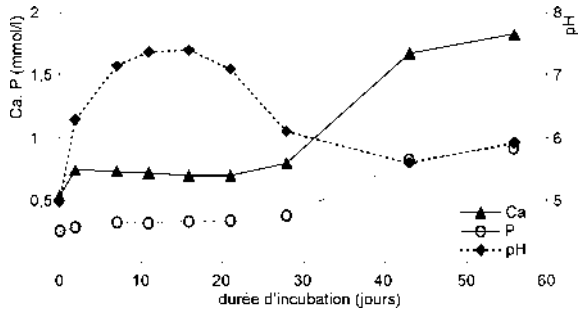


Figure 9 – Évolution du pH et des teneurs en Ca et P de la solution d'incubation extraite du sol [30].

La solution extraite du sol a une composition plus complexe que celles des solutions utilisées dans les expériences décrites ci-dessus. Outre les acides oxalique et acétique, elle contient probablement des acides organiques provenant de végétaux comme les acides formique, citrique, malique et tartarique [35], mais aussi de bactéries et de champignons. Une liste partielle de microorganismes et leur capacité à dissoudre les minéraux a été établie par Uroz *et al.* [36]. Divers sucres sont également présents. Mais la complexité des processus invoqués est loin d'être élucidée, notamment à cause de l'hétérogénéité physique et chimique des sols [37].

7.2 Aspects microstructuraux

Les fragments incubés dans les extraits solubles de sol montrent une différence de couleur entre l'émail et la dentine. En effet les extraits de sol, qui contiennent des acides fulvique et humique, sont colorés en brun. Si l'émail est resté inchangé, la dentine s'est colorée en brun. La plus grande abondance de matrice organique, associée à la présence de tubules qui favorisent la pénétration du liquide, jouent un rôle important dans cette coloration. La surface externe de l'émail ne semble guère affectée par l'attaque : elle ne montre pas de cavités de dissolution, et la couche externe est préservée (Figure 10a). Les fractures montrent des aspects variables. Dans certains fragments, la structure prismatique avec les changements d'orientation est visible (Figure 10b). Les tubules de la dentine peuvent être légèrement agrandis (Figure 10c). Parfois, émail et dentine deviennent similaires. Les cristallites composant les prismes d'émail ne sont

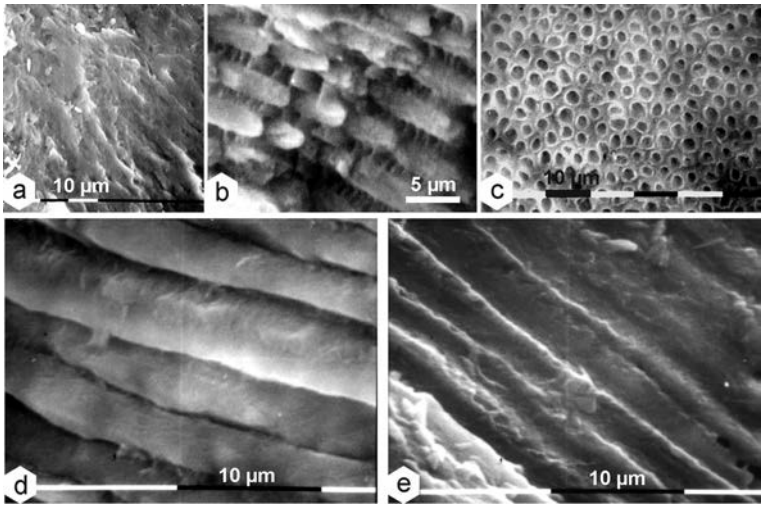


FIGURE 10 – Altérations des tissus dentaires incubés dans les extraits de sol forestier. (a) aspect de la surface externe de l'émail ; (b) fracture de l'émail montrant la structure prismatique ; (c) tubules agrandis de la dentine ; (d) prismes de l'émail ; (e) tubules et tissu intertubulaire de la dentine.

plus distincts et la surface est lissée (Figure 10d). La différence de relief entre les tubules et le tissu intertubulaire de la dentine peut être réduite par l'attaque (Figure 10e).

8 Comparaison avec des fossiles

Afin de préciser l'origine des altérations de microstructures chez les fossiles, des fragments de dents d'un Suidae : *Eurolistriodon tenarezensis* ont été observés au microscope électronique à balayage. Ces échantillons proviennent du Miocène moyen de la formation du Calcaire de Pellecahus (Gers) [38]. Trois types de préparations ont été examinés : des surfaces anciennes, des cassures fraiches, des cassures légèrement attaquées avec une solution d'HCl 1 % pendant 40 secondes afin d'éliminer les encroûtements sédimentaires. L'émail épais est facilement identifiable sur les fragments (Figure 11a). Sur les fragments bruts (c'est à dire les cassures anciennes simplement rincées à l'eau claire), les prismes d'émail sont localement visibles (Figure 11b). Des cassures fraiches montrent une structure similaire, mais sans sédiment (Figure 11c). Sur les cassures attaquées, non seulement les prismes sont clairement distincts, mais les cristallites allongés qui les composent sont dégagés (Figure 11d). Sur les cassures anciennes, les tubules de la dentine sont plus ou moins obturés par des dépôts sédimentaires. Soumis à une attaque acide, ils deviennent visibles (Figure 11e). Cependant, cette structure peut être modifiée par la diagenèse (Figure 11f).

Cette série de clichés permet d'attirer l'attention sur les biais pouvant être dus à la préparation des échantillons. La plupart du temps, les surfaces d'un échantillon, sans aucune préparation, sont peu lisibles, car plus ou moins encroûtées par des sédiments, ou bien très usées. Une simple cassure fraiche, nettoyée à l'eau, rend les structures plus

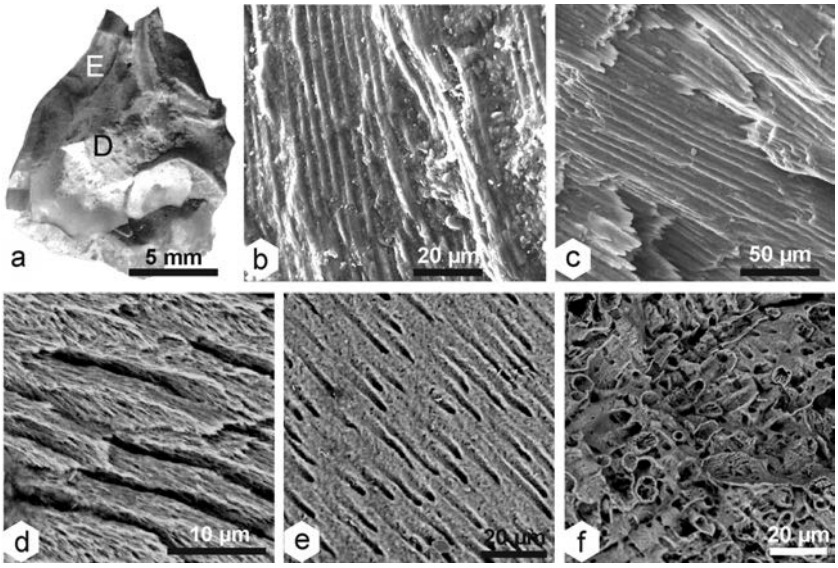


FIGURE 11 – Dents d'un Suidae fossile : *Eurolistriodon tennarezensis*. (a) fragment montrant l'émail épais (E) et la dentine (D) ; (b) aspect de l'émail sur une cassure ancienne ; (c) structure prismatique d'une cassure fraiche, dépourvue de sédiment ; (d) cassure de l'émail dont la structure interne est révélée par une légère attaque acide ; (e) aspect des tubules de la dentine après une légère attaque acide ; (f) dentine dont la structure est altérée.

facilement identifiables. Il en est de même avec une attaque par une solution acide fortement diluée. Il est en effet important de déterminer précisément la structure, et donc le type de tissu que l'on étudie. En effet, l'impact de la diagenèse n'est pas le même, pour un échantillon donné, pour tous les tissus (*cf.* chapitre 2) [39].

La difficulté d'identification de fragments bruts a été mise en évidence sur des échantillons du Paléolithique tardif d'Allemagne du Nord. Ces fragments ont été attribués tout d'abord à de l'ivoire (dentine), et soumis à une série d'analyses sophistiquées [40]. Une seconde étude utilisant notamment la tomographie, a montré que ces fragments étaient en réalité de l'os [41]. En fait, un simple « nettoyage » des échantillons et leur observation au MEB, ou bien une lame mince, aurait permis une identification correcte des tissus. En effet, la tomographie, très largement utilisée car dite non invasive, provoque des modifications dont la nature n'est pas encore clairement connue, même sur les biominéraux [42].

Un autre point important à souligner est l'échelle d'observation. Un échantillon dont la morphologie est bien conservée peut avoir une microstructure et une composition altérées. À l'inverse, un échantillon de forme non identifiable peut avoir subi des modifications structurales et chimiques minimes. La comparaison des structures à deux échelles différentes (microscope électronique à balayage et microscope à force atomique), a montré que l'émail des dents de *Kubanochoerus massai* (Miocène, Lybie) qui apparaissait bien conservé au MEB ne l'était pas lorsque le spécimen était observé à l'AFM [44].

9 Conclusion

Parmi les méthodes utilisées pour détecter et comprendre les altérations observées sur les spécimens fossiles, la simulation expérimentale, même très simplifiée, des processus naturels de la diagenèse demeure un problème très complexe. En effet, si elle permet d'isoler et d'étudier un à un les facteurs contrôlant les modifications, le nombre de paramètres qui interfèrent est élevé, et leurs interactions restent encore peu connues. De plus, les caractéristiques d'un sol évoluent selon les saisons, la pluviométrie et la température modifiant les activités des végétaux, des champignons, des bactéries, etc. Les saisons ont également un effet sur les organismes de plus grande taille : les animaux fouisseurs, ceux qui hibernent par exemple, n'ont pas les mêmes activités, et le « *trampling* » (piétinement) dû aux déplacements (action mécanique) n'a pas la même intensité.

Cependant, ces expériences *in vitro* fournissent deux catégories d'informations : l'évolution chimique des échantillons et les modifications de leurs structures. Associées à une comparaison des structures des échantillons fossiles et à l'étude du sédiment encaissant, elles permettent de préciser les mécanismes principalement responsables de la diagenèse sur un type d'échantillons donné dans un milieu géologique donné.

Références

[1] P.R. Patel, W.E. Brown, Thermodynamic solubility product of human tooth enamel : powdered sample. Journal of Dental Research 34, 728-736, 1975.

[2] E.P. Paschalis, J. Tan, G.H. Nancollas, Constant composition dissolution kinetics studies of human dentin. Journal of Dental Research 75, 1019-1026, 1996.

[3] R.P. Shellis, A scanning electron-microscopic study of solubility variations in human enamel and dentine. Archives of Oral Biology 41, 473-484, 1996.

[4] H.C. Margolis, Y.P. Zhang, C.Y. Lee, R.L. Kent Jr., E.C. Moreno, Kinetics of enamel demineralization *in vitro*. Journal of Dental Research 78, 1326-1335, 1999.

[5] F. El Feninat, T.H. Ellis, I. Stangel, A tapping mode AFM study of collapse and denaturation in dentinal collagen. Dental Materials 17, 284-288, 2001.

[6] L. Breschi, P. Gobbi, G. Mazzoti, M. Falconi, T.H. Ellis, I. Stangel, High resolution SEM evaluation of dentin etched with maleic and citric acid. Dental Materials 18, 26-35, 2002.

[7] C. Hannig, A. Hamkens, K. Becker, R. Attin, T. Attin, Erosive effects of different acids on bovine enamel : release of calcium and phosphate *in vitro*. Archives of Oral Biology 50, 541-552, 2005.

[8] J.A. Aguilar-Mendoza, J.I. Rosales-Leal, M.A. Rodriguez-Vlaverde, M.A. Cabrerizo-Vilchez, Effect of acid etching on dentin wettability and roughness : self-etching primers *versus* phosphoric acid. Journal of Biomedical Materials Research, Part B, Applied Biomaterials, 84B (1), 277-285, 2007.

[9] R.P. Sanches, C. Otani, A.J. Damiao, W. Miyakawa, AFM characterization of bovine enamel and dentine after acid-etching. Micron 40, 502-506, 2009.

[10] R. Shahack-Gross, O. Bar-Yosef, S. Weiner, Black-coloured bones in Hayonim Cave, Israel : differentiating between burning and oxide staining. Journal of Archaeological Science 24, 439-446, 1997.

[11] F. Le Mort, A. Erim-Özdogan, M. Özbek, Y. Yilmaz, Y., Feu et archéoanthropologie au Proche-Orient (Epipaléolithique et Néolithique). Le lien avec les pratiques funéraires. Données nouvelles de Çayönü. Paléorient 26, 37-50, 2000.

[12] V. Michel, H. Bocherens, I. Théry-Parisot, K. Valoch, P. Valensi. Coloring and preservation state of faunal remains from the Neanderthal levels of Kulna Cave, Czech Republic. Geoarchaeology 21, 479-501, 2006.

[13] M. Harbeck, G. Grupe, Experimental chemical degradation compared to natural diagenetic alteration of collagen : implications for collagen quality indicators for stable isotope analysis. Archaeological and Anthropological Sciences 1, 43-57, 2009.

[14] A. Rosling, K.B. Suttle, E. Johnasson, P.A.W. Van Hees, J.F. Banfield, Phosphorous availability influences the dissolution of apatite by soil fungi. Geobiology 5, 265-280, 2007.

[15] G.M. Gadd, Fungi in biogeochemical cycles, Cambridge University Press, 2006, 469 pp.

[16] M.M. Smits, S. Bonneville, L.G. Benning, S.A. Banwart, J.R. Leake, Plant-driven weathering of apatite - the role of an ectomycorrhizal fungus. Geobiology 10, 445-456, 2013.

[17] F. Pinzari, J. Tate, M. Vicchieri, J. Joon Rhee, G.M. Gadd, Biodegradation of ivory (natural apatite) : possible involvement of fungal activity in biodeterioration of the Lewis Chessmen. Environmental Microbiology doi :10.1111/1462-2920.12027, 2012.

[18] G. Turner-Walker, The chemical and microbial degradation of bones and teeth. In Advances in human palaeopathology, R. Pinhasi & S. Mays eds, John Wiley, Chichester 2008, pp. 3-30.

[19] P. Henderson, C.A. Marlow, T.I. Molleson, C.T. Williams C. T., Patterns of chemical change during bone fossilization. Nature 306, 358–360, 1983.

[20] C.T. Williams, P. Henderson, C.A. Marlow, T.I. Molleson, The environment of deposition indicated by the distribution of rare earth elements in fossil bones from Olduvai Gorge, Tanzania. Applied Geochemistry12, 537-547, 1997.

[21] E. Hinz, M.J. Kohn, The effect of tissue structure ans soil chemistry on trace element uptake in fossils. Geochimica and Cosmochimica Acta, 74, 3213-3231, 2010.

[22] A.X. Apostolopoulos, M.G. Buonocore, Comparative dissolution rates of enamel, dentin and bone. I. Effect of the organic matter. Journal of Dental Research 45, 1093-1100, 1966.

[23] N. Nakabayashi, A. Watanabe, K. Igarashi, K., AFM observation of collapse and expansion of phosphoric acid-demineralized dentin. Journal of Biomedical Materials Research A68, 558-565, 2004.

[24] F. Berna, A. Matthews, S. Weiner, Solubilities of bone mineral from archaeological sites : the recrystallization window. Journal of Archaeological Science 31, 867-882, 2004.

[25] L.J. Wang, R. Tang, T. Bonstein, P. Bush, G.H. Nancollas, Enamel demineralization in primary and permanent teeth. Journal of Dental Research, 85, 359-363, 2006.

[26] L. Wang, G.H. Nancollas, Calcium orthophosphates : crystallization and dissolution. Chemical Reviews 108, 4628-4669, 2008.

[27] M.M. Murray, The chemical composition of teeth. The calcium, magnesium and phosphorus contents of the teeth of different animals. A brief consideration of the mechanism of calcification. Biochemical Journal 30, 1567-1571, 1936.

[28] Y. Dauphin, P. Massard, C. Quantin, S. Montuelle, Experimental *in vitro* dissolution of the dentine of teeth of Sus scrofa (Mammalia, Suidae) : chemistry and microstructural alterations. Archaeometry 55, 134-147, 2012.

[29] G. Charlot, Les méthodes de la chimie analytique - Analyse quantitative minérale. 5 ème éd. Masson, Paris, 1966.

[30] Y. Dauphin, P. Massard, C. Quantin, *In vitro* diagenesis of teeth of Sus scrofa (Mammalia, Suidae) : Micro- and nanostructural alterations and experimental dissolution. Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology 134-141, 2008.

[31] P. Massard, M. Steinberg, M. Treuil, Géochimie : principes et méthodes. Tome 1 Approche thermodynamique, Doin, Paris, 275 pages, 1978.

[32] H.L. Bohn, B.L. McNeal, G.A. O'Connor, Soil chemistry, 2è édition, J. Wiley & Sons, New York, 341 pages, 1985.

[33] R. Weast, CRC Handbook of chemistry and physics, 68è édition, CRC Press, 2416 pages, 1987.

[34] R.A. Robie, B.S. Hemingway, J.T. Fisher, Thermodynamics properties of minerals and related substances at 298,15 K and 1 bar (10^5 pascals) pressure and higher temperatures. Geological Survey Bulletin, 1452, 464 pages, 1979.

[35] R. Baziramakenga, R.R. Simard, G.D. Leroux, Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. Soil Biology and Biochemistry 27, 3, 349-356, 1995.

[36] S. Uroz, C. Calvaruso, M.P. Turpault, P. Frey-Klett, Mineral weathering by bacteria : ecology, actors and mechanisms. Trends in Microbiology 17, 8, 378-387, 2009.

[37] D.L. Jones, P.G. Dennis, A.G. Owen, P.A.W. van Hees, Organic acid behavior in soils - misconceptions and knowledge gaps. Plant and Soil 248, 31-41, 2003.

[38] M.J. Orliac, *Eurolistriodon tenarezensis*, *sp. nov.*, from Montréal-du-Gers (France) : implications for the systematics of the european Listriodontiniae (Suidae, Mammalia). Journal of vertebrate Paleontology 26, 967-980.

[39] G. Brugmann, J. Krause, T.C. Brachert, O. Kullmer, F. Schrenk, I. Ssemmanda, D.F. Mertz, Chemical composition of modern and fossil Hippopotamid teeth and implications for paleoenvironmental reconstructions and enamel formation - Part 1 : Major and minor element variation. Biogeosciences 9, 119-139, 2012.

[40] B. Gramsch, J. Beran, S. Hanik, R.S. Sommer, A Palaeolithic fishhook made of ivory and the earliest fishhook tradition in Europe. Journal of Archaeological Science 40, 2458-2463, 2013.

[41] J.F. Tolksdorf, S. Veil, I. Kuzu, B. Ligouis, U. Staesche, K. Breest, Ivory or bone ? A report on practical experience determining material from the Mesolithic site Klein Breese (Northern Germany). Archaeological and Anthropological Sciences, DOI 10.1007/s12520-014-0197-0, 2014.

[42] G.D. Richards, R.S. Jabbour, C.F. Horton, C.L. Obarra, A.A. MacDowell, Color changes in modern and fossil teeth induced by synchrotron microtomography. American Journal of Physical Anthropology 149, 172-180, 2012.

[43] J.M. Holton, A beginner's guide to radiation damage. Journal of Synchrotron Radiation 16, 133-142, 2009.

[44] Y. Dauphin, S. Montuelle, C. Quantin, P. Massard, Estimating the preservation of tooth structures : towards a new scale of observation. Journal of Taphonomy 5, 43-56, 2007.