



HAL
open science

Fossilisation des apatites biologiques : approche cristallographique et applications géochimiques

Julie Aufort

► **To cite this version:**

Julie Aufort. Fossilisation des apatites biologiques : approche cristallographique et applications géochimiques. Paléontologie. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS484 . tel-02611818

HAL Id: tel-02611818

<https://theses.hal.science/tel-02611818v1>

Submitted on 18 May 2020

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

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

Thèse de Doctorat

Sorbonne Université

Ecole doctorale 397 – Physique et Chimie des Matériaux

Fossilisation des apatites biologiques : Approche cristallographique et applications géochimiques

Julie Aufort

Réalisée à l'Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie

Dirigée par Etienne Balan

Présentée et soutenue publiquement le 9 juillet 2018

Devant un jury composé de :

Pascale ROY	DR CNRS	Rapportrice
Christophe DROUET	DR CNRS	Rapporteur
Maguy JABER	Professeur Sorbonne Université	Examinatrice
Antoine ZAZZO	DR CNRS	Examineur
Etienne BALAN	Professeur Sorbonne Université	Directeur de thèse
Christel GERVAIS	Professeur Sorbonne Université	Invitée
Loïc SEGALEN	Professeur Sorbonne Université	Invité

Remerciements

Les années de doctorat constituent une expérience haute en couleurs, riche en émotions et source de satisfaction immense, et c'est avec le plus grand bonheur que je contemple ces trois années. Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse Etienne Balan de m'avoir débauchée à la fin de mon stage de master 2 et de m'avoir proposé ce fantastique sujet à l'interface entre de nombreuses disciplines, mêlant théorie et expérience, calculs *ab initio* et fouilles paléontologiques, au point qu'il fut tout simplement impossible de s'ennuyer au cours de ces trois années. Ce travail a été réalisé au sein de trois laboratoires, non seulement à l'IMPMC mais également à l'ISTEP et au LCMCP sous l'encadrement de Loïc Ségalen et de Christel Gervais respectivement. Je tiens à souligner la très grande complémentarité de mes trois encadrants, ainsi que leur disponibilité et réactivité. De façon générale j'ai bénéficié d'un encadrement sans faille de la part de mes trois encadrants, d'encouragements, de soutien et de retours positifs qui ont sans nul doute instauré un cercle vertueux de motivation, me permettant de tenir les échéances, parfois un peu folles d'Etienne, comme celle de soutenir quelques mois avant la fin de mon contrat...

Il est bien sûr important de mentionner le labex Matisse qui a financé ma thèse et m'a permis de bénéficier d'un environnement idéal, notamment grâce à l'accès aux différentes plateformes expérimentales et de calculs disponibles au sein de l'IMPMC, l'ISTEP et le LCMCP, pour mener à bien mes travaux. Je remercie également les membres du jury d'avoir accepté de relire et juger ce travail.

Bien que la rédaction du manuscrit soit un travail très solitaire, le doctorat, lui, est avant tout une affaire d'équipe et je tiens à remercier tous les collaborateurs impliqués dans les travaux présentés à travers ce manuscrit. A l'IMPMC, un grand merci à Christian Brouder pour son implication dans les aspects mathématiques de la modélisation des spectres ATR-FTIR, à Olivier Beyssac pour m'avoir montré puis fait confiance avec le spectromètre Raman, à Lorenzo Paulatto pour son aide sur Quantum Espresso, à Marc Blanchard pour son implication dans les calculs de fractionnement isotopique et à Benoît Baptiste pour son aide avec le Rietvelt. A l'ISTEP, je remercie Nathalie Labourdette pour toute son aide apportée avec les mesures isotopiques et les analyses chimiques, toujours dans une ambiance de travail très sympathique. Au LCMCP, un grand merci à Cristina Coelho pour son aide au spectromètre et de façon générale à toute l'équipe SMILES dont j'ai découvert la richesse scientifique grâce à ses séminaires.

Au-delà de mes trois laboratoires d'accueil, l'IMPMC, l'ISTEP et le LCMCP, plusieurs collaborations ont également été nouées avec le CR2P, le HNHP ainsi que le LGL.

Je suis extrêmement reconnaissante envers Dominique Gommery du CR2P de m'avoir invitée à participer à une mission en Afrique du Sud en octobre 2016, qui s'est avérée une expérience scientifique et humaine inoubliable et m'a permis d'obtenir la majorité du matériel fossile étudié dans ce travail. Cette mission a pour moi été une opportunité incroyable : ne venant pas d'un cursus de géosciences cela a consisté en ma toute première expérience de terrain et j'ai pu ainsi découvrir tout le processus des fouilles paléontologiques. Sur le plan scientifique j'ai appris beaucoup sur le contexte géologique et les enjeux paléontologiques de mon travail, et des mots de géologues tels que brèche et karst ont enfin pris tout leur sens ! Plongée deux semaines dans la peau des paléontologues, dans le cadre exceptionnel qu'est celui du berceau de l'Humanité, j'ai pu découvrir le monde fou et passionnant de la paléontologie humaine. A mon sens, cela a rajouté une dimension supplémentaire à mon travail de thèse aussi bien en termes de motivation que de compréhension du sujet. Enfin, s'agissant de mes premiers pas en Afrique on peut parler d'une véritable aventure humaine, et nul doute que je trouverai un moyen de retourner dans ce fantastique pays. Bien sûr un grand merci aux membres du Ditsong Museum de Pretoria et tout particulièrement à Nony et Lazarus, ainsi qu'aux camarades de fouille, Franck et Brian.

La diagenèse de l'os étant autant une affaire de paléontologie que d'archéologie, je remercie également Matthieu Lebon et Xavier Gallet du HNHP au HNHP, pour les échantillons d'os archéologiques qui nous ont permis d'évaluer l'effet de la matrice collagénique sur les signatures ATR-FTIR des bandes structurales des phosphates de l'apatite.

Un grand merci également à Christophe Lécuyer et Romain Amiot qui m'ont accueillie au Laboratoire de Géologie de Lyon, le temps de quelques mesures de la composition isotopique des phosphates de l'apatite, qui se sont avérées indispensables pour nos conclusions sur les expériences d'alération d'os actuel en conditions contrôlées.

Sur le plan scientifique aussi bien qu'humain je remercie ma « seconde famille » qu'a été l'équipe de Minéralogie Environnementale au sein de l'IMPMC. Mes compagnons du quotidien, mes cobureaux, Lucie, avec qui j'ai fait mes premiers pas au labo en stage de Master 2, Maximilien et ses sujets de discussions toujours plus fous et Pauline qui m'a particulièrement soutenue, supportée et écoutée pendant ma période de rédaction. Merci à Manoj mon collègue isotopiste, à Maya et Jessica pour les pauses thés et à Sylvain le convoyeur de champagne.

Il m'est important de souligner la disponibilité de tous les chercheurs de l'IMPMC avec qui j'ai pu discuter, aussi bien dans l'équipe que dans le reste du laboratoire, notamment Guillaume Morin, Thierry Allard, George Ona, Karim Benzerara, George Calas, François Guyot, Fabio Pietrucci, Paola Giura, Agnès Elmaleh, Amélie Juhin et tant d'autres.

Il me tient à cœur de saluer les différentes générations de doctorants que j'ai pu côtoyer, aussi bien les anciens dont Flo, Henri, Clémence, Aisha, Sara... que la relève avec Jaysen, Laura, Silvia, Francesca, Léon, Amrita... et bien sûr tous ceux qui ont fait le chemin en même temps que moi : Maud, Natan, Pauline, Eric, Ornella, Edoardo...

Je suis donc fière de pouvoir compter parmi mes amis nombre de ces doctorants mais également de nombreux collègues : Mélanie, Hortense, Yoann, Fériel, Johan, Guillaume (et une mention spéciale au Maï Taiï dans les derniers instants de la rédaction de thèse) ...

Je tiens également à saluer quelques personnes qui ont été de véritables jalons dans mon parcours : mes maîtres de stage Nathalie Capron avec qui j'ai découvert la DFT, Gilles Wallez avec qui j'ai fait mes premiers pas dans le patrimoine, et Ekhard Salje pour ma véritable bascule dans le monde de la minéralogie.

Sortir de cet univers fou de la thèse et s'échapper dans le monde réel est bien sûr indispensable et pour cela je remercie mes amis « en dehors du labo », notamment Laurène et Louise (Docteure en houmous) et tout particulièrement mes punkettes, Nastassia et Bettina, que je cotoie depuis si longtemps.

Ce travail de thèse constitue l'achèvement de vingt-cinq années d'études, je tiens donc à remercier ma tante pour son soutien infaillible depuis le tout début.

Mille mercis à mon père, l'instigateur de ma toute première collection de minéraux, celui qui m'a emmenée dans les conférences les plus obscures du Muséum d'Histoire Naturelle et qui a fait naître en moi cette curiosité pour les merveilles de notre univers. Enfin, rien de ceci n'aurait été possible sans les valeurs de travail, d'effort et de persévérance inculquées par ma mère, à qui je dois tout.

Sommaire

Introduction Générale	1
Partie I : Généralités et Méthodes	5
Chapitre 1 : Fossilisation des apatites biologiques	7
1.1 Structure des apatites et impuretés moléculaires : unité et diversité des apatites.....	7
1.2 Structure des bioapatites actuelles : émail dentaire et tissus osseux	11
1.2.1 L'os	12
1.2.2 La dentine	15
1.2.3 L'émail.....	16
1.3 Apports de la géochimie isotopique des tissus biominéralisés fossiles à la reconstitution des environnements et climats passés	17
1.3.1 Géochimie isotopique : quelques définitions.....	17
1.3.2 Acquisition du signal isotopique par les tissus biominéralisés	18
1.3.2.1 Fractionnement isotopique du carbone entre les tissus biominéralisés et l'alimentation	18
1.3.2.2 Fractionnement isotopique de l'oxygène entre l'apatite et l'eau de boisson	20
1.3.3 Reconstitutions des climats et environnements passés	22
1.4 Altération diagénétique des tissus biominéralisés : entre conservation et évolution post-mortem.....	24
1.4.1 Processus impliqués dans la diagénèse des tissus biominéralisés	24
1.4.2 La diagénèse, une fatalité ? Comment évaluer son impact ?.....	27
1.4.3 Questions ouvertes et enjeux	29
Chapitre 2 : Méthodes	31
2.1 Spectroscopie infrarouge	31
2.1.1 Généralités	32
2.1.2 Mouvement de particules dans un réseau	33
2.1.3 Interaction rayonnement infrarouge – cristal.....	37
2.1.4 Réflectance Totale Atténuée.....	38
2.1.5 Dispositif expérimental.....	40
2.2 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	43
2.2.1 Principe et interactions.....	43
2.2.2 Rotation à l'angle magique	46
2.2.3 Polarisation croisée	47
2.2.4 Noyaux quadripolaires et MQ-MAS.....	48
2.3 Modélisation des propriétés de fractionnement isotopique	50
2.3.1 Théorie du fractionnement isotopique à l'équilibre.....	50
2.3.2 Calcul des propriétés vibrationnelles harmoniques d'un minéral par méthodes <i>ab initio</i>	53

2.3.3 Implémentation pratique	58
Partie II : Approches théoriques	61
Chapitre 3 : Calcul <i>ab initio</i> des propriétés de fractionnement isotopique de l'apatite	63
3.1 Résumé de l'étude	63
3.2 Introduction	66
3.3 Methods	68
3.3.1 Equilibrium isotopic fractionation factors	68
3.3.2 Modelling approach and density-functional calculations	69
3.4 Results	71
3.4.1 Oxygen $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ equilibrium fractionation properties	71
3.4.2 Carbon $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ equilibrium fractionation properties	74
3.4.3 Calcium $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ equilibrium fractionation properties	75
3.5 Discussion	77
3.5.1 Equilibrium isotopic fractionation of oxygen $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	77
3.5.1.1 Carbon dioxide/liquid water oxygen isotope fractionation	77
3.5.1.2 Mineral/liquid water oxygen isotope fractionation: calcite and structural phosphate in apatite	77
3.5.1.3 Oxygen isotope fractionation between structural carbonate in apatite and liquid water	79
3.5.1.4 Hydroxyapatite oxygen internal fractionation	80
3.5.1.5 Oxygen isotope fractionation between structural carbonates and phosphates in apatite	81
3.5.2 Equilibrium isotopic fractionation of carbon $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	82
3.5.3 Equilibrium isotopic fractionation of calcium $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$	84
3.6 Conclusion	86
Chapitre 4 : Modélisations des spectres ATR-FTIR	91
4.1 Modélisation du spectre ATR-FTIR de l'apatite	92
4.1.1 Résumé de l'étude	92
4.1.2 Introduction	93
4.1.3 Samples and methods	95
4.1.4 Modelling strategy	96
4.1.5 Results	99
4.1.5.1 Comparative properties of the MG and Bruggeman effective models	99
4.1.5.2 Experimental ATR spectra of apatite	101
4.1.5.3 Theoretical ATR-FTIR spectra of apatite	104
4.1.6 Concluding remarks	106
4.2 Effets électrostatiques macroscopiques dans les spectres ATR-FTIR d'os modernes et archéologiques	110
4.2.1 Résumé de l'étude	110

4.2.2 Introduction.....	112
4.3.3 Materials and methods	113
4.2.4 Results and discussion	115
4.2.5 Implications	119
Partie III : Applications géochimiques	123
Chapitre 5 : Transformation des bioapatites au cours de la fossilisation	125
5.1 Résumé de l'étude	125
5.2 Introduction	127
5.3 Materials and Methods	129
5.3.1 Samples description and alteration conditions.....	129
5.3.2 Analytical techniques.....	129
5.4 Results	132
5.4.1 Chemical composition of bone samples	132
5.4.2 Oxygen and carbon isotopic compositions	132
5.4.3 X-ray diffraction	133
5.4.4 Vibrational spectroscopies.....	134
5.4.4.1 Structural order probed by phosphate absorption bands	135
5.4.4.1.1 ATR-FTIR spectrum of bone samples	135
5.4.4.1.2 Raman spectrum of bone samples.....	138
5.4.4.2 Environment of structural carbonate groups inferred from the ν_2 CO ₃ band in ATR-FTIR spectra.....	139
5.4.5 Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of bone samples	142
5.5 Discussion.....	147
5.5.1 Evidence of secondary apatite formation.....	147
5.5.2 Carbonate incorporation in secondary apatite	149
5.5.3 Comparison of infrared and Raman spectroscopy in the determination of apatite structural order.....	
5.5.4 Implications for fossilization processes	152
Chapitre 6 : Etude de la transformation d'os fossiles du Cradle of Humankind en Afrique du Sud	159
6.1 Contexte géologique et intérêt paléontologique du Cradle of Humankind	159
6.2 Caractéristiques du site de l'étude : l'aire fossilifère de Bolt's Farm.....	161
6.3 Introduction	164
6.4 Materials and Methods	166
6.4.1 Samples and fossilisation context.....	166
6.4.2 Analytical techniques.....	166
6.5 Results	168
6.5.1 Chemical composition of fossil bones	168
6.5.2 Infrared spectroscopic study of fossil bone samples	169

6.5.2.1 ATR-FTIR spectra of fossil samples	169
6.5.2.2 Atomic-scale order and sample micro-structure probed by ATR-FTIR phosphate bands.....	172
6.5.2.3 Environment of structural carbonate groups inferred from ν_2 CO ₃ bands	177
6.5.3 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	177
6.6 Discussion	179
6.6.1 Evidence of secondary carbonated apatite formation	179
6.6.2 Effect of the acetic acid treatment on fossil samples	181
6.6.3 Implications for palaeoenvironmental reconstructions	182
Conclusion générale et Perspectives	187
Bibliographie	191
Annexes	217
I. Bolt's Farm Caves System dans le Cradle of Humankind (Afrique du Sud) : un exemple d'approche multidisciplinaire dans l'étude des sites à primates fossiles	217
II. Propriétés infrarouge d'une calcite biogénique : coraux bambous abyssaux	243

Abréviations

ATR : Réflectance Totale Atténuée

BFCS : Bolt's Farm Cave System

CSA : Anisotropie de Déplacement Chimique

DFT : Théorie de la Fonctionnelle de la Densité

FTIR : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

GGA : Approximation du Gradient Généralisé

LDA : Approximation de la Densité Locale

MAS : Rotation à l'Angle Magique

PBE : Fonctionnelle Perdew, Burke, Ernzerhof de type GGA

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Introduction générale

Les apatites ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$; X= OH, F, Cl) sont des minéraux ubiquistes présents aussi bien en contextes géologiques en tant que source principale de phosphore sur Terre (Filippelli 2002), que comme constituant inorganique principal des squelettes de vertébrés (os et dents) et constituent donc la majorité de leur restes fossiles (Elliott 2002). Ces fossiles sont des témoins importants des conditions paléo-environnementales. Leur composition chimique et isotopique dépend en effet des paramètres physico-chimiques des milieux dans lesquels vivaient les faunes correspondantes (Koch 1998, Kohn et Cerling 2002).

Les reconstitutions des environnements anciens effectuées à partir de l'analyse de la composition chimique et isotopique des restes de vertébrés fossiles permettent de compléter les approches plus classiques de la paléontologie, reposant notamment sur l'anatomie comparée. Ainsi concernant l'évolution de l'Homme et l'apparition de la bipédie, l'émergence des premiers hominidés a longtemps été associée à un climat sec ou un environnement de type savane. Les reconstitutions basées sur l'analyse isotopique de restes de faunes associées aux découvertes récentes d'hominidés tels qu'*Orrorin tugenensis* (Senut et al. 2001), ont permis de confirmer les données paléontologiques indiquant que celle-ci s'est effectuée dans un milieu plus humide et diversifié que celui envisagé jusqu'à présent (e.g. Roche et al. 2013). Toutefois, la validité des informations paléoenvironnementales recelées par les restes de vertébrés fossiles dépend crucialement de la préservation de l'enregistrement géochimique biogénique au cours du processus de fossilisation.

Ces fragments de squelettes de vertébrés préservés sous forme de fossiles sont généralement constitués d'un matériau issu de la transformation plus ou moins avancée d'une phase nanoparticulaire d'origine biologique proche d'une hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) carbonatée, dont la compliance chimique est expliquée par la diversité des mécanismes de substitution cationique et anionique affectant les divers sites structuraux, vers une fluorapatite carbonatée moins soluble. Les caractéristiques cristallographiques de l'apatite biologique, telles que le mode d'insertion d'impuretés importantes (eau, carbonates) ou la microstructure des nanoparticules restent cependant débattues (Pasteris et al. 2014, Wang et al. 2013). L'exploitation de l'information géochimique recelée par les bio-apatites implique une origine du signal contemporaine des stades de développement de l'animal pour les éléments biocompatibles (alcalins, carbonates) ou d'une transformation post mortem précoce pour les autres (fluor, terres rares, uranium, thorium). Elle dépend donc de l'état de préservation de l'apatite au cours de processus diagénétiques ultérieurs. Au-delà des lacunes de notre connaissance de la structure du matériau biologique initial s'ajoutent donc les incertitudes relatives à sa transformation dans les environnements géologiques.

L'objectif de ce travail est double : il s'agit de comprendre d'une part comment s'effectue l'acquisition de l'information géochimique par le biais du fractionnement isotopique et de l'incorporation d'impuretés moléculaires tels que les carbonates ou le fluor et d'autre part comment s'effectue la préservation de cet enregistrement au cours de la fossilisation en déterminant les transformations engendrées au sein du matériau biologique à l'échelle atomique. Ceci nécessite donc de préciser les mécanismes d'altération impliqués dans la fossilisation des vertébrés, d'identifier les marqueurs cristallogénétiques de ces mécanismes et de déterminer leurs effets sur la composition chimique et isotopique du matériau biologique. Ces travaux combinent l'analyse minéralogique, chimique et spectroscopique d'échantillons fossiles et d'échantillons biologiques altérés en conditions contrôlées. L'interprétation des mesures réalisées est supportée par des modélisations à l'échelle atomique des propriétés de fractionnement isotopique ainsi que des propriétés spectroscopiques de l'apatite.

Ce manuscrit s'articule en six chapitres.

Le chapitre 1 présente l'enjeu de la préservation de la composition isotopique des fossiles de vertébrés pour les reconstitutions paléoenvironnementales basées sur l'utilisation des signatures isotopiques de restes de vertébrés fossiles. Les caractéristiques structurales des os et dents de vertébrés ainsi que la cristallogénétique de leur composante minérale, l'apatite, sont exposées ainsi que les modalités d'enregistrement des paramètres environnementaux à travers leurs propriétés de fractionnement isotopique. Enfin, une description des connaissances actuelles concernant les transformations diagénétiques se produisant dans le biominéral au cours de la fossilisation permet de souligner les verrous scientifiques qu'il reste à lever.

Le chapitre 2 présente en premier lieu les principes généraux ainsi que la mise en œuvre pratique des deux techniques expérimentales principales utilisées au cours de cette thèse, la spectroscopie infrarouge et la spectroscopie RMN. Dans un second temps, les aspects théoriques de la théorie du fractionnement isotopique à l'équilibre sont exposés et suivis d'une description des principes des codes de calculs permettant de calculer les facteurs de fractionnement isotopique théoriques.

Le chapitre 3 propose un traitement théorique des propriétés de fractionnement isotopique de l'apatite. L'effet de la présence d'impuretés moléculaires (substitution par du fluor ou des carbonates) sur les propriétés de fractionnement isotopique à l'équilibre de l'oxygène, du carbone et du calcium est évalué à partir de calculs *ab initio* des propriétés vibrationnelles des structures cristallines associées. Les résultats obtenus sont présentés à travers un article publié dans *Geochimica et Cosmochimica Acta*.

Le chapitre 4 détaille en premier lieu le processus de modélisation des spectres ATR-FTIR de l'apatite, précise l'importance de la prise en compte de la nature composite de l'échantillon à travers un modèle de milieu effectif et en délivre les implications en terme

d'interprétation des spectres à travers un second article paru dans *Physics and Chemistry of Minerals*. Dans une seconde partie, cette stratégie de modélisation est reprise et adaptée pour modéliser les spectres ATR-FTIR d'échantillons d'os modernes et archéologiques en tenant compte de la présence de la fraction organique collagénique et fait l'objet d'une lettre publiée dans *American Mineralogist*.

Le chapitre 5 aborde les mécanismes d'incorporation du fluor et de substitution du groupe carbonate dans la structure de l'apatite. A ce titre, ce chapitre propose l'étude des transformations cristallographiques à l'échelle atomique d'échantillons d'os actuels altérés dans des conditions contrôlées. Celle-ci repose sur une approche multi-analytique, centrée sur les spectroscopies infrarouge et RMN et dont les résultats sont présentés au travers d'un article soumis au journal *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*.

Le chapitre 6 est consacré à l'étude d'échantillons d'os fossiles de mammifères provenant de la région du « Berceau de l'Humanité » (Cradle of Humankind) en Afrique du Sud. Les transformations à l'échelle atomique sont comparées à celles observées dans d'autres contextes de fossilisation ainsi qu'aux résultats obtenus sur les os actuels altérés du Chapitre 5 et discutées à travers un manuscrit d'article en préparation.

Partie I

Généralités et Méthodes

Chapitre 1 : Fossilisation des apatites biologiques

Les apatites biologiques constituent la phase minérale majeure des os et dents de vertébrés. Elles sont couramment utilisées comme marqueurs de conditions paléo-environnementales à travers leur composition chimique et isotopique et comme objets de datation en préhistoire et en archéologie.


Ce chapitre propose dans un premier temps de définir l'apatite d'un point de vue chimique et structural puis de montrer la diversité des apatites biologiques constitutives des tissus biominéralisés, c'est-à-dire les os et dents de vertébrés. Ce faisant, nous allons voir qu'à la complexité de la structure et des propriétés des apatites biologiques s'ajoute celle des tissus biominéralisés, depuis l'échelle atomique jusqu'à l'échelle macroscopique des os et dents de vertébrés.

Nous montrerons ensuite comment les paramètres environnementaux sont enregistrés dans les tissus biominéralisés et comment les caractéristiques des différents tissus conditionnent ces enregistrements. Enfin, un état des connaissances actuelles sur les transformations subies par les tissus biominéralisés au cours de la fossilisation permettra de souligner les incertitudes relatives à ces processus.

1.1 Structure des apatites et impuretés moléculaires : unité et diversité des apatites

Le terme d'apatite recouvre une grande famille de composés de structure similaire mais pouvant faire preuve d'une grande variabilité de composition chimique. Au sens strict, il désigne trois minéraux de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{X})_2$: hydroxyapatite ($\text{X} = \text{OH}$), fluorapatite ($\text{X} = \text{F}$) et chlorapatite ($\text{X} = \text{Cl}$). L'apatite est le minéral le plus courant de la famille des phosphates et constitue la première source de phosphore sur Terre. Ainsi, la fluorapatite est un minéral accessoire ubiquiste présent dans de nombreuses roches sédimentaires, métamorphiques et magmatiques (Knudsen et Gunter, 2002 ; Spear et Pyle 2002 ; Piccoli et Candela 2002) et un constituant majeur des phosphorites (McConnell, 1973). L'hydroxyapatite carbonatée quant à elle, constitue la composante minérale principale des os et dents de vertébrés (Elliott, 2002). Fluoro- et hydroxy- apatites sont donc particulièrement abondantes et plus étudiées que la chlorapatite, plus rare et présente essentiellement dans les milieux pauvres en fluor.

La structure cristalline de l'apatite est représentée en Figure 1.1. Une maille d'apatite peut être décrite par les trois polyèdres de coordination suivants :

 **Tétraèdre PO_4** : Le phosphore dans l'apatite est lié à 4 atomes d'oxygène, formant des tétraèdres réguliers, invariants quel que soit le type d'anion OH^- , F^- ou Cl^- dans la structure.

- ✎ Polyèdre Ca1O_9 : Il existe deux coordinences possibles pour le calcium dans l'apatite. Parmi les 10 atomes de calcium de la maille, 4 d'entre eux, dits calcium en site 1, sont en coordinence 9. Ils se situent au centre d'un prisme trigonal, constitué uniquement des atomes d'oxygène impliqués dans les tétraèdres phosphatés.
- ✎ Polyèdre $\text{Ca2O}_6\text{X}$: Les six atomes de calcium restants, dits calcium en site 2, forment un hexagone régulier autour de l'anion X^- , un atome de calcium sur 2 étant décalé selon c de $z = 1/2$. A l'échelle du matériau ces hexagones constituent des « canaux » anioniques dirigés selon l'axe c , à l'intérieur desquels figurent les anions OH^- , F^- ou Cl^- . Les atomes de calcium en site 2 sont eux-mêmes en coordinence 7, liés à 6 atomes d'oxygène et à l'anion X^- .

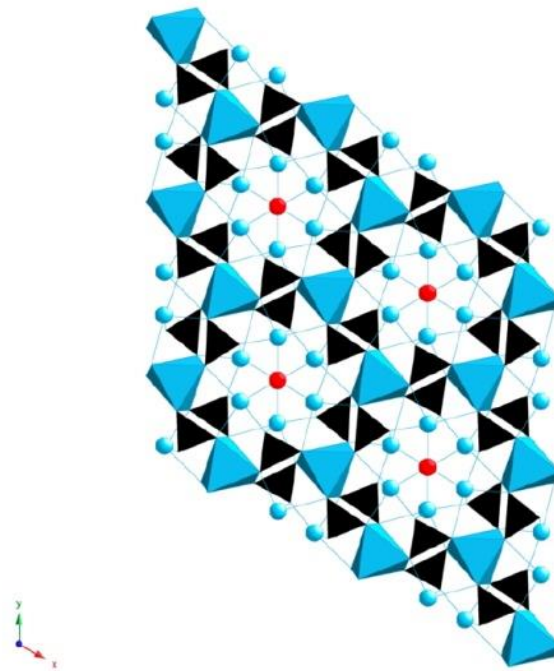


Figure 1.1 – Structure cristalline d'une apatite projetée selon le plan (001). Les atomes de calcium sont en bleu (le calcium en site 1 étant représenté par un polyèdre, le calcium en site 2 par une sphère), les tétraèdres phosphatés en noir, et les anions (OH^- , F^- , Cl^-) des canaux sont en rouge.

Au niveau structural les trois minéraux diffèrent essentiellement par la position des anions OH^- , F^- ou Cl^- au sein des canaux anioniques $(0,0,z)$. Ainsi l'arrangement atomique idéal correspond à celui de la fluorapatite, qui cristallise dans le groupe d'espace $\text{P6}_3/\text{m}$ et où l'atome de fluor est situé au centre du triangle formé par les atomes de Ca en site 2. En revanche, celui-ci est trop rigide pour accommoder les anions OH^- et Cl^- de plus grande taille qui se retrouvent donc décalés selon l'axe z , ceci se traduisant par un abaissement de la symétrie vers le groupe d'espace $\text{P2}_1/\text{b}$ dans le cas des hydroxy- et chloro- apatites (Table 1.1) et par un taux d'occupation de 1/2 des ions OH^- et Cl^- .

Table 1.1 – Groupe d'espace, position de l'anion X et paramètres de maille des trois minéraux constitutifs de la famille des apatites (Hughes et al. 1989)

	Groupe d'espace	Position de l'anion X	Paramètres de maille (Å)	
			<i>a, b</i>	<i>c</i>
Fluorapatite	P6 ₃ /m	0,0,1/4	9.397	6.878
Hydroxyapatite	P2 ₁ /b	0,0,0.1979	9.417	6.875
Chlorapatite	P2 ₁ /b	0,0,0.4323	9.598	6.776

La structure cristalline de l'apatite présentée ci-dessus est particulièrement tolérante aux distorsions et est connue pour pouvoir accommoder plus de la moitié du tableau périodique (Pan et Fleet, 2002). Ainsi de nombreux cations aussi bien divalents (Sr, Pb, Ba, Mn, Mg, Fe, Zn, Ni, Cd...) que monovalents (Na, K, Li...), trivalents (terres rares, Y) ou encore tétravalents (Th, U) peuvent se substituer aux ions calcium, en présentant des affinités variables pour chacun des deux sites cristallographiques Ca1 et Ca2 (Skinner 2005). Les tétraèdres phosphatés peuvent quant à eux être remplacés par d'autres groupements anioniques tels que AsO₄³⁻, SO₄²⁻, CO₃²⁻, SiO₄⁴⁻... Enfin le site anionique des canaux peut également être occupé par d'autres groupements que les anions OH⁻, F⁻ et Cl⁻ des « pôles purs », tels que CO₃²⁻, O²⁻ ou H₂O.

Cependant, si ces substitutions ont été étudiées de façon approfondie dans la littérature, les mécanismes associés ne font pas toujours l'unanimité, notamment en ce qui concerne les mécanismes de compensation de charge permettant d'assurer l'électroneutralité de la structure lors de substitutions par un ion ou groupement moléculaire de charge différente (e.g. Tacker 2008, Pasteris et al. 2012).

L'une des substitutions les plus discutées dans la littérature est celle permettant l'incorporation d'ions carbonates dans la structure de l'apatite, depuis les premières études attestant de l'existence de CO₃²⁻ dans la structure des apatites dites « carbonatées » (Altschuler et al. 1952, Silverman et al. 1952). En effet, dans les apatites biologiques, c'est-à-dire les composantes minérales des os et dents de vertébrés, les substitutions par les ions carbonates sont les plus importantes, quantitativement parlant : l'émail dentaire contient 3 % en masse de CO₂ de carbonates et l'os 4.8 % en masse de CO₂ (Elliott 2002). Quelques pourcents en masse de carbonates modifient drastiquement les propriétés physico-chimiques de l'apatite telles que sa solubilité, son élasticité ou encore sa densité.

Il est établi que le groupement carbonate peut s'incorporer au niveau de deux sites de substitutions distincts dans la structure de l'apatite : le site A où le carbonate remplace les anions X⁻ des canaux et le site B où le carbonate remplace les groupements phosphates tétraédriques (Elliott 1964, LeGeros et al. 1969). Les spectroscopies infrarouge et RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) sont particulièrement adaptées pour distinguer ces deux types de substitutions (Montel 1971, Reigner et al. 1994, Rey et al. 2007, Mason et al. 2008, 2009).

Dans le cas de la substitution en site A, le mécanisme correspond au remplacement de deux anions X^- par un groupement carbonate CO_3^{2-} et ne fait donc pas intervenir de différence de charge (Suetsugu et al. 1998). Les discussions portent principalement sur l'arrangement de l'ion dans le canal anionique. Celui-ci reste plan et perpendiculaire à l'axe a, deux configurations semblant coexister, avec une liaison C-O soit perpendiculaire soit parallèle à l'axe c, comme le montrent les observations expérimentales (Tacker 2008, Fleet 2009) et les modélisations *ab initio* (Ulian et al. 2013).

En revanche, la substitution en site B du groupement PO_4^{3-} par l'ion CO_3^{2-} fait intervenir une différence de charge dont le mécanisme de compensation a longtemps été source de nombreux débats dans la littérature (Pan et Fleet 2002, Leventouri et al. 2006). Une première difficulté est liée à l'absence de consensus concernant la configuration de l'ion carbonate dans le site B. Pour certains auteurs, il conserve sa géométrie plane et occupe l'une des faces du tétraèdre PO_4^{3-} (Elliott 1964, McClellan et Lehr 1969), le quatrième site de l'oxygène du tétraèdre restant vacant (Harries et al. 1987) tandis que d'autres suggèrent qu'il occupe un plan miroir du tétraèdre PO_4^{3-} (Leventouri et al. 2000, Antonakos et al. 2007) La configuration du carbonate est étroitement liée au type de compensation de charge impliqué, plusieurs types de « défauts » carbonatés associés pouvant être observés (Tacker 2008). Ainsi, dans les fluorapatites carbonatées la présence d'un défaut mixte carbonate-fluor (CO_3^{2-} , F^-) a récemment été mis en évidence par des observations spectroscopiques et des modélisations théoriques (Yi et al., 2013). Dans ce modèle de défaut, l'ion carbonate, de géométrie plane, occupe une face du tétraèdre tandis qu'un ion fluor (F^-) occupe le 4^{ème} sommet du « tétraèdre » substitué (Figure 1.2). Dans les apatites déficientes en fluor les mécanismes de compensation de charge semblent être plus complexes et l'existence de plusieurs environnements du site B est avancée (Tacker 2008, Fleet 2009). Un défaut équivalent de type carbonate-hydroxyle (CO_3^{2-} , OH^-) où le groupement hydroxyle assure la compensation de charge locale de la substitution du carbonate en site B semble être moins favorable énergétiquement que son équivalent fluoré (Yi et al., 2014). Dans les apatites riches en sodium ou potassium il est proposé que la substitution de Ca^{2+} par Na^+ (ou K^+) accompagne celle de PO_4^{3-} par CO_3^{2-} assurant ainsi l'électroneutralité (Bonel et al. 1973, Lucas et al. 1987, Fleet et Liu 2008). Certaines études suggèrent que, notamment dans les apatites déficientes en calcium et dans les apatites riches en carbonates, la substitution du carbonate en site B est compensée par des lacunes en Ca^{2+} (Ivanova et al. 2001, Cazalbou et al. 2004) éventuellement combinées à des lacunes en ions X^- (Driessens et al. 1983, Nokhrin 2006) et à des lacunes d'oxygène (Vignoles et al. 1982, Nokhrin 2006).

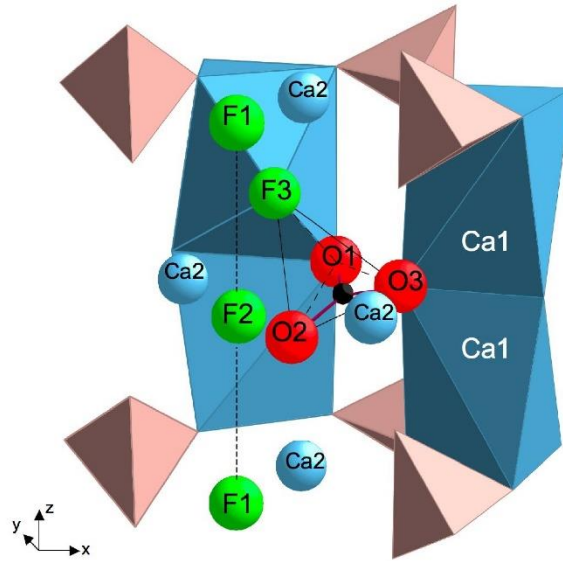


Figure 1.2 – Modèle théorique de défaut mixte (CO_3^{2-} , F^-) dans le site B de la structure d'une fluorapatite d'après Yi et al. (2013)

1.2 Structure des apatites biologiques dans les tissus biominéralisés

Les apatites biologiques, ou bio-apatites, constituent la composante inorganique principale des os et dents de vertébrés (Elliott 2002). Elles sont produites par les organismes vivants via le processus de biominéralisation. Comme mentionné au paragraphe précédent, les apatites biologiques peuvent être décrites en première approximation comme de l'hydroxyapatite carbonatée (Boskey 2007, Pasteris et al. 2008). Cependant, la morphologie des cristaux ainsi que leur composition chimique diffèrent grandement d'un tissu biominéralisé à l'autre. Ainsi des auteurs tels que LeGeros et LeGeros (1984) et Skinner (2005) utilisent des formules de type $(\text{Ca,Na,Mg,K,Sr,Pb},\dots)_{10}(\text{PO}_4,\text{CO}_3,\text{SO}_4,\dots)_6(\text{OH,F,C,CO}_3,\dots)_2$ pour représenter la grande variabilité de composition chimique des apatites biologiques.

On distingue trois types de tissus biominéralisés chez les vertébrés : l'os, la dentine et l'émail dentaire. Il s'agit dans tous les cas de matériaux composites constitués d'une fraction minérale (apatite), d'une fraction organique (protéines) et d'eau en proportions variables (Figure 1.3). La composition de la phase apatitique varie d'un tissu biominéralisé à l'autre (Table 1.2), notamment en ce qui concerne la substitution la plus importante présente dans les apatites biologiques : celle par les groupements carbonates. La solubilité de la bioapatite est corrélée positivement avec la teneur en carbonates substitués (Ito et al. 1997 ; Hankermeyer 2002), l'os et la dentine plus riches en carbonates sont plus solubles que l'émail dentaire.

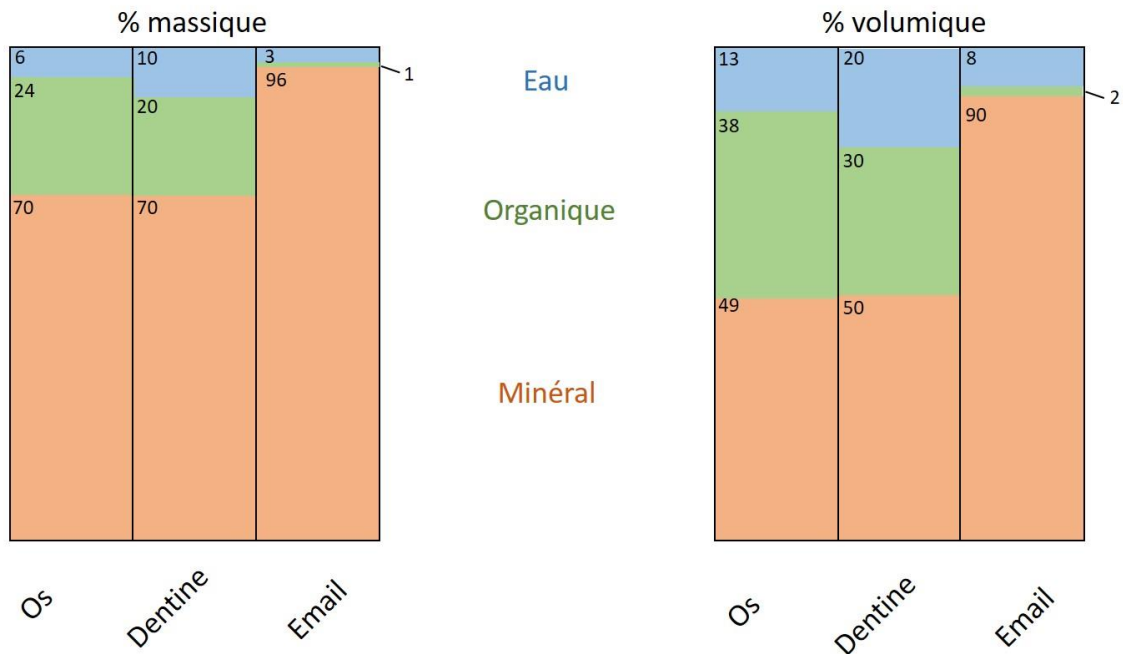


Figure 1.3 Proportions moyennes en masse (gauche) et en volume (droite) des principaux constituants, minéral, organique et eau, dans les tissus biominéralisés des mammifères d’après Pasteris et al. (2008)

Table 1.2 Composition chimique typique rapportée en pourcentage massique de la fraction minérale des différents tissus biominéralisés des mammifères d’après Elliott (1994)

Constituant	Os	Dentine	Email
Ca	36.6	40.3	37.6
P	17.1	18.6	18.3
CO ₂	4.8	4.8	3.0
Na	1.0	0.1	0.7
K	0.07	0.07	0.05
Mg	0.6	1.1	0.2
Sr	0.05	0.04	0.03
Cl	0.1	0.27	0.4
F	0.1	0.07	0.01

1.2.1 L’os

L’os est composé d’apatite et de matière organique, principalement du collagène (et une faible quantité de protéines non-collagéniques), en proportions volumiques équivalentes (Rogers et Zioupos 1999, Skinner 2005). Le rapport minéral/collagène peut varier d’un animal à l’autre mais aussi d’un type d’os à l’autre au sein d’un même animal et influence grandement les propriétés de dureté et rigidité du matériau biologique, une fraction minérale élevée donnant lieu à des os plus durs mais plus cassants (Curey 2004).

L'os est un tissu en perpétuel remaniement, opéré par deux types de cellules. D'une part, les ostéoblastes synthétisent du nouveau tissu osseux et d'autre part les ostéoclastes contrôlent la résorption du tissu anciennement formé, assurant ainsi son renouvellement continu tout au long de la vie du vertébré.

A l'échelle macroscopique de l'os, on distingue deux types de structures : l'os cortical (qui représente 4/5 du squelette (Tandon et al. 1998)), plus dense et plus résistant que l'os spongieux, ou trabéculaire, situé dans la zone interne de l'os (Figure 1.4). Bien que de même composition chimique ces deux tissus diffèrent par leur texture, l'os cortical comportant 5 à 30% de porosité contre 30 à 90 % pour l'os spongieux (Toppetts et al. 2004), et leur fonction. A l'échelle microscopique, le volume de l'os cortical est constitué d'ostéons composés de lamelles osseuses cylindriques disposées autour de canaux neuro-vasculaires longitudinaux (canaux de Havers). Les cellules osseuses (ostéoblastes) se retrouvent enfouies dans les couches concentriques de la matrice osseuse qu'elles ont créée. Le réseau structural de celle-ci est constitué de fibres de collagène, chacune correspondant à un faisceau de centaines de fibrilles parallèles les unes aux autres. Les fibrilles de collagène à leur tour sont constituées de microfibrilles, un regroupement de cinq molécules de collagène, intercalées par des « plaquettes » d'apatite d'une épaisseur de seulement quelques mailles unitaires (Eppell et al. 2001). Ainsi les cristallites d'apatite dans l'os sont de taille nanométrique, d'environ $\sim 2 - 4$ nm d'épaisseur et $\sim 10 - 20$ nm par $\sim 30 - 50$ nm de surface (LeGeros et LeGeros 1984, Elliott 2002, Glimcher 2006, Pasteris et al. 2008). On retrouve enfin à l'échelle atomique la structure cristalline de l'apatite, telle que décrite dans la section 1.1. L'os est donc un matériau très hiérarchisé et très structuré à plusieurs niveaux d'échelle spatiale.

La taille nanométrique des cristallites dans l'os joue un rôle crucial concernant ses propriétés en donnant lieu à des rapports surface/volume très élevés. Afin notamment d'expliquer les propriétés de surface des cristallites ainsi que des signatures spectroscopiques particulières observées dans les apatites biologiques de l'os frais, des chercheurs ont proposé l'existence d'espèce « labiles », tels que des ions CO_3^{2-} ou HPO_4^{2-} , non incorporées dans la structure cristalline mais intimement liés à la bioapatite (Cazalbou et al. 2004, Glimcher 2006). Il est donc proposé dans la littérature l'existence d'un domaine minéral désordonné et distinct autour des cristallites d'apatite, dans l'os (Wu et al. 2002, Drouet et al. 2018) et également dans la dentine (Huang et al. 2009), et qui concentrerait ces espèces labiles. Cette phase correspondrait à un phosphate de calcium non-apatitique amorphe et hydraté (Wang et al. 2013). Observée dans l'os frais, elle est très instable (Rey et al. 2007) et se dégrade rapidement post-mortem.

L'os comporte environ 13 % en volume d'eau dont le rôle tout comme la localisation font l'objet de débats dans la littérature (Drouet et al. 2018). Différentes conceptions de l'eau sont évoquées (Pasteris et al. 2012) mais de façon générale deux types d'eau sont communément distinguées : l'eau « mobile » qui serait présente dans la microporosité du tissu osseux et l'eau « liée » qui constituerait une surface d'hydratation autour des cristallites et jouerait le rôle d'agent interfacial entre l'apatite et le collagène (Nyman et al. 2008). L'eau présente à la surface des cristallites pourrait jouer un rôle dans l'alignement des nano-cristallites au sein du tissu osseux et être étroitement liée à la phase de phosphate de calcium amorphe désordonnée évoquée au paragraphe précédent (Wang et al. 2013). L'eau « liée » pourrait également correspondre à de l'eau structurale occupant divers sites de lacunes créés par des substitutions dans la structure de l'apatite (Ivanova 2001, Wilson et al. 2006). Yoder et al. (2012) et Pasteris et al. (2014) suggèrent ainsi, sur la base d'analyses RMN et Raman respectivement, que l'eau moléculaire se situe dans les canaux anioniques de la structure de l'apatite. Si la présence d'une couche d'hydratation à la surface des cristallites de l'os frais semble être attestée en particulier par la RMN du proton et du phosphore (Nyman et al. 2008, Kafalak et Kolodziejcki 2008, Wang et al. 2013), les mécanismes d'incorporation de l'eau moléculaire dans la structure de l'apatite quant à eux restent à être identifiés.

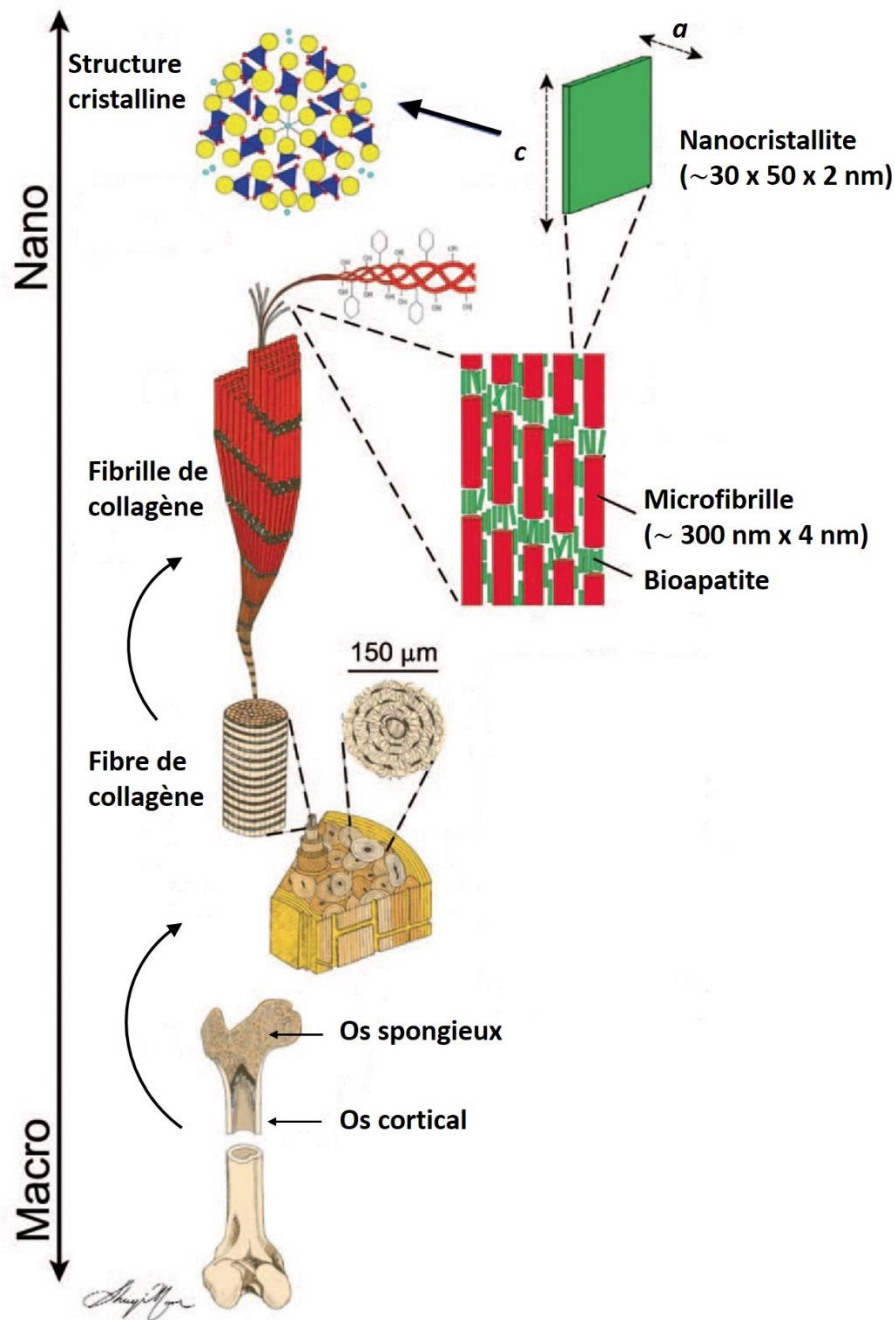


Figure 1.4 Schéma des différents niveaux d'organisation structurale de l'os depuis l'échelle macroscopique jusqu'à l'échelle atomique, traduit et modifié d'après Pasteris et al. (2008).

1.2.2 La dentine

La dentine forme l'essentiel de la dent, l'émail ne correspondant qu'à la fine couche extérieure, de quelques millimètres d'épaisseur pour une dent humaine (Figure 1.5). Tout comme l'os, la dentine est constituée de cristallites en forme de plaquettes et de taille nanométrique, en connexion avec une matrice collagénique. Les odontoblastes contrôlent la minéralisation du tissu dont le rythme de croissance est marqué par des stries, les lignes d'Owen, obliques à la jonction émail-dentine.

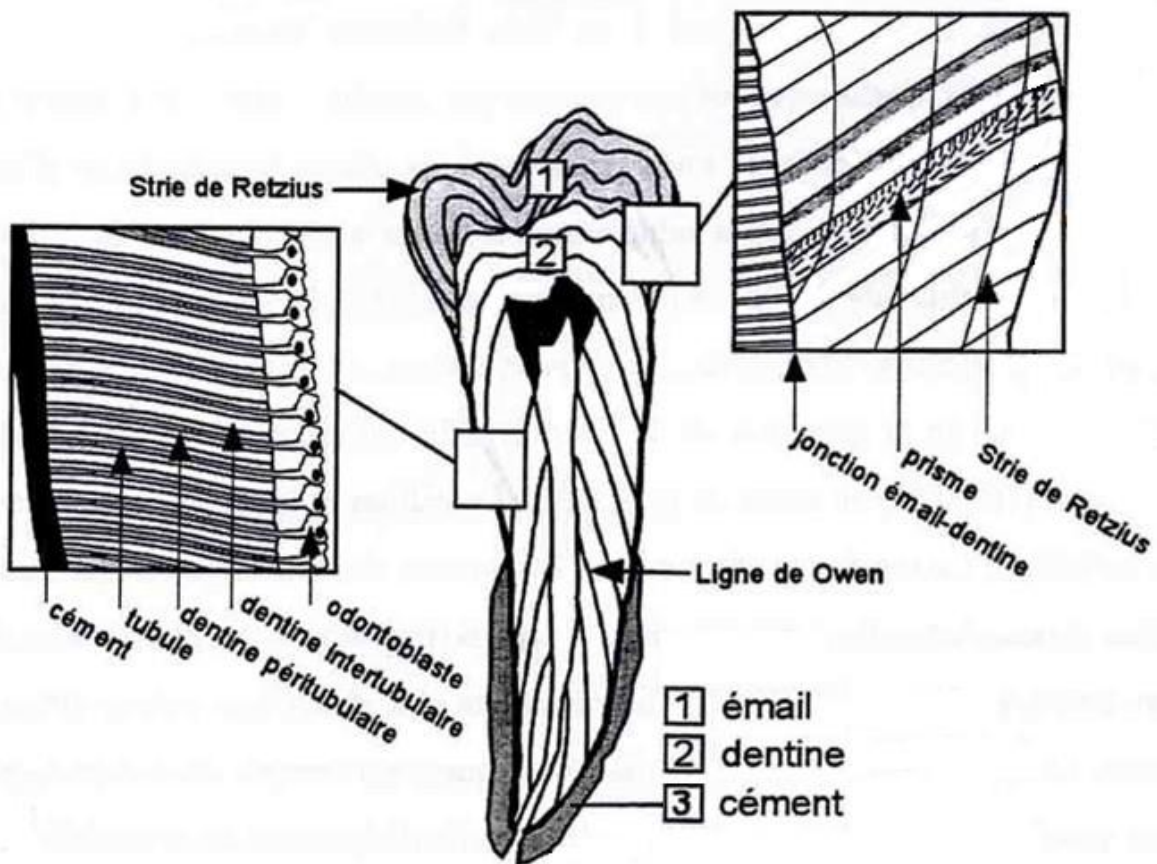


Figure 1.5 Schéma d'une coupe longitudinale d'une dent (modifié par Zazzo 2001, d'après Carlson 1990)

1.2.3 L'émail

Comparé à l'os et à la dentine, l'émail est le tissu le plus minéralisé, avec plus de 96 % en masse de phase minérale, et le moins poreux (Carlson 1990). Il est totalement dépourvu de collagène et contient seulement 1% en masse de composés organiques. Les cristallites d'apatite présentent une forme en « bâtonnets » et sont de taille plus grande que dans l'os et la dentine, en moyenne 25 nm d'épaisseur, 70 nm de large et 100 à 5000 nm de long (LeGeros et Le Geros 1984). L'émail est également moins riche en carbonates substitués (Table 1.2) ce qui lui confère une plus faible solubilité. Mieux cristallisé et moins soluble pour résister aux agressions externes, l'émail est donc le tissu considéré comme étant le plus résistant et le moins sensible aux processus d'altération. La minéralisation de ce tissu depuis la jonction émail-dentine jusqu'à la périphérie est contrôlée par les améloblastes dont l'activité est marquée par les stries de Retzius (Figure 1.5)

De plus, contrairement à l'os, l'émail ne subit pas de remodelage au cours de la vie du vertébré. En effet, le processus de minéralisation de l'émail se déroule en deux étapes qui ont lieu au cours des premiers mois de vie (Scheuer et Black 2000), le tissu reste ensuite inchangé pour le reste de la vie du vertébré. Tout d'abord une phase de sécrétion conduit à la formation

de cristallites de longueurs et largeurs atteignant leur valeur définitive (Suga 1982). Une phase de maturation correspond ensuite au passage de plusieurs fronts de minéralisation successifs dans l'épaisseur de l'émail et contribue à l'élimination de l'eau et de la matière organique et à l'augmentation de l'épaisseur des cristallites vers leur valeur finale. Ainsi, contrairement au tissu osseux où l'on considère que la composition chimique d'un os pris sur un individu à un instant donné représente une moyenne des 3 dernières années de sa vie (Hedges et al. 2007), la composition de l'émail dentaire reflète celle de ses premiers mois. Il s'agit d'une différence majeure dont les reconstitutions paléoenvironnementales basées sur l'analyse des compositions chimiques et isotopiques de reste de vertébrés fossiles doivent tenir compte.

Bien que tous les tissus biominéralisés de vertébrés soient constitués d'hydroxyapatite carbonatée, d'eau et de matière organique, chacun d'entre eux possède des caractéristiques physico-chimiques propres qui ont des conséquences différentes sur leur devenir diagénétique, c'est-à-dire post-mortem après l'enfouissement.

1.3 Apports de la composition isotopique des tissus biominéralisés fossiles à la reconstitution des environnements et climats passés

1.3.1 Géochimie isotopique : quelques définitions

Des atomes qui diffèrent uniquement par leur nombre de neutrons sont appelés isotopes. Les isotopes d'un même élément sont dits stables s'ils ne se transforment pas au cours du temps sous l'effet de la désintégration radioactive. Ainsi ^{12}C (majoritaire) et ^{13}C sont des isotopes stables du carbone tandis que ^{14}C est un isotope radioactif. La composition isotopique d'une phase A peut être déterminée par spectroscopie de masse en mesurant le rapport isotopique $R(Y/Y')_A$:

$$R(Y/Y')_A = \frac{N(Y)_A}{N(Y')_A} \quad (1.1)$$

où $N(Y)_A$ et $N(Y')_A$ sont les abondances en isotopes Y et Y' (Y' correspondant à l'isotope léger) dans la phase A .

En pratique les teneurs isotopiques d'un élément sont exprimées en pour mille (‰), comme une déviation par rapport à la composition isotopique connue d'un standard international, sous la forme suivante :

$$\delta Y_A = \frac{R(Y/Y')_A - R(Y/Y')_{std}}{R(Y/Y')_{std}} \times 1000 \quad (1.2)$$

Dans le cas du carbone, le standard est un carbonate marin, le PDB (bélemnites de la formation PeeDee, USA). Pour l'oxygène il est possible d'utiliser indifféremment le PDB ou bien le VSMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water), un échantillon moyen d'eau de mer, reliés entre eux par la relation $\delta^{18}\text{O}_{(VSMOW)} = 1.03091 \times \delta^{18}\text{O}_{(PDB)} + 30.91$ (Coplen et al. 1983).

Le fractionnement isotopique entre deux phases est donné par le facteur de fractionnement isotopique α qui peut s'exprimer comme le rapport des rapports isotopiques des deux phases A et B :

$$\alpha_{AY-BY} = \frac{R(Y/Y')_A}{R(Y/Y')_B} \quad (1.3)$$

En reprenant l'équation (1.2) comme $R(Y/Y')_A = R(Y/Y')_{std} \times (\delta Y_A + 1)$, il est possible de réécrire le facteur de fractionnement isotopique en fonction des δY mesurés expérimentalement :

$$\alpha_{AY-BY} = \frac{\delta Y_A + 1}{\delta Y_B + 1} \quad (1.4)$$

L'enrichissement isotopique relatif entre deux phases étant généralement faible, le lien entre celui-ci et les valeurs mesurées expérimentalement peut souvent se faire via un développement limité de la fonction logarithme $\ln(\delta Y + 1)$:

$$1000 \ln(\alpha_{AY-BY}) \approx \delta Y_A - \delta Y_B \quad (2.1)$$

1.3.2 Acquisition du signal isotopique par les tissus biominéralisés

En milieu continental, les compositions isotopiques de l'oxygène et du carbone des bioapatites enregistrent celles de l'eau de boisson et de la nourriture ingérées par un vertébré.

1.3.2.1 Fractionnement isotopique du carbone entre les tissus biominéralisés et l'alimentation

 *Fractionnement isotopique associé à l'incorporation du carbone dans les tissus biominéralisés*

La composition isotopique en carbone des tissus biominéralisés reflète celle de l'alimentation (DeNiro et Epstein, 1978). Les différentes composantes des tissus biominéralisés ne sont pas synthétisées à partir des mêmes constituants de l'alimentation et présentent donc des compositions isotopiques en carbone différentes. Ainsi, le $\delta^{13}\text{C}$ du carbonate structural des bioapatites, issu des bicarbonates du sang (Lee-Thorpe et al. 1989), reflète celui du régime alimentaire global (Jim et al. 2004) alors que le $\delta^{13}\text{C}$ du collagène est lié à la fraction protéique de l'alimentation (Krueger et Sullivan 1984, Ambrose et Norr 1993, Jim et al. 2004). Le fractionnement isotopique du carbone entre le carbonate de l'apatite et l'alimentation varie de $\sim 9\text{‰}$ pour des rongeurs et cochons élevés en conditions contrôlées (Koch 1998) ou les mammifères carnivores, jusqu'à $\sim 14\text{‰}$ pour des données de terrain sur des grands mammifères herbivores (Cerling et Harris 1999). Le collagène est moins enrichi en ^{13}C que le carbonate de l'apatite par rapport à l'alimentation, avec un fractionnement isotopique d'environ 5‰ (Ambrose et Norr 1993). L'hypothèse d'un effet trophique lié à la différence de régime alimentaire entre herbivores et carnivores a été avancée pour expliquer l'écart variable entre le $\delta^{13}\text{C}$ de l'apatite et celui du collagène (Lee-Thorp et al. 1989) cependant cet écart est susceptible de varier même entre différents groupes humains (Kellner et Schoeninger 2007).

Variabilité des teneurs en ^{13}C dans les écosystèmes continentaux

Pour synthétiser les sucres nécessaires à leur croissance, les plantes autotrophes tirent leur source de carbone du CO_2 atmosphérique dont le $\delta^{13}\text{C}$, qui n'a cessé de décroître depuis le début de l'ère industrielle et a diminué d'environ 2 ‰ en l'espace de deux siècles, est actuellement de -8 ‰. Lors de l'assimilation du CO_2 atmosphérique par les plantes, deux processus font intervenir un fractionnement isotopique. Le premier concerne la diffusion CO_2 de l'extérieur jusqu'aux cellules et est identique chez toutes les plantes. Le second est lié au mode de fixation du carbone par une enzyme spécifique au cycle photosynthétique de la plante et donne lieu à un fractionnement isotopique du carbone différent selon le type de photosynthèse : C3, C4 ou CAM (Crassulean Acid Metabolism).

Chez les plantes dites en C3 (arbres, arbustes, herbacées des régions tempérées), l'enzyme rubisco catalyse l'incorporation du CO_2 pour former, via le cycle de Calvin, un composé de 3 atomes de carbone, l'acide phosphoglycérique, à la base de la chaîne de formation du glucose. Cette enzyme utilise en priorité le dioxyde de carbone ne comportant que des isotopes légers et induit donc un fractionnement isotopique important, donnant lieu à des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ très négatives, comprises entre - 25 ‰ (en milieu ouvert) et - 30 ‰, voire jusqu'à -35 ‰ pour les plantes en C3 situées sous la canopée dans les milieux forestiers (Kohn 2010).

Chez les plantes dites en C4 (graminées tropicales), l'assimilation du CO_2 est assurée dans un premier temps par l'enzyme PEP carboxylase et donne lieu à la formation d'un composé à 4 atomes de carbone, l'oxaloacétate. Dans un second temps celui-ci est dégradé et rejette le CO_2 pour alimenter le cycle de Calvin dans d'autres cellules où l'enzyme rubisco intervient alors. Celle-ci agit ainsi dans un milieu cellulaire très concentré en CO_2 . Ce métabolisme est donc plus performant que celui des plantes en C3 dans les milieux de faible teneur en CO_2 (Sage, 1999) et permet de limiter la perte d'eau par évapotranspiration. Ces différences confèrent aux plantes en C4 une meilleure adaptation aux températures élevées, aux fortes intensités lumineuses et au stress hydrique (Ehleringer et al. 1991, 1997). La première consommation attestée de plantes en C4 remonte à environ 10 millions d'années aux faibles latitudes (Uno et al. 2011). Ces plantes présentent des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ comprises entre - 11 ‰ et - 13 ‰ (Kohn et Cerling 2002).

Ces différences métaboliques sont à l'origine de la nette distinction isotopique observée entre plantes en C3 et plantes en C4 (Figure 1.6). La plus grande variabilité de compositions isotopiques en carbone au sein du groupe de plantes en C3 est liée à une plus grande sensibilité aux facteurs environnementaux tels que l'intensité lumineuse, l'humidité ou la pression partielle en CO_2 (Heaton 1999).

Les plantes CAM (cactacées et autres plantes succulentes), quant à elles, utilisent alternativement la photosynthèse en C3 et en C4 en fonction du moment de la journée. Leurs valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ sont très variables et couvrent de ce fait toute la gamme des compositions isotopiques en carbone des plantes en C3 et des plantes en C4 (O’Leary 1981).

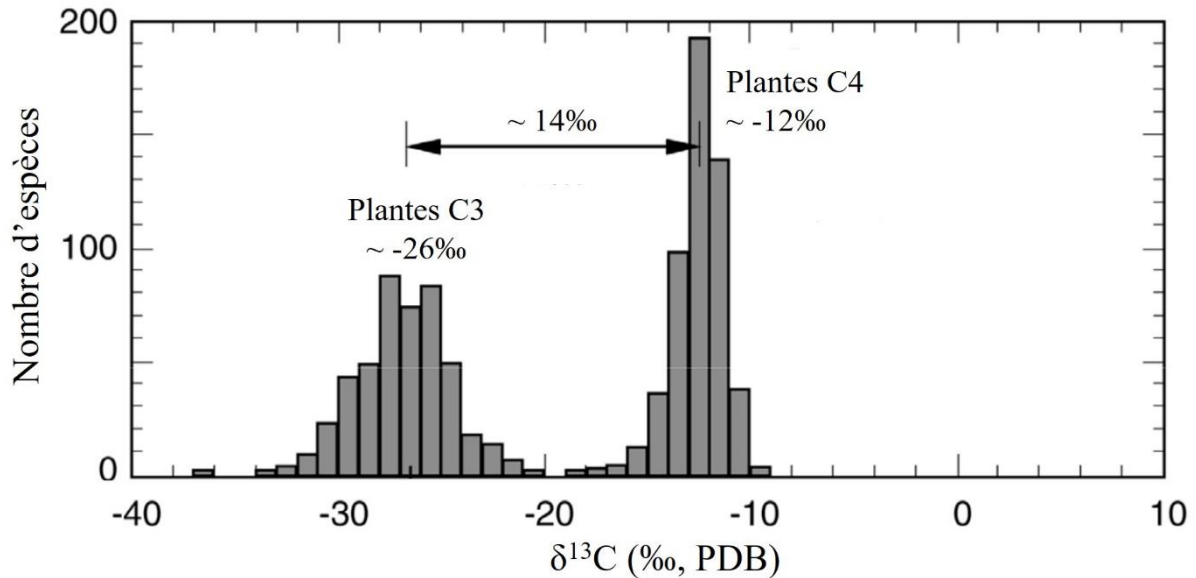


Figure 1.6 – Histogrammes des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ dans les plantes en C3 et en C4 (Kohn et Cerling 2002)

1.3.2.2 Fractionnement isotopique de l’oxygène entre l’apatite et l’eau de boisson

🦴 Fractionnement isotopique associé à l’incorporation de l’oxygène dans les tissus biominéralisés

La composition isotopique en oxygène de la bioapatite est contrôlée par celle des fluides corporels. L’incorporation de l’oxygène au niveau des groupements phosphate est dominée par des processus de fractionnement isotopique à l’équilibre (Longinelli et Nuti 1973, Kolodny et al. 1993, Lécuyer et al. 1996). Le $\delta^{18}\text{O}$ des carbonates étant fortement corrélé à celui des phosphates (Bryant et al. 1996, Iacumin et al. 1996), les carbonates sont également supposés précipiter à l’équilibre isotopique avec les fluides corporels. La composition isotopique en oxygène des fluides corporels est liée aux flux entrants et sortants d’oxygène dans le corps et correspond donc à une fonction complexe de facteurs climatiques, physiologiques et liés à l’alimentation. Les sources d’oxygène sont la respiration, l’eau de boisson et l’eau métabolique liée à la nourriture. Toutefois le $\delta^{18}\text{O}$ atmosphérique est relativement constant, $\sim 24\text{‰}$, (Kroopnick et Craig, 1972), ce qui implique que la composition isotopique en oxygène des bioapatites est essentiellement contrôlée par la composition de l’eau de boisson et dans une moindre mesure par celle de l’eau métabolique liée à la nourriture ingérée.

Variabilité des teneurs en ^{18}O dans l'eau de boisson

La composition isotopique des eaux de surface dépend des eaux de pluie (Gat, 1996) dont la composition isotopique en oxygène varie en fonction de plusieurs facteurs géographiques et climatiques tels que la latitude, l'altitude, la distance à la côte, ou encore l'intensité des précipitations (Dansgaard, 1964). Le $\delta^{18}\text{O}$ des eaux météoriques (pluie, neige) présente une amplitude de l'ordre de 30 ‰ à l'échelle du globe (Figure 1.7), reflétant l'appauvrissement progressif en ^{18}O de la vapeur d'eau atmosphérique par précipitations successives en se déplaçant le long des gradients thermiques (distillation de Rayleigh). Ainsi aux hautes et moyennes latitudes, le rapport $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ des précipitations dépend principalement de la température car les masses d'air qui se déplacent le long des gradients thermiques s'appauvrissent en ^{18}O en circulant depuis l'équateur jusqu'aux pôles, de la mer au continent ou des basses vers les hautes altitudes. En revanche aux basses latitudes, c'est-à-dire dans les zones tropicales, la composition est avant tout contrôlée par l'intensité des pluies, le $\delta^{18}\text{O}$ diminuant lorsque la pluviométrie augmente (Fricke et O'Neil 1999). Dans le cas d'eaux lacustres, l'apport des bassins versants doit également être pris en compte ainsi que l'évaporation qui contribue à enrichir en ^{18}O .

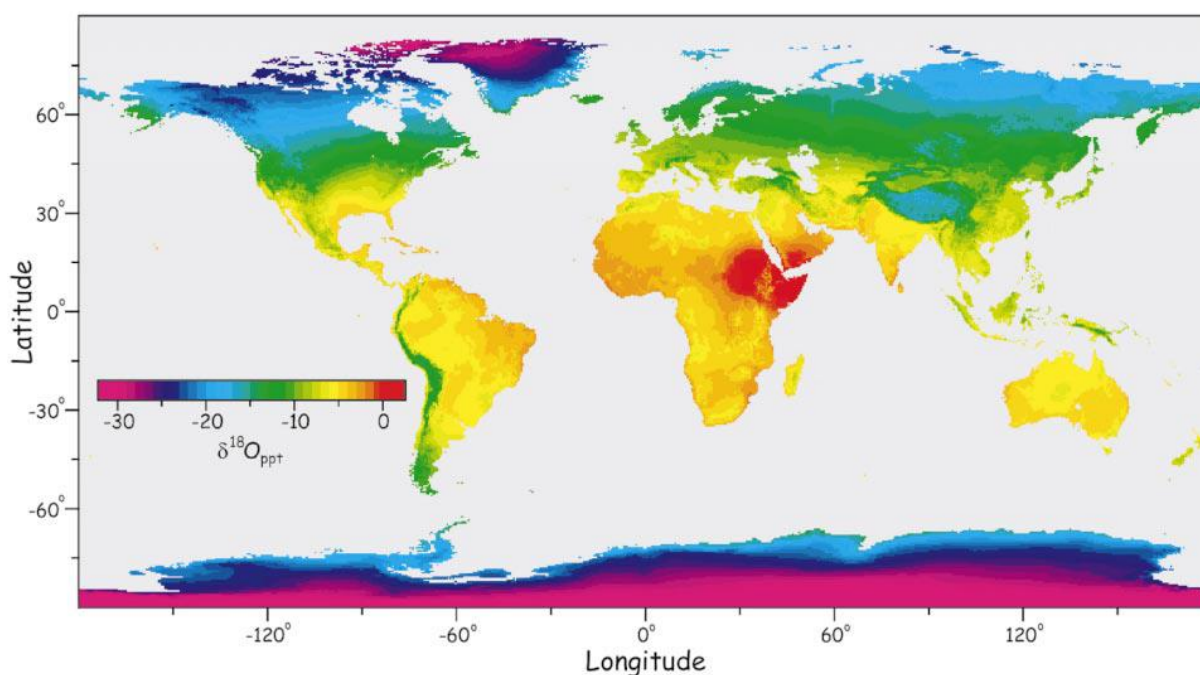


Figure 1.7 – Répartition géographique du $\delta^{18}\text{O}$ moyen annuel des précipitations actuelles exprimé par rapport au standard VSMOW, d'après Bowen et Wilkinson (2002).

1.3.3 Reconstitutions des climats et environnements passés

La sensibilité de la composition isotopique en carbone des plantes aux facteurs environnementaux en fait un outil de choix pour la reconstitution des paléoenvironnements en domaine continental. Celle-ci peut être réalisée directement à partir de l'analyse isotopique des végétaux fossiles ou des grains de pollen (e.g. Scott 1995, Bamford et al. 2006, Messenger et al. 2010). Toutefois ils ne sont pas nécessairement autant représentatifs que les tissus fossilisés des herbivores et il est important de pouvoir croiser les informations obtenues par le biais de proxys différents. La composition isotopique en carbone des bioapatites permet ainsi de distinguer dans les zones tropicales les graminivores ou tondeurs de graminées C4 (grazers en anglais) des folivores ou brouteurs de feuilles C3 (browsers en anglais). La connaissance du régime alimentaire permet alors de remonter à la paléoécologie et à l'environnement associé à l'animal (Lee-Thorp et van der Merwe 1987, Quade et al. 1992).

La composition isotopique de l'eau de pluie étant corrélée aux moyennes latitudes à la température, il s'agit d'une donnée précieuse pour déterminer les climats anciens. La composition isotopique en oxygène des groupements carbonates et phosphates des bioapatites fossiles constitue donc un proxy permettant de remonter à la composition isotopique de l'eau météorique à condition de connaître l'équation de fractionnement isotopique avec l'eau corporelle. L'utilisation du gradient moderne $\delta^{18}\text{O}$ /température permet alors de traduire ces différences de composition isotopique en différence de température (Koch et al. 1998).

Au-delà des isotopes traditionnels, des avancées analytiques récentes ont permis l'essor de l'analyse de la composition isotopique du calcium des bioapatites (Gussone et al. 2016). Tout comme pour le carbone et l'oxygène, la composition en isotopes stables du calcium (^{40}Ca , ^{42}Ca , ^{44}Ca) est susceptible d'enregistrer des paramètres relatifs au régime alimentaire et à l'environnement (Skulan et al. 1997). Les apatites biologiques concentrent la quasi-totalité du calcium du corps des vertébrés, ~99 % (Pasteris et al. 2008), la source principale étant le calcium ingéré via l'alimentation. Le processus de biominéralisation des tissus donne lieu à un fractionnement très faible entre le calcium du sang et de l'apatite, de l'ordre de ~0.7 ‰ (Gussone et al. 2016). Les valeurs de $\delta^{44/40}\text{Ca}$ des os humains renseignent sur la présence de produits laitiers dans l'alimentation et peuvent donc être utilisés comme proxy de la consommation de laitage dans un contexte archéologique (Chu et al. 2006). Toutefois, le calcium ayant une masse plus élevée que le carbone ou l'oxygène, le fractionnement isotopique associé qui dépend de la masse est plus faible et les analyses réalisées sur des os archéologiques montrent des variations de $\delta^{44/40}\text{Ca}$ entre individus dues au métabolisme plus grandes que celles attendues en fonction de la présence de laitage ou non dans l'alimentation (Reynard et al. 2010). L'analyse de la composition isotopique en calcium des restes de vertébrés fossiles semble également permettre d'explorer les relations trophiques entre herbivores et carnivores (Heuser et al. 2011). Dans un contexte plus large, la composition isotopique en calcium des carbonates

marins est largement utilisée pour déterminer l'évolution de la composition en calcium de l'eau de mer au cours du temps (Skulan et al. 1997, De la Rocha et DePaolo, 2000). La possibilité d'utiliser les phosphates de calcium, telle que la fluorapatite carbonatée formée dans les sédiments marins, comme autre proxy pour l'étude des flux de Ca passés, reste discutée (Soudry et al. 2006, Farkas et al. 2007).

Dans les contextes archéologiques et préhistoriques, les ossements présentent souvent des degrés de transformation moindres qu'en contexte paléontologique, pouvant se traduire par une préservation partielle de la matrice collagénique de l'os. La composition isotopique du collagène des os archéologiques peut alors également livrer des informations précieuses. Non seulement la datation au carbone 14, isotope radioactif, permet de dater les restes osseux (Hedges et Law 1989), mais la composition en isotopes stables ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) du collagène de l'os livre elle aussi des informations sur le régime alimentaire. Comme celle-ci reflète plus particulièrement la fraction protéique de l'alimentation, elle s'avère complémentaire de celles livrées par les bioapatites. Les études combinant des analyses isotopiques sur les deux composantes organique et minérale de l'os sont alors susceptibles de fournir un panorama plus complet des régimes alimentaires anciens (Sullivan et Krueger 1981, Bocherens et al. 1994, Lee-Thorp et Sponheimer 2003, Harrison et Katzenberg 2003, Katzenberg et al. 2012 Maurer et al. 2017).

Les reconstitutions des environnements et climats anciens effectués à partir de la composition isotopique de restes de vertébrés fossiles reposent avant tout sur la conservation du signal isotopique enregistré du temps du vivant du vertébré. Elles dépendent donc crucialement de la préservation de l'enregistrement isotopique biologique originel au cours du processus de fossilisation. Cependant la composition chimique et isotopique des apatites biologiques ne reste pas figée après la mort de l'individu car de nombreuses transformations ont lieu post-mortem, après l'enfouissement. Il est donc primordial de pouvoir évaluer l'état de préservation de restes de vertébrés fossiles. Toutefois l'état de préservation d'un os ou d'une dent fossiles ne peut pas être déterminée par leur seule apparence macroscopique (Schoeninger et al. 1989). Une compréhension fine des mécanismes de transformations mises en jeu à l'échelle moléculaire est donc nécessaire.

1.4 Altération diagénétique des tissus biominéralisés : entre conservation et évolution post-mortem

La diagénèse est un terme très général regroupant l'ensemble des modifications structurales, minéralogiques et physico-chimiques subies par les tissus biominéralisés enfouis dans le sédiment durant leur fossilisation.

La diagénèse est le produit de l'interaction entre le tissu biominéralisé et les fluides percolant dans le sol. D'une part, les propriétés physico-chimiques de la bioapatite telles que sa solubilité et sa porosité vont contrôler l'intensité des échanges avec les fluides. Ainsi l'os plus poreux et plus soluble que l'émail dentaire sera plus susceptible d'échanges et donc de transformations diagénétiques. D'autre part, les facteurs extérieurs liés au contexte de fossilisation, c'est-à-dire la température, le pH, le degré de saturation et la concentration en éléments traces des fluides, vont orienter la nature des échanges et déterminer leur cinétique.

1.4.1 Processus impliqués dans la diagénèse des tissus biominéralisés

Les différents processus intervenant dans la diagénèse des tissus biominéralisés communément décrits dans la littérature (Hedges et al. 1995b, Nielsen-Marsh et Hedges 2000, Hedges 2002, Smith et al. 2007, Keenan et Engel 2017) sont les suivants :

☞ Dégradation des tissus mous et de la matière organique :

Dans les premiers temps suivant l'enfouissement des tissus biominéralisés, la fraction organique, qui occupe la porosité du tissu, protège la fraction minérale (Person et al. 1996). L'activité microbienne du sol est principalement responsable de la dégradation de la matière organique (Zazzo et al., 2004b), l'élévation de la température dans les contextes archéologiques de restes osseux calcinés pouvant également jouer ce rôle (Zazzo et al. 2009). L'activité des micro-organismes altère également la microstructure de l'os et un indice histologique, HI, établi à partir d'observations en lame mince, permet de quantifier l'impact de l'attaque microbiologique sur les tissus (Hackett 1981). Dans la plupart des cas, la décomposition des tissus mous est achevée quelques centaines d'années après la mort de l'animal (Hedges et al. 1995b). Il est toutefois possible que le collagène soit correctement préservé durant plusieurs dizaines de milliers d'années lorsque les conditions sont favorables (Bocherens et al. 1997).

☞ Précipitation de minéraux secondaires dans les tissus poreux :

Les fossiles d'os ou de dentine, qui sont des tissus plus poreux que l'émail dentaire, contiennent souvent des minéraux secondaires ayant précipité au niveau des porosités, tels que la calcite (Michel et al. 1996), le quartz et la pyrite (Tütken et al. 2008), les argiles ou encore des oxydes ferro-manganésiens (Kohn et al. 1999). Ces précipitations dépendent des conditions physico-chimiques du milieu de dépôt, les précipitations de carbonates ou de sulfates de calcium, sodium, potassium ou magnésium étant majoritaires en milieu aride (Pate et Hutton

1988). La présence de minéraux secondaires au sein du tissu contribue à modifier la composition chimique et isotopique de l'échantillon fossile analysé et des prétraitements sont nécessaires pour solubiliser ces minéraux diagénétiques avant toute analyse isotopique (Snoeck et Pellegrini 2015).

Incorporation d'éléments traces :

Les fossiles sont enrichis en éléments chimiques exogènes tel que le fluor jusqu'à quelques pourcents en masse (Michel et al. 1996) et en traces tels que le fer et le manganèse (Kohn et al. 1999, Reiche et al. 2003, Dauphin et Williams 2007), l'uranium (Millard et Hedges 1995, Hubert et al. 1996) et en terres rares (Kohn 2008, Tütken et al. 2008, Ségalen et al. 2008, Reynard et al. 2014). Les os et la dentine fossiles comportent généralement des teneurs en éléments traces d'un ou plusieurs ordres de grandeur plus élevées que l'émail (Kohn et al. 1999).

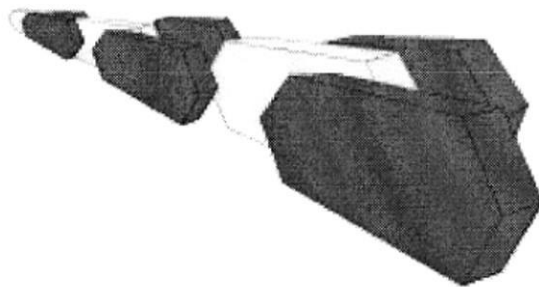
Recristallisation de la bioapatite :

D'un point de vue structural, la dégradation de la matière organique et notamment l'hydrolyse du collagène de l'os et de la dentine (Collins et al. 1995) devrait exposer la surface des cristallites et conduire à l'apparition d'une microporosité mais en réalité celle-ci diminue au profit d'une augmentation de la macroporosité (Hedges et al. 1995, Nielsen-Marsh et Hedges 2000, Trueman et Tuross 2002). Cette redistribution de la porosité est liée à l'augmentation de cristallinité observée dans la majorité des os et dentine fossiles et qui tend à rejoindre celle de l'émail moderne (Tuross et al. 1989a, Ayliffe et al. 1994, Person et al. 1995, Michel et al. 1996, Wright et Schwarcz 1996). La notion de cristallinité, souvent employée dans la littérature concernant les apatites et dont la définition reste ambiguë, correspond à une estimation du degré de perfection de la structure cristalline et tient compte de la taille des cristallites. L'augmentation de la cristallinité dans l'os et la dentine fossiles est en général observée à travers le prisme d'« indices de cristallinité » mesurés par diffraction des rayons X (DRX) (Person et al. 1995), par spectroscopie infrarouge (Shemesh 1990, Weiner et Bar-Yosef 1990) ou encore Raman (Pucéat et al. 2004). Les mécanismes à l'origine de ces transformations sont communément désignés par le terme général de « recristallisation » (Trueman et Tuross 2002) mais font, dans le détail, l'objet de discussions (Tuross et al. 1989, Hubert et al. 1996, Kolodny et al. 1996, Nielsen-Marsh et Hedges 1997, 2000, Trueman et Tuross 2002, Keenan et Engel, 2017). L'augmentation de la taille moyenne des cristallites pourrait simplement être expliquée par une dissolution différentielle des plus petites cristallites comme observé dans le processus du murissement d'Ostwald (Tuross et al. 1989a,b). Toutefois les expériences de dissolution en conditions contrôlées ainsi que l'analyse de la porosité d'os archéologiques réalisées par Nielsen-Marsh et Hedges (1997, 2000) suggèrent que la dissolution des plus petites cristallites ne peut à elle seule expliquer l'ampleur du phénomène d'augmentation de cristallinité observé. La dissolution doit être accompagnée d'une recristallisation concomitante dont la nature dépend

fortement des conditions physico-chimiques du milieu (Nielsen-Marsh et Hedges 2000). De façon générale la dissolution-re cristallisation des bioapatites donne lieu à la formation d'une phase plus stable et moins soluble, la fluorapatite carbonatée (Trueman et Tuross 2002). Les fossiles de vertébrés présentent donc des caractéristiques minéralogiques intermédiaires entre l'hydroxyapatite carbonatée biogénique et la fluorapatite carbonatée sédimentaire. Un mécanisme de dissolution-re cristallisation à grande échelle où les fossiles correspondent à des pseudomorphes des tissus biominéralisés a ainsi été proposé par Kolodny et al. (1996). Cependant pour certains auteurs, le fait que la plupart des os fossiles conservent des détails de leur histologie originale (ostéons, canaux de Havers...) indique que l'orientation originale des cristallites, dont l'axe *c* est aligné avec les fibrilles de collagène, est conservée, ce qui irait à l'encontre d'une large dissolution-re cristallisation (Hubert et al. 1996). Un autre modèle impliquant la surcroissance d'une fluorapatite carbonatée secondaire à la surface des cristallites a donc été proposé par Hubert et al. (1996). La bioapatite originelle serait alors préservée et la croissance continuerait jusqu'à ce que la porosité intra-cristalline soit remplie par l'apatite secondaire (Figure 1.8)

Os frais

Cristallites d'apatite alignés parallèlement aux fibres de collagène.



Os fossile

Croissance d'apatite secondaire autour des cristallites et réduction de la porosité intercristalline. Préservation de l'orientation des cristallites.

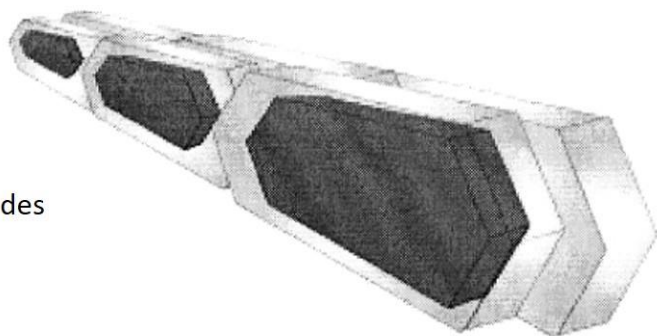


Figure 1.8 – Représentation schématique du processus de recristallisation de l'os fossile par formation d'apatite secondaire à la surface des cristallites d'après Hubert et al. (1996) et Trueman et Tuross (2002)

Contrairement aux autres tissus, l'émail fossile ne présente pas d'augmentation significative de la taille des cristallites par rapport à l'émail moderne et la recristallisation en fluoapatite carbonatée peut s'opérer en impliquant des variations minimales de la composition isotopique de l'apatite biogénique (Lee-Thorp et Sponheimer 2003, Roche et al. 2010). Les processus de transformations diagénétiques semblent donc plus complexes dans l'os et la dentine que dans l'émail. On retrouve ici une conséquence directe des caractéristiques physico-chimiques et structurales différentes entre les différents types de tissus biominéralisés.

Le processus de dissolution-recristallisation de la bioapatite s'accompagne d'une variation de la teneur en carbonate. Selon les conditions du milieu de fossilisation, l'incorporation (Michel et al. 1995) tout autant que la perte (Roche et al. 2010) de carbonates peut être observée. La perte de carbonates structuraux contribue à augmenter la cristallinité de l'apatite et à diminuer sa solubilité (Person et al. 1995, Trueman et Tuross 2002).

A l'échelle atomique, Yi et al. (2014) ont mis en évidence la présence d'un signal de défaut mixte carbonate-fluor (Figure 1.2) dans la structure d'émail dentaire fossile provenant des Tugen Hills (Kenya), à la fois en spectroscopie infrarouge et RMN ^{19}F . Ceci montre que même dans de l'émail, la dissolution de la bioapatite s'accompagne d'une précipitation de fluorapatite carbonatée secondaire. Ce défaut pourrait donc constituer un marqueur à l'échelle atomique du processus de fossilisation. Il reste toutefois à comprendre quelles sont les conditions physico-chimiques des fluides diagénétiques requises pour permettre sa formation et quelles peuvent en être les conséquences sur les signatures isotopiques.

Au vu des nombreuses transformations diagénétiques se produisant au sein des tissus biominéralisés se pose donc la question de la préservation de l'enregistrement chimique et isotopique des bioapatites au cours de la fossilisation.

1.4.2 La diagénèse, une fatalité ? Comment évaluer son impact ?

Dans l'os, la taille nanométrique des cristallites donne lieu à une surface spécifique élevée donc à une réactivité et une solubilité plus importantes que dans l'émail dentaire (LeGeros 1991). L'os est donc supposé moins résistant à l'alteration diagénétique que l'émail mieux minéralisé et moins poreux (Michel et al. 1995; Lee-Thorp and Sponheimer 2003; Pasteris and Ding 2009). Pour cette raison les reconstructions paléoenvironnementales et paléoclimatiques basées sur l'analyse isotopique de restes de vertébrés fossiles sont principalement effectuées sur l'émail fossile (Wang et Cerling, 1994). Cependant l'émail n'est pas exempt de transformations diagénétiques et d'échange isotopique (Hedges et al. 1995a, Lee-Thorp et Sponheimer, 2003) et ne fournit des informations que sur le régime alimentaire au stade juvénile du mammifère. L'os est disponible en plus grande quantité que l'émail qui peut être rare dans certains contextes de fossilisation. De plus, certains taxa comme les oiseaux ou les poissons primitifs ne possèdent pas de dents. Enfin, contrairement à l'émail, l'os livre

des informations sur le régime alimentaire des dernières années de vie de l'animal qui peuvent être complétées par l'analyse de la composition isotopique du collagène associé, lorsque celui-ci est préservé (Lee-Thorp and Sponheimer, 2003; Lee-Thorp, 2008). Par ailleurs, sur des périodes plus récentes (quelques dizaines de milliers d'années) les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ obtenues sur l'os sont tout aussi fiables que celles obtenues à partir de l'émail (Zazzo 2014). Elucider les mécanismes de transformations diagénétiques de l'os fossile s'avère donc nécessaire aussi bien en contexte paléologique qu'archéologique.

Sur le plan isotopique, la diagénèse affecte différemment la composition isotopique en oxygène des groupements carbonates et phosphates. En conditions inorganiques abiotiques, les échanges isotopiques entre le carbonate et l'eau sont plus rapides que pour les groupements phosphates en raison de la résistance des liaisons P-O à l'hydrolyse en conditions inorganiques et à basse température (Kolodny et al. 1983) et le $\delta^{18}\text{O}$ des phosphates paraît préservé (Zazzo et al. 2004a). En revanche sous contrôle microbien la cinétique d'échange isotopique est plus grande entre le phosphate et l'eau qu'entre le carbonate et l'eau (Zazzo et al. 2004a). En effet, l'activité microbiologique dégrade non seulement la matière organique mais également les phosphates, ce qui peut s'accompagner d'échanges isotopiques significatifs (Blake et al. 1997).

Divers tests diagénétiques, exposés en détail par Kohn et Cerling (2002), sont couramment employés pour évaluer la préservation des compositions isotopiques des bioapatites fossiles. Ils reposent essentiellement sur des comparaisons, entre les compositions isotopiques des différents tissus d'un même individu (un écart entre les compositions de l'émail et de l'os/dentine supérieur à celui attendu chez un homologue actuel étant interprété comme une altération de l'os/dentine), ou encore entre les $\delta^{18}\text{O}_{\text{phosphate}}$ et $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonate}}$ d'un même échantillon (les carbonates et phosphates étant supposés précipiter à l'équilibre avec l'eau corporelle, la relation entre $\delta^{18}\text{O}_{\text{phosphate}}$ et $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonate}}$ doit être linéaire, les déviations sont alors interprétées comme une altération de la composition isotopique de l'une ou des deux composantes (Iacumin et al. 1996)).

Sur le plan minéralogique, l'évaluation de l'altération diagénétique d'un reste de vertébré fossile repose principalement sur les indices de cristallinité définis de façon empirique à partir de la diffraction des rayons X (Person et al. 1995), des spectroscopies vibrationnelles infrarouge (Shemesh 1990, Weiner et Bar-Yosef 1990) et Raman (Pucéat et al. 2004). Cependant ces indices dépendent de la technique analytique utilisée (Surovell et Stinner 2001, Nakano et al. 2002) et donnent des informations moyennées sur l'ensemble de l'échantillon sans distinguer les phases minoritaires (Reiche et al. 2002). Ils peuvent également refléter différemment l'hétérogénéité naturelle des bioapatites. Ainsi la spectroscopie infrarouge serait plus sensible à une faible modification de la cristallinité alors que la diffraction des rayons X ou la spectroscopie Raman le seraient pour une cristallinité plus élevée (Pucéat et al. 2004). Ceci explique l'absence de corrélation explicite entre indices de cristallinité et incorporation

d'éléments traces ou modification du signal isotopique (Pucéat et al. 2004, Trueman et al. 2008). Enfin, il est possible que si le processus de dissolution-recristallisation est suffisamment rapide, l'augmentation de cristallinité puisse « verrouiller » le signal isotopique biogénique et ainsi le préserver (Lee-Thorp et Sponheimer, 2003).

Les indices de cristallinité renseignent donc sur l'évolution minéralogique générale de l'apatite mais ne sauraient à eux seuls être suffisants pour diagnostiquer une préservation ou altération de la composition chimique et isotopique des bioapatites au cours de la fossilisation.

1.4.3 Questions ouvertes et enjeux

Malgré les nombreuses études réalisées au cours de la dernière vingtaine d'années sur la diagénèse des tissus biominéralisés, un certain nombre de questions restent ouvertes. Tout d'abord il reste à identifier précisément les transformations cristallographiques ayant lieu à l'échelle atomique, notamment concernant l'environnement des groupements carbonates. Le lien entre la nature des transformations impliquées et les caractéristiques physico-chimiques du milieu de fossilisation semble déterminant mais appelle à être spécifié, tout comme les conséquences exactes de ces transformations sur la préservation des informations géochimiques, et a fortiori sur les reconstructions qui en découlent. De façon générale il s'agit donc de déterminer de façon plus précise le lien entre transformations à l'échelle atomique et modification de la composition isotopique, ce qui peut être envisagé en combinant des approches spectroscopiques à la détermination des propriétés de fractionnement isotopique de l'apatite.

D'un point de vue analytique, une limite importante concerne l'interprétation souvent empirique des spectres obtenus par le biais des techniques spectroscopiques communément utilisées pour décrire les bioapatites, telle que la spectroscopie infrarouge, d'où la nécessité d'affiner les analyses spectrales, notamment en combinant l'expérience à des approches théoriques. Il s'agit donc de développer une approche plus quantitative permettant d'aller au-delà des indices de cristallinité empiriques. Une difficulté supplémentaire est liée à la nature composite et très hiérarchisée de l'os, l'interaction organique-minéral aux différentes échelles étant encore mal comprise. Ainsi, aux incertitudes relatives à sa transformation dans les environnements géologiques s'ajoutent les lacunes de notre connaissance du matériau biologique initial.

Chapitre 2 : Méthodes

Le travail effectué dans cette thèse repose sur la combinaison d'approches expérimentales et théoriques.

L'approche expérimentale est basée sur l'utilisation d'un ensemble de techniques de spectroscopies permettant de sonder la matière à l'échelle atomique, parmi lesquelles la spectroscopie infrarouge et la résonance magnétique nucléaire à l'état solide sont centrales. La spectroscopie infrarouge sonde les modes vibrationnels des molécules et des cristaux, apportant ainsi une information sur la nature des liaisons chimiques impliquées. La RMN quant à elle, explore les noyaux atomiques présentant un spin nucléaire et permet de sonder leur environnement chimique. Le principe et la mise en œuvre pratique de ces deux techniques sont développés dans les sections 2.1 et 2.2. Par ailleurs, d'autres techniques expérimentales couramment employées pour l'étude des minéraux ont permis d'apporter des informations complémentaires : la micro-spectrométrie Raman (Nasdala et al. 2004), la diffraction des rayons X (DRX) (Bish and Post, 1989), la spectroscopie de masse pour la mesure des compositions isotopiques (de Groot 2004) ainsi que la microscopie électronique à balayage (MEB) (Fleger et al. 1993). Les principes de ces méthodes sont décrits en détail dans les références indiquées ci-dessus et ne seront pas développés dans ce manuscrit.

La seconde approche est théorique et repose d'une part sur la modélisation des spectres infrarouge dont le principe est évoqué en section 2.1 et sera détaillé dans le Chapitre 4, et d'autre part sur le calcul des propriétés de fractionnement isotopique à l'équilibre de l'apatite via la modélisation *ab initio* des structures cristallines et le calcul de leurs propriétés vibrationnelles et électroniques. Ces simulations sont réalisées à l'aide de codes de calcul quantique dont les principes généraux sont exposés dans la section 2.3, après un rappel des principes de la théorie du fractionnement isotopique à l'équilibre.

2.1 Spectroscopie infrarouge

Les spectroscopies vibrationnelles (infrarouge et Raman) sont très largement employées pour l'étude qualitative et quantitative des minéraux car elles sont d'acquisition rapide, non destructives et relativement aisées à mettre en œuvre.

Par rapport à la spectroscopie Raman, la spectroscopie infrarouge présente l'avantage d'être à la fois moins sensible à la fluorescence de la composante organique des échantillons d'os et plus sensible à la présence d'impuretés moléculaires en faible concentration tels que les carbonates structuraux des bioapatites. C'est donc principalement la spectroscopie infrarouge qui a été employée dans le cadre de cette thèse, la spectroscopie Raman étant utilisée plus ponctuellement et de façon complémentaire.

La spectroscopie infrarouge est devenue une technique standard des laboratoires, aussi bien en minéralogie qu'en chimie organique, depuis l'avènement des spectromètres infrarouges à transformée de Fourier, rendu possible par le développement des micro-ordinateurs dans les années 60. L'exploitation systématique des spectres IR pour corréler fréquences des bandes IR et composition chimique est usuelle cependant l'analyse fine et approfondie des spectres est plus rare. Tout particulièrement, l'utilisation plus récente et grandissante du dispositif de réflectance totale atténuée (ATR) en lieu et place de la transmission pour effectuer des mesures de type absorption, appelle à une compréhension approfondie des phénomènes physiques mis en jeu pour améliorer l'interprétation des spectres ATR-FTIR.

2.1.1 Généralités

Dans une vision classique, les mouvements de vibration des atomes dans un cristal peuvent être considérés comme ceux de sphères de masse différentes (atomes) reliées par des ressorts (liaisons chimiques). Ainsi un cristal de N atomes peut être vu comme un ensemble de 3N oscillateurs harmoniques. Lorsque le cristal est soumis à un rayonnement infrarouge, les modes dont la fréquence propre coïncide avec la fréquence de radiation entrent alors en résonance ce qui se traduit par l'absorption du rayonnement IR. La spectroscopie infrarouge permet ainsi de sonder les modes de vibration du solide et de remonter à la nature des liaisons chimiques impliquées.

Comme son nom l'indique, le domaine de l'infrarouge dans le spectre électromagnétique correspond aux fréquences juste inférieures à la lumière visible émettant dans le rouge et supérieures aux fréquences micro-ondes (Fig 2.1). Trois régions peuvent être définies dans le domaine infrarouge, nommées en relation avec le spectre visible : infrarouge proche, moyen et lointain. Dans ce travail, seule la spectroscopie dans l'infrarouge moyen, qui correspond à la zone principale des vibrations dans les cristaux, a été utilisée.

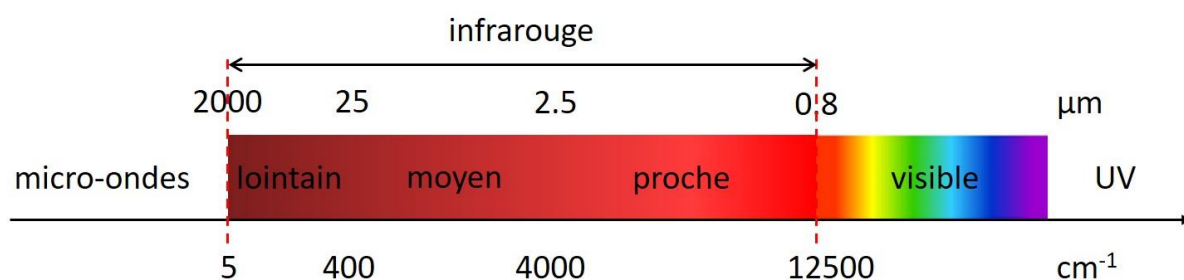


Figure 2.1 - Gamme des fréquences infrarouge dans le spectre électromagnétique

Parmi les nombreuses références de la littérature traitant de la théorie et des applications possibles de la spectroscopie infrarouge, les ouvrages de Farmer (1974) et McMillan et Hofmeister (1988) constituent des références détaillées, adaptées aux études de cristaux et minéraux. Quelques bases théoriques de la spectroscopie infrarouge sont ici fournies afin

notamment d'éclairer la problématique de la modélisation des spectres, abordée dans le Chapitre 4 ainsi que celle du calcul des propriétés vibrationnelles d'un cristal, abordée dans la section 2.3.

2.1.2 Mouvement de particules dans un réseau

Dans un cristal, les vibrations des atomes autour de leur position d'équilibre peuvent être décrites quantitativement à l'aide des équations du mouvement. La position d'un atome k dans un cristal est définie par le vecteur \vec{R}_{ak} :

$$\vec{R}_{ak} = \vec{R}_a + \vec{R}_k + \vec{u}_{ak} \quad (2.1)$$

où \vec{R}_a est le vecteur mode de réseau correspondant à la maille a , \vec{R}_k correspond aux coordonnées réduites de l'atome k dans la maille et \vec{u}_{ak} correspond à son déplacement par rapport à la position d'équilibre (Figure 2.2). La force qui s'applique sur cet atome selon la direction α du repère cartésien correspond à la dérivée de l'énergie potentielle du système, E_{pot} , par rapport à sa position atomique :

$$F_{ak\alpha} = -\frac{\partial E_{pot}}{\partial R_{ak\alpha}} \quad (2.2)$$

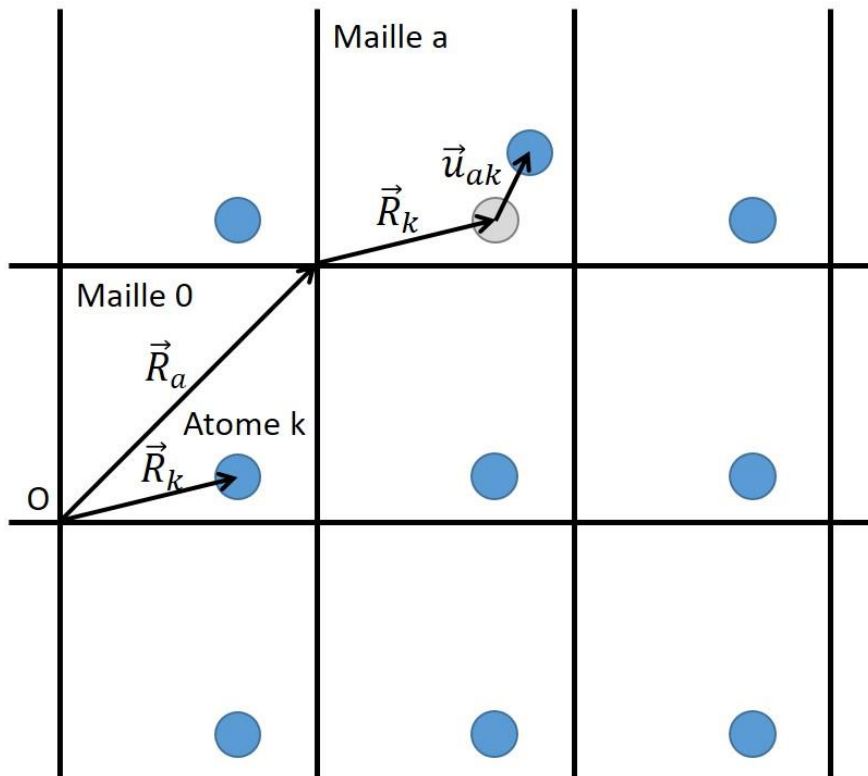


Figure 2.2 – Déplacement d'un atome k de la maille a par rapport à sa position d'équilibre au sein d'une structure cristalline périodique

Par définition, lorsque les atomes sont dans leur position d'équilibre, l'énergie potentielle est minimale et les forces exercées sur les atomes sont alors nulles. Si les déplacements atomiques sont faibles autour de la position d'équilibre, l'énergie potentielle d'un système de N atomes en fonction des positions atomiques peut alors être développée en série de Taylor :

$$E_{pot} = \sum_{ak\alpha} \left(\frac{\partial E_{pot}}{\partial R_{ak\alpha}} \right)_0 u_{ak\alpha} + \frac{1}{2} \sum_{ak\alpha} \sum_{bk'\beta} \left(\frac{\partial^2 E_{pot}}{\partial R_{ak\alpha} \partial R_{bk'\beta}} \right)_0 u_{ak\alpha} u_{bk'\beta} + \dots \quad (2.3)$$

où les indices a, b couvrent les mailles du cristal, k, k' font référence aux différents atomes au sein de la maille et α, β, γ couvrent les trois directions de l'espace. Le minimum de l'énergie potentielle est ici pris égal à zéro et les dérivées partielles de l'énergie sont calculées à la position d'équilibre. Les termes du développement au premier ordre, correspondant à la dérivée première de l'énergie en $\vec{u}_{ak} = \vec{0}$, sont donc nuls. Les termes du second ordre correspondent à l'ensemble des constantes de force du système et constituent les coefficients de la matrice des constantes de force :

$$C_{k\alpha, k'\beta}(a, b) = \left(\frac{\partial^2 E_{pot}}{\partial u_{ak\alpha} \partial u_{bk'\beta}} \right)_0 \quad (2.4)$$

L'approximation harmonique consiste à négliger tous les termes d'ordre supérieur à 2, ce qui est valable lorsque les déplacements atomiques restent faibles. En général, la prise en compte de l'anharmonicité (dérivées d'ordre 3 et 4) ne devient nécessaire que pour décrire certaines propriétés comme la dilatation thermique ou les couplages entre phonons (e.g. bandes de combinaison en proche IR). Dans cette approximation l'énergie s'exprime alors ainsi :

$$E_{pot}^{harm} = \frac{1}{2} \sum_{ak\alpha} \sum_{bk'\beta} C_{k\alpha, k'\beta}(a, b) u_{ak\alpha} u_{bk'\beta} \quad (2.5)$$

En combinant les équations (2.2) et (2.5), il en résulte que la force de rappel ressentie par un atome k de la maille a lorsqu'il est déplacé de sa position d'équilibre dans la direction α est :

$$F_{ak\alpha} = - \sum_{bk'\beta} C_{k\alpha, k'\beta}(a, b) u_{bk'\beta} \quad (2.6)$$

L'application de l'équation du mouvement selon la seconde loi de Newton donne alors lieu à un système d'équations différentielles couplées reliant l'accélération de l'atome k dans la maille a selon la direction α au déplacement de l'atome k' dans la maille b selon la direction β :

$$M_k \frac{\partial^2 u_{ak\alpha}(t)}{\partial t^2} = - \sum_{bk'\beta} C_{k\alpha, k'\beta}(a, b) u_{bk'\beta}(t) \quad (2.7)$$

Ainsi pour un cristal de N atomes oscillant dans les 3 directions de l'espace on obtient un système de $3N$ équations différentielles couplées.

Les déplacements atomiques solutions de ces équations différentielles (2.7) sont de la forme :

$$u_{ak\alpha}(t) = \eta_{k\alpha} e^{i\mathbf{q}\mathbf{R}_a} e^{-i\omega t} \quad (2.8)$$

où $\eta_{k\alpha}$ est le vecteur de polarisation décrivant l'amplitude du déplacement de l'atome k selon la direction α , \mathbf{q} est le vecteur d'onde dans la zone de Brillouin de l'espace réciproque et ω la fréquence traduisant la périodicité temporelle.

Du fait de la périodicité du réseau dans le cas d'un solide cristallin, le système est invariant par translation et la matrice des constantes de forces interatomiques ne dépend que des positions relatives des mailles a et b. En injectant l'équation 2.8 dans l'équation 2.7 et en tenant compte de l'invariance par translation, il est donc possible de réécrire le système d'équations différentielles de la façon suivante :

$$M_k \eta_{k\alpha} \omega^2 = \sum_{k'\beta} \eta_{k'\beta} \tilde{C}_{k\alpha, k'\beta}(\mathbf{q}) \quad (2.9)$$

où $\tilde{C}_{k\alpha, k'\beta}(\mathbf{q})$ est la transformée de Fourier discrétisée de la matrice des constantes de force :

$$\tilde{C}_{k\alpha, k'\beta}(\mathbf{q}) = \sum_b C_{k\alpha, k'\beta}(0, b) e^{i\mathbf{q}\mathbf{R}_b} \quad (2.10)$$

la somme étant réalisée sur les vecteurs du réseau de Bravais.

Afin de résoudre le système d'équations (2.9), il est nécessaire de rendre ces équations indépendantes. Pour cela on peut effectuer un changement de base vers la base de vecteurs propres $\gamma_{k\alpha} = \sqrt{M_k} \eta_{k\alpha}$ formant une base orthonormée.

Il est alors possible de réécrire les équations du mouvement sous la forme d'un système de 3N équations différentielles découplées décrivant l'évolution de 3N oscillateurs harmoniques indépendants :

$$\gamma_{k\alpha} \omega^2 = \sum_{k'\beta} \gamma_{k'\beta} \tilde{D}_{k\alpha, k'\beta}(\mathbf{q}) \quad (2.11)$$

où $\tilde{D}_{k\alpha, k'\beta}(\mathbf{q})$ est la transformée de Fourier de la matrice des constantes de forces pondérée par les masses des atomes, également appelée matrice dynamique.

$$\tilde{D}_{k\alpha, k'\beta}(\mathbf{q}) = \frac{\tilde{C}_{k\alpha, k'\beta}(\mathbf{q})}{\sqrt{M_k} \sqrt{M_{k'}}} \quad (2.12)$$

Les modes de vibrations solutions de l'équation 2.11 sont alors obtenus en diagonalisant cette matrice. Les fréquences vibrationnelles dépendent donc du vecteur \mathbf{q} . Pour décrire l'ensemble des mouvements atomiques dans le cristal il faut établir les courbes de dispersion traduisant la distribution des fréquences de vibrations en fonction des vecteurs \mathbf{q} . Lorsque $\mathbf{q} = \vec{0}$, ce qui

correspond au centre de la zone de Brillouin (point Γ), tous les atomes vibrent en phase. Il s'agit des modes de vibration sondés par les spectroscopies infrarouge et Raman. Parmi les $3N$ oscillateurs indépendants, 3 modes, dits acoustiques, sont caractérisés par une fréquence nulle et correspondent aux mouvements de translation d'ensemble selon les 3 directions de l'espace. Les $3N-3$ autres modes, dont la fréquence est non nulle, correspondent aux modes optiques. Pour les cristaux comportant des ions moléculaires dans leur structure (par exemple les groupements phosphate et carbonate dans l'apatite), les vibrations propres à ces groupements peuvent être rapportées à celles de la molécule isolée (Lazarev 1974). Les déformations au sein de ces groupements (modes internes), peu influencées par le cristal mais couplées aux autres groupements équivalents, permettent de sonder le désordre structural du cristal étudié. Ces modes internes, encore appelés modes durs, sont observés en général à des fréquences plus élevées que les modes externes correspondant quant à eux à des mouvements (rotationnels ou translationnels) d'ensemble de ces groupements vis-à-vis du réseau cristallin.

Les modes internes de vibration sont classés en fonction de la déformation induite du groupe d'atomes impliqués. Ainsi l'on distingue les modes d'élongation (stretching) associés à une variation des longueurs de liaison, des modes de cisaillement (bending) associés à une variation de l'angle entre deux liaisons. Les principaux modes de vibration du groupement PO_4 sont représentés dans la figure 2.3. L'ouvrage de Farmer (1974) propose un classement détaillé des différents types de modes en lien avec leurs propriétés de transformation sous les opérations de symétrie du cristal (via la théorie des groupes). En pratique les fréquences vibrationnelles dans les cristaux sont exprimées en nombre d'onde (cm^{-1}) et globalement comprises entre 100 et 4000 cm^{-1} .

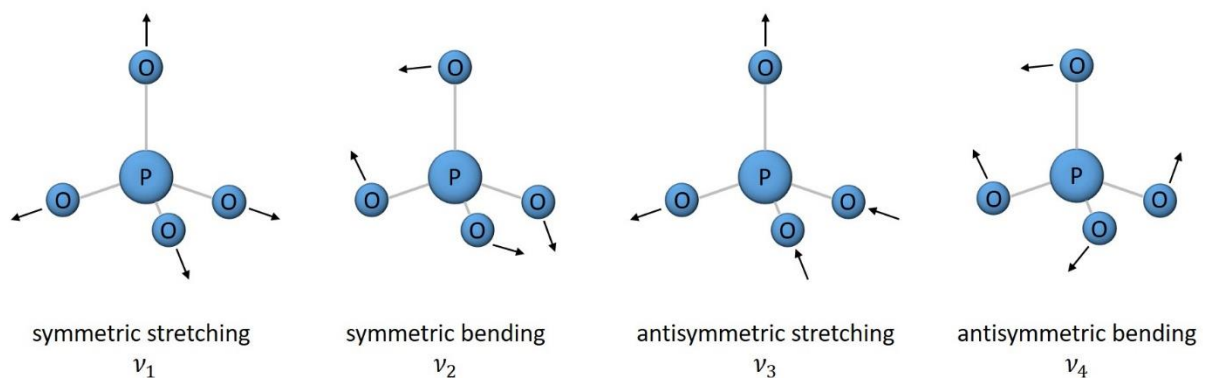


Figure 2.3 - Modes de vibration du tétraèdre PO_4

2.1.3 Interaction rayonnement infrarouge - cristal

L'interaction entre un champ électrique $\mathbf{E}(\omega)$ oscillant dans la gamme de fréquences infrarouges et un cristal induit une polarisation macroscopique $\mathbf{P}(\omega)$ dans le matériau, du fait du déplacement des particules chargées autour de leur position d'équilibre. Cette polarisation induite comporte deux contributions : une contribution électronique correspondant à la polarisation de la densité électronique, les atomes étant maintenus à leur position d'équilibre et une contribution ionique qui correspond à la polarisation induite par les déplacements atomiques. Dans la gamme des fréquences infrarouges, loin de la zone des fréquences impliquées dans les excitations électroniques, la contribution électronique peut être considérée comme indépendante de la fréquence. La contribution ionique dépend en revanche fortement de la fréquence IR et se manifeste par des résonances centrées sur les modes de vibration. La polarisation induite dans le milieu est proportionnelle au champ électrique appliqué :

$$4\pi\mathbf{P}(\omega) = (\varepsilon(\omega) - 1)\mathbf{E}(\omega) \quad (2.13)$$

où $\varepsilon(\omega)$ est le tenseur diélectrique du milieu. Les coefficients du tenseur diélectrique d'un cristal sont donnés par (Gonze et Lee, 1997) :

$$\varepsilon_{\alpha\beta}(\omega) = \varepsilon_{\alpha\beta}(\infty) + \frac{4\pi}{\Omega} \sum_m \frac{S_{m,\alpha\beta}}{\omega_m^2 - \omega^2 - i\omega\Gamma} \quad (2.14)$$

où Ω est le volume de la maille, ω_m la pulsation du mode m , et Γ le paramètre d'amortissement qui décrit la largeur intrinsèque des bandes infrarouge. Cet élargissement homogène est lié au temps de vie fini des états excités et conduit à une forme Lorentzienne des bandes (Salje et al. 2000). D'autres sources d'élargissement, de nature inhomogène, peuvent toutefois apporter un caractère gaussien à la forme de raie. Ces effets proviennent des contraintes liées notamment à la présence de défauts dans la structure, qui entraînent une distribution des fréquences vibrationnelles. $S_{m\alpha\beta}$ est la force d'oscillateur définie par

$$S_{m,\alpha\beta} = \left(\sum_{k,\alpha'} Z_{k,\alpha\alpha'}^* u_{m,k\alpha'} \right) \left(\sum_{k,\beta'} Z_{k,\beta\beta'}^* u_{m,k\beta'} \right) \quad (2.15)$$

où $u_{m,k\alpha'}$ correspond au déplacement de l'atome k dans le mode m selon la direction α' et $Z_{k,\alpha\alpha'}^*$ est le coefficient du tenseur des charges efficaces de l'atome k . Les tenseurs des charges effectives de Born (Born et Huang, 1954), définis au centre de la zone de Brillouin, décrivent la relation entre le déplacement d'un atome k selon la direction α et la polarisation de la maille selon la direction α :

$$Z_{k,\alpha\beta}^* = \frac{\Omega}{e} \frac{\partial P_\alpha}{\partial u_{m,k\alpha}} \quad (2.16)$$

où e est la charge électronique.

Les propriétés diélectriques macroscopiques d'un solide cristallin sont décrites par son tenseur diélectrique $\epsilon(\omega)$ et peuvent donc en principe être obtenues à partir de paramètres microscopiques uniquement. Cependant la fonction diélectrique effective du matériau dépend également de paramètres macroscopiques, tels que la forme et taille des particules et la porosité.

2.1.4 Réflectance totale atténuée

Diverses géométries expérimentales peuvent être utilisées pour enregistrer un spectre infrarouge. Le signal mesuré peut correspondre à l'intensité du signal transmise ou réfléchi. Les spectres infrarouges des échantillons en poudre ont longtemps été obtenus en mesurant le signal transmis par une pastille constituée de poudre diluée en faibles proportions dans une matrice non-absorbante en IR (généralement du KBr). Cependant une variabilité des paramètres mesurés a été observée en fonction des méthodes de préparation de l'échantillon, affectant la reproductibilité des mesures et les comparaisons inter-laboratoires (Surovell et Stiner 2001). Plus récemment, la spectroscopie infrarouge en réflectance totale atténuée (ATR) s'est développée comme une alternative attrayante à la transmission, permettant d'enregistrer un spectre de la poudre pure. Dans cette géométrie en réflexion, le faisceau infrarouge est envoyé avec un angle de 45° à l'interface entre le cristal ATR, c'est-à-dire un matériau hautement réfractif tel que du diamant ($n = 2.4$) ou du germanium ($n = 4$), et l'échantillon en poudre compacté à la surface du cristal (Figure 2.4). Il est alors possible d'acquérir très facilement un spectre infrarouge de type absorption tout en évitant l'étape de préparation des pastilles nécessaires lors de mesures en transmission. Ceci permet de s'affranchir des effets liés à l'étape de dilution et confère une meilleure reproductibilité aux mesures. De plus, il s'agit dans de nombreux cas (échantillons de valeur en faibles quantités, par exemple) de l'unique façon d'acquérir un spectre infrarouge de l'échantillon donné.

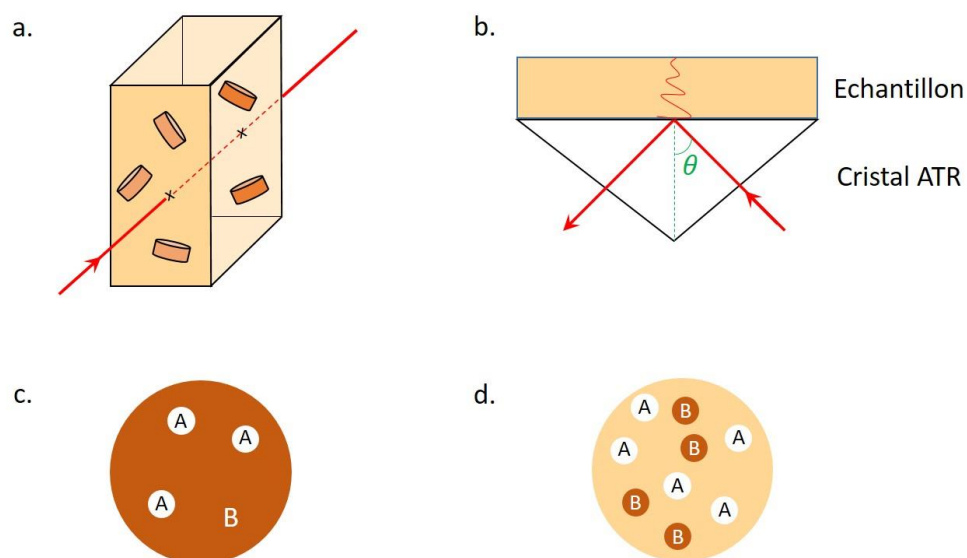


Figure 2.4 - Schéma des géométries en transmission (a) et ATR (b). Représentation schématique des modèles de milieu effectif de Maxwell Garnett (c) et Bruggeman (d) pour un échantillon composite constitué de deux constituants, A et B.

Ainsi, si l'on s'intéresse à une même substance, par exemple l'apatite, non seulement la géométrie ATR diffère de la transmission, mais l'échantillon considéré est également différent. En transmission les particules d'apatite sont dispersées dans une matrice de KBr. En revanche, en géométrie ATR, l'échantillon est en fait un composite de deux constituants : de l'apatite pure et de l'air, dont le ratio dépend de la porosité. Si l'on connaît la fonction diélectrique effective de l'échantillon composite il est alors possible de modéliser le spectre infrarouge en calculant le coefficient d'absorption ou de réflexion, selon la géométrie de l'expérience. Plusieurs modèles proposent une expression de la fonction diélectrique effective d'un matériau composite à partir des propriétés de ses constituants (par exemple Sihvola and Kong 1988, Spanier and Herman 2000, Kendrick and Burnett, 2016) dans une approche quasi-statique. L'un des modèles, celui de Maxwell-Garnett (Garnett, 1904), considère les particules d'un constituant A dispersées dans un milieu homogène de l'autre constituant B (Figure 2.4c) et est souvent utilisé efficacement pour modéliser les spectres infrarouges en transmission (Balan et al., 2002). Cependant pour des échantillons de composition arbitraire où les particules ne peuvent pas être considérées comme isolées, il est nécessaire de considérer d'autres modèles de milieu effectif, comme celui de Bruggeman (1935), qui considère des particules des deux constituants A et B ancrées dans un milieu effectif (Figure 2.4d). Les caractéristiques de ces deux modèles, ainsi que leur capacité à reproduire correctement les propriétés et la forme des bandes ATR d'échantillons d'apatite en poudre, sont discutées plus en détail dans le Chapitre 4.

Si la taille des particules est inférieure à la longueur d'onde infrarouge, ce qui est en général le cas dans l'infrarouge moyen où $\lambda_{IR} > 10 \mu m$, la dispersion de l'onde IR dans les particules peut être négligée. L'absorption infrarouge dépend alors du champ électrique à l'intérieur de la particule. Le champ électrique interne à la particule diffère du champ électrique externe du fait de la polarisation de la particule, celle-ci se comportant comme un condensateur. En effet, les mouvements oscillatoires des atomes autour de leur position d'équilibre conduisent à une accumulation de charges à la surface de la particule (Figure 2.5). Ceci donne lieu à un champ électrique macroscopique qui s'oppose à leur déplacement. Cette contribution s'ajoute à celles des forces de rappel microscopiques (Eq 2.6), ce qui augmente les fréquences des bandes IR. Ces effets d'origine électrostatique donnent lieu à un élargissement comparable à celui dû au splitting LO-TO. Les fréquences vibrationnelles sont alors distribuées entre les fréquences transverses et longitudinales. Le champ électrique interne aux particules et a fortiori les spectres d'absorption infrarouge de poudres dépendent donc de la morphologie des particules.

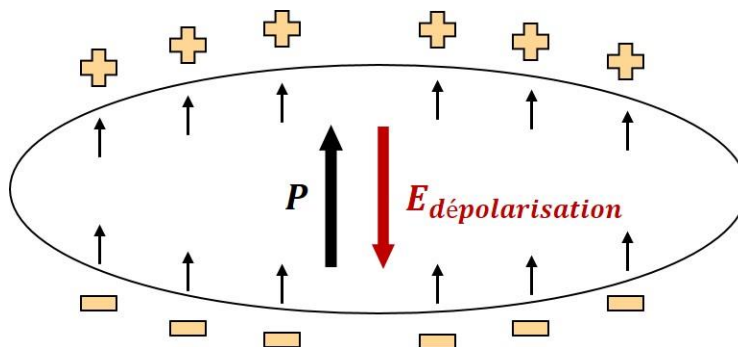


Figure 2.5 – Dépendance du champ électrique interne à la forme des particules

2.1.5 Dispositif expérimental

Le spectromètre infrarouge à transformée de Fourier est constitué de 3 éléments principaux : une source infrarouge, un interféromètre et un détecteur (Figure 2.6). A ceci s'ajoute l'accessoire ATR et son cristal sur lequel est placé l'échantillon.

Différents types de source infrarouge peuvent être utilisés selon la gamme de fréquence souhaitée. L'émission d'un tube en carbure de silicium chauffé est typiquement employée comme source pour l'infrarouge moyen. Dans le cas de mesures en infrarouge lointain il s'agit de l'émission par une lampe à arc de mercure sous haute pression, alors que des ampoules halogènes (tungstène ou quartz) sont utilisées comme source pour le proche infrarouge.

Le rayonnement infrarouge émis par la source passe ensuite par un interféromètre de Michelson. Celui-ci comporte une lame séparatrice (semi-réfléchissante) ainsi que deux miroirs plans, l'un fixe et l'autre mobile. Le faisceau infrarouge incident est divisé en deux par la lame séparatrice, l'un des faisceaux est réfléchi vers le miroir fixe et le second est transmis vers le miroir mobile. Après réflexion sur leur miroir respectif, les deux faisceaux sont recombinaés au niveau de la lame séparatrice et en émergent en interférant. Le miroir mobile pouvant se déplacer, la différence de marche entre les deux faisceaux est contrôlée. Lorsque les deux miroirs sont à égale distance de la séparatrice, les deux faisceaux suivent des chemins optiques identiques et émergent en phase, alors que lorsque le miroir mobile est translaté, les deux faisceaux sont déphasés et la recombinaison est destructive. Le faisceau résultant de l'interférence traverse ensuite l'échantillon où il est en partie absorbé et en partie transmis puis détecté.

L'intensité du faisceau transmis au détecteur en fonction du temps et de la position du miroir mobile x est un interférogramme dont l'expression est :

$$I(x) = \frac{1}{2}I(0) + \int_0^{\infty} S(\bar{\nu}) \cos(2\pi\bar{\nu}x) d\bar{\nu} \quad (2.17)$$

où $I(0)$ est l'intensité lorsque la différence de marche est nulle et S l'intensité spectrale au nombre d'onde $\bar{\nu}$ (Bruesch, 1986). Celle-ci dépend donc de la position du miroir mobile :

$$S(\bar{\nu}) = 4 \int_0^{\infty} \left(I(x) - \frac{1}{2} I(0) \right) \cos(2\pi\bar{\nu}x) dx \quad (2.18)$$

Le spectre infrarouge est ainsi obtenu après transformée de Fourier de l'interférogramme. L'avantage de ce dispositif est de pouvoir obtenir l'intensité simultanément pour l'ensemble des fréquences ce qui conduit à un gain de temps important et permet d'acquérir plusieurs spectres successifs rapidement afin d'augmenter le rapport signal/bruit.

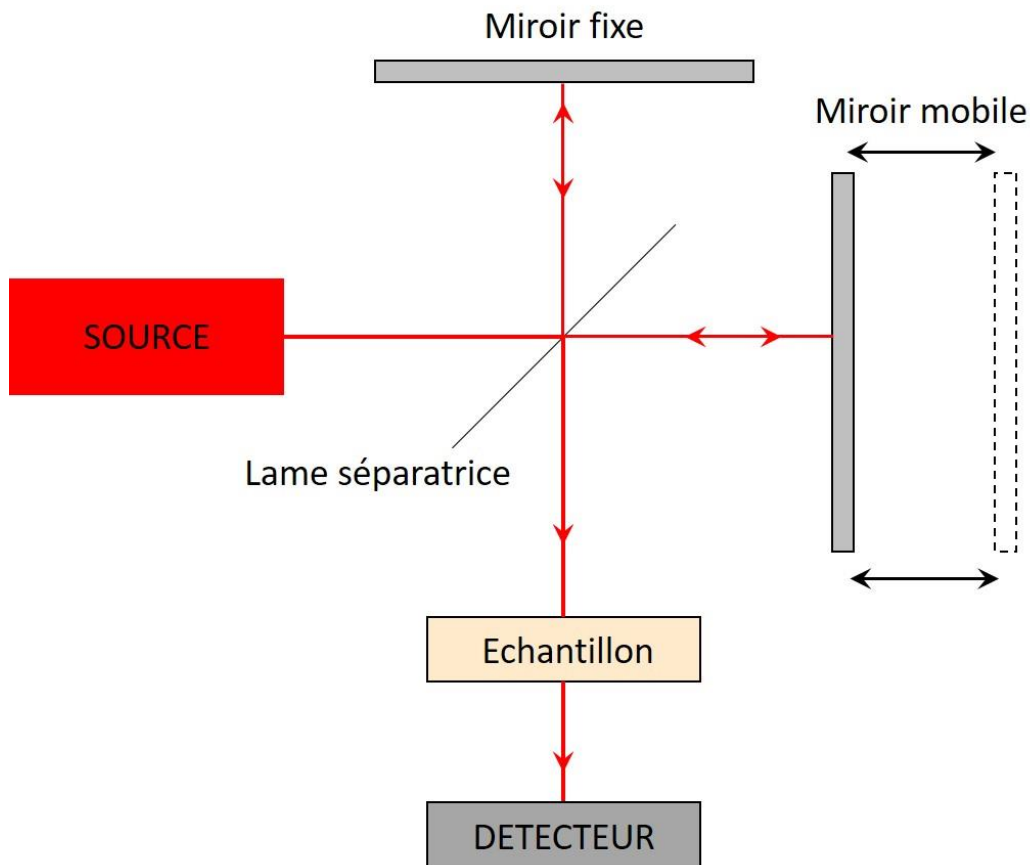


Figure 2.6 - Schéma du principe d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier

En pratique, l'échantillon solide est d'abord réduit en une poudre fine dont quelques milligrammes sont déposés à la surface du cristal ATR (Figure 2.7). Le contact entre la poudre et le cristal est assuré par une pointe permettant de compacter la poudre sur la surface du cristal. Le spectre de l'échantillon est obtenu par soustraction du bruit de fond en faisant le ratio avec un spectre enregistré sans échantillon. Pour chaque échantillon deux spectres sont systématiquement enregistrés, l'un à l'aide d'un cristal germanium et l'autre avec un diamant.



Figure 2.7 - Dispositif expérimental utilisé pour les mesures en ATR : Spectromètre Nicolet 7600 FTIR combiné à un accessoire Quest ATR Specac

2.2 Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La spectroscopie RMN est une technique d'analyse chimiquement sélective permettant de sonder l'environnement local autour d'un élément donné. Depuis sa découverte dans les années 40 par les équipes de F. Bloch et E.M. Purcell, elle trouve de nombreuses applications en science des matériaux, en chimie organique et également dans le cadre de l'imagerie médicale (IRM).

La RMN du solide est une source importante d'informations structurales, obtenues notamment à travers l'analyse des différentes interactions entre noyaux atomiques et de leur anisotropie. En effet, contrairement à la RMN en solution où l'action du mouvement Brownien moyenne l'ensemble des interactions à leurs valeurs isotropes, leur anisotropie va s'exprimer à l'état solide élargissant considérablement les signaux obtenus, pouvant rendre complexe l'interprétation des résultats.

2.2.1 Principe et interactions

La RMN repose sur la propriété intrinsèque à certains noyaux atomiques de posséder un spin nucléaire I . Seuls les noyaux ayant un nombre impair de protons et neutrons ont un spin nucléaire I non nul, par conséquent la spectroscopie RMN est limitée à certains isotopes tels que ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , ^{23}Na , ^{43}Ca ...

Sous l'effet du champ magnétique externe B_0 s'opère une levée de dégénérescence des états de spin en $2I + 1$ niveaux d'énergie, équidistants d'une énergie correspondant à la fréquence de Larmor $\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$, où γ est le rapport gyromagnétique, propre à chaque noyau. Cette interaction est appelée effet Zeeman. Du fait de la statistique de Boltzmann ces niveaux d'énergie ne sont pas identiquement peuplés, ce qui induit l'apparition d'une aimantation macroscopique M_0 parallèle au champ B_0 et de même sens. L'application d'un champ radiofréquence transverse permet ensuite d'effectuer des transitions entre ces niveaux d'énergie. Ce sont ces transitions entre niveaux Zeeman qui sont détectées en RMN.

Sous l'effet d'une impulsion radiofréquence transversale B_1 de même pulsation $\omega_0 = 2\pi\nu_0$ que le champ magnétique B_0 , l'aimantation macroscopique M_0 est basculée dans le plan transverse xy où elle va décrire un mouvement de précession libre visant à la ramener dans sa position d'équilibre (i.e. le long de l'axe z parallèle au champ B_0) par le phénomène de relaxation (Figure 2.8a). Celui-ci se décompose en une composante longitudinale (retour de l'aimantation selon l'axe z) et transverse (disparition de l'aimantation dans le plan xy).

En pratique, la mesure RMN consiste à enregistrer ce mouvement de précession libre et particulièrement la composante opérant dans le plan xy pour obtenir un signal de précession libre (FID pour Free Induction Decay). L'acquisition du FID se fait par l'intermédiaire d'une bobine positionnée dans le plan xy , qui va mesurer le courant induit par ce mouvement de

précession de l'aimantation. Le signal RMN tel qu'il est analysé dans le domaine des fréquences est alors obtenu par transformée de Fourier (TF) du FID (Figure 2.8b).

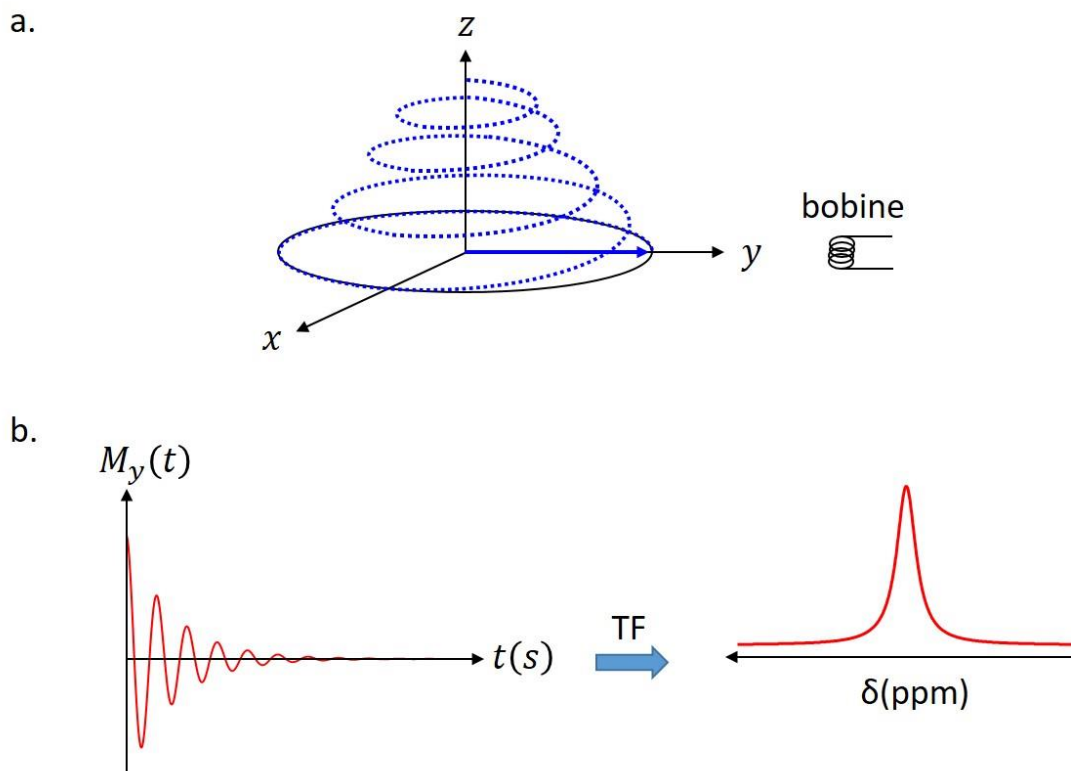


Figure 2.8 – a. Illustration du phénomène de précession libre de l'aimantation suite à son basculement dans le plan xy par une impulsion rf à 90° b. Représentation du FID et du spectre RMN associé obtenu par TF

En réalité la fréquence de résonance n'est pas exactement égale à la fréquence de Larmor du noyau mais dépend de plusieurs perturbations telles que l'écrantage σ , le couplage scalaire J (interaction entre noyaux voisins via les liaisons chimiques, de faible amplitude et difficilement observable en RMN du solide) et les couplages dipolaires D et quadripolaires C_q (observé uniquement pour les noyaux de spin $I > 1/2$).

Ainsi, sous l'effet du champ magnétique B_0 , la densité électronique autour du noyau est polarisée et crée localement un champ magnétique induit noté $B_{ind}(\mathbf{r})$ qui s'oppose au champ B_0 :

$$B_{ind}(\mathbf{r}) = -\sigma(\mathbf{r})B_0 \quad (2.19)$$

où $\sigma(\mathbf{r})$ est le tenseur d'écrantage d'ordre 2 et \mathbf{r} la position du noyau. Le noyau n'est alors plus sous l'influence du champ magnétique B_0 mais d'un champ magnétique effectif $B_{eff}(\mathbf{r})$ et sa fréquence de résonance n'est plus exactement sa fréquence de Larmor ν_0 mais devient

$$\nu(\mathbf{r}) = \gamma B_{eff}(\mathbf{r})/2\pi = (1 - \sigma(\mathbf{r}))\nu_0 \quad (2.20)$$

Du fait de cette interaction, chaque noyau ayant un environnement électronique différent résonne à un déplacement chimique différent exprimé en ppm et défini comme :

$$\delta = \frac{\nu(\mathbf{r}) - \nu_{ref}}{\nu_0} 10^6 \quad (2.21)$$

où ν_{ref} est la fréquence du noyau pour un composé de référence (*i.e.* Triméthylsilane TMS pour ^1H , ^{13}C , NaF pour ^{19}F , NaCl pour ^{23}Na).

De plus en RMN en phase solide, l'échantillon est en poudre ce qui implique une distribution de l'orientation des cristallites. Chacune de ces orientations correspond à un environnement chimique différent, donc à un déplacement chimique différent, c'est ce que l'on appelle l'anisotropie de déplacement chimique (CSA pour Chemical Shift Anisotropy). Le spectre RMN obtenu correspond alors à l'enveloppe de toutes ces orientations (Figure 2.9).

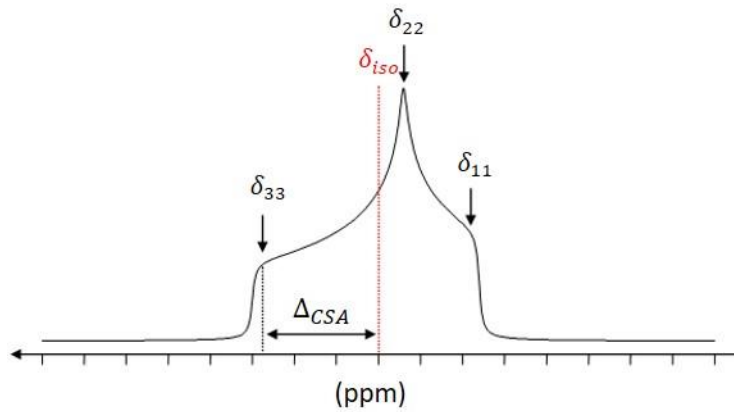


Figure 2.9 - Forme de raie CSA générale ($\eta_{CSA} \neq 0$)

Le CSA est caractérisé par un tenseur d'ordre 2 dont la moyenne des valeurs propres δ_{ii} ($i=1,2,3$) correspond au déplacement chimique isotrope :

$$\delta_{iso} = \frac{1}{3}(\delta_{11} + \delta_{22} + \delta_{33}) \quad (2.22)$$

Cette interaction peut être décrite par deux paramètres : l'anisotropie $\Delta_{CSA} = \delta_{33} - \delta_{iso}$ qui renseigne sur l'élargissement et le paramètre d'asymétrie $\eta_{CSA} = (\delta_{22} - \delta_{11})/(\delta_{33} - \delta_{iso})$ qui indique la forme générale, axiale ou isotrope de la raie CSA.

La seconde interaction majeure en RMN du solide est le couplage dipolaire D qui traduit l'interaction à travers l'espace du dipôle magnétique d'un noyau avec ceux des noyaux voisins. La constante de couplage dipolaire entre deux noyaux est inversement proportionnelle au cube de la distance les séparant, cette interaction renseigne donc sur les distances internucléaires.

2.2.2 Rotation à l'angle magique

Contrairement à la RMN en solution où les interactions sont moyennées à leurs valeurs isotropes par le mouvement Brownien, leur caractère anisotrope s'exprime en RMN du solide. Un développement majeur en RMN du solide vient de la technique de rotation à l'angle magique (MAS pour Magic-Angle Spinning) développée à la fin des années 50 par Andrew et al. (1959) et Lowe (1959). Celle-ci consiste à placer l'échantillon dans un rotor en rotation rapide autour d'un axe faisant un angle très spécifique de $54,74^\circ$ (l'angle magique) avec la direction du champ magnétique statique B_0 comme illustré sur la figure 2.10.

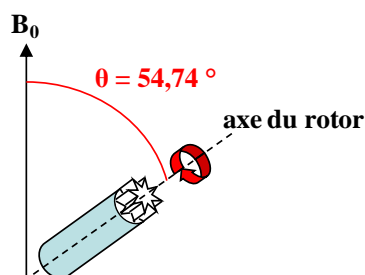


Figure 2.10 – Illustration de la rotation d'un échantillon à l'angle magique

En effet il est possible de montrer que la pulsation de résonance ω d'un noyau soumis aux interactions de déplacement chimique et de couplage dipolaire, toutes deux représentées par des tenseurs de rang 2, s'écrit :

$$\omega = \omega_{iso} + \omega(\alpha, \beta, \gamma)P_2(\cos(\theta)) \quad (2.23)$$

où ω_{iso} et $\omega(\alpha, \beta, \gamma)$ correspondent aux parties isotropes et anisotropes des interactions. La partie anisotrope est seule dépendante de l'orientation des cristallites et est responsable de l'élargissement des signaux en RMN du solide. Elle est modulée par le Polynôme de Legendre d'ordre 2 de l'angle θ entre le champ magnétique B_0 et l'axe de rotation du rotor, dont l'expression est :

$$P_2(\cos(\theta)) = \frac{1}{2}(3 \cos^2(\theta) - 1) \quad (2.24)$$

Celui-ci devient nul pour une valeur précise : $\theta = 54,74^\circ$. Ainsi, dans l'hypothèse d'une fréquence de rotation infinie ou au moins supérieure à l'étendue des interactions en jeu, à un angle θ de $54,74^\circ$ annulant le Polynôme de Legendre d'ordre 2, ces dernières peuvent être moyennées à leurs valeurs isotropes. Dans le cas de l'interaction CSA, si la fréquence de rotation est insuffisante pour la moyenner efficacement, des bandes de rotation espacées de ν_{rot} (la vitesse de rotation du rotor en Hz) sont alors observées de part et d'autre de la raie isotrope (Figure 2.11).

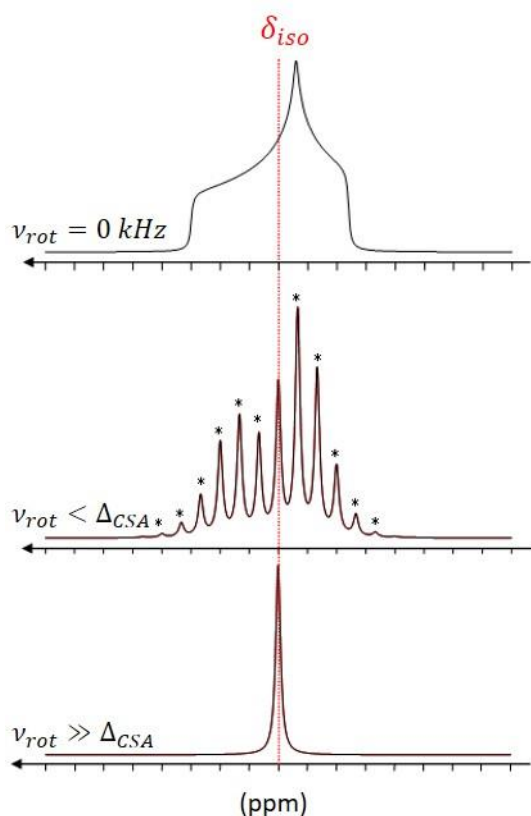


Figure 2.11 – Effet de la vitesse de rotation sur une forme de raie CSA (les bandes de rotation sont indiquées par une astérisque)

2.2.3 Polarisation croisée

Les apatites biologiques contiennent ~5 wt% de carbonates structuraux, porteurs d'informations isotopiques et dont l'environnement peut être modifié suite au processus de fossilisation. Pour sonder l'environnement de ces groupements carbonates il est nécessaire d'utiliser la RMN du carbone 13 dont le spin nucléaire est non nul. Cependant ce noyau souffre d'une très faible sensibilité liée à une abondance naturelle faible (1,08%) associée à un rapport gyromagnétique environ 4 fois inférieur à celui du proton. L'observation de ce noyau en acquisition directe s'avère donc complexe et longue mais peut être améliorée par l'utilisation de séquences particulières telle que la polarisation croisée.

La polarisation croisée (CP pour Cross-Polarization) permet d'améliorer le rapport signal/bruit des spectres RMN de noyaux présentant une faible abondance naturelle. Elle consiste à réaliser un transfert d'aimantation pendant un temps de contact t_{CP} d'un noyau abondant (en général ^1H) vers le noyau rare, ici ^{13}C , par le biais du couplage dipolaire $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (Figure 2.12).

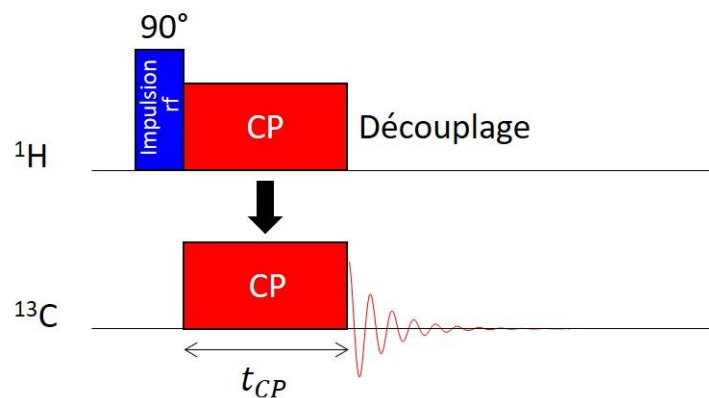


Figure 2.12 – Représentation de la séquence de Polarisation Croisée $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$

Ainsi les spectres RMN ^{13}C enregistrés dans le cadre de cette thèse ont été acquis en Polarisation Croisée lorsque qu’il y avait suffisamment de protons (*ie* les groupement OH des canaux anioniques de l’apatite) dans l’échantillon pour effectuer le transfert d’aimantation, ce qui est le cas dans les os actuels et fossiles peu fluorés.

2.2.4 Noyaux quadripolaires et MQ-MAS

Les noyaux de spin $I > 1/2$ possèdent un moment quadripolaire Q dû à une distribution non sphérique des charges électriques nucléaires. De ce fait, les noyaux quadripolaires sont polarisés par le champ magnétique mais aussi soumis à n’importe quel gradient de champ électrique. Cette interaction moment quadripolaire – gradient de champ électrique est caractérisée par un tenseur de rang 2 et par deux paramètres : la constante de couplage quadripolaire C_q et le paramètre d’asymétrie η_q . Pour un noyau de spin $I = 3/2$, tel que ^{23}Na , cette interaction peut être décrite comme une perturbation de l’interaction Zeeman :

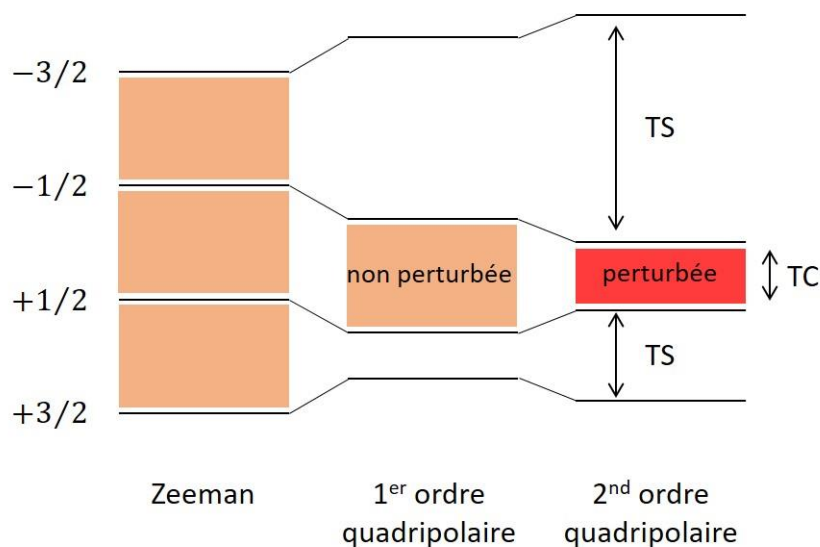


Figure 2.13– Niveaux d’énergie pour un spin $I = 3/2$

L'interaction quadripolaire perturbe les niveaux Zeeman au premier ordre et donne lieu à $2I = 3$ transitions à un quantum, dont les transitions $(3/2 ; 1/2)$ et $(-1/2 ; -3/2)$ sont dites satellites alors que la transition centrale $(1/2 ; -1/2)$ reste non perturbée (Figure 2.13). Au premier ordre, cette interaction peut en principe être moyennée par la rotation à l'angle magique même si elle est en général très supérieure aux fréquences MAS atteintes en pratique : des peignes de bandes de rotation fines correspondant aux transitions satellites sont alors observés.

Au second ordre, en revanche, toutes les transitions sont perturbées. La rotation MAS même à fréquence infinie ne peut réduire que partiellement l'élargissement au second ordre et une forme de raie résiduelle dissymétrique et décalée par rapport à sa valeur isotrope, subsiste. En effet, la pulsation de résonance ω d'un noyau soumis à l'interaction quadripolaire au second ordre (en statique) s'écrit :

$$\omega = \omega_{iso} + \omega_1(\alpha, \beta, \gamma)P_2(\cos(\theta)) + \omega_2(\alpha, \beta, \gamma)P_4(\cos(\theta)) \quad (2.25)$$

Les termes d'élargissement font non seulement intervenir le Polynôme de Legendre d'ordre 2 mais aussi celui d'ordre 4, $P_4(\cos(\theta))$. Celui-ci s'annule pour deux valeurs spécifiques de $\theta = 30,56^\circ$ et $\theta = 70,12^\circ$. Il donc est impossible de trouver un angle θ permettant d'annuler simultanément P_2 et P_4 .

Il est possible de s'affranchir du terme d'ordre 4 grâce à l'expérience MQ-MAS (Multiple Quantum Magic Angle Spinning) proposée par Frydman et al. (1995) qui utilise les transitions multi-quanta accessibles dans le cas d'un noyau quadripolaire et la rotation à l'angle magique. Il s'agit d'une technique à deux dimensions qui vise à moyennner l'interaction quadripolaire sur une dimension et à la corrélérer à un spectre anisotrope de la transition centrale dans l'autre dimension. Ceci permet de conserver l'information quadripolaire tout en augmentant la résolution. De plus, cette expérience permet d'avoir accès à des informations relatives à une éventuelle distribution de déplacements chimiques isotropes et/ou de paramètres quadripolaires.

2.3 Modélisation des propriétés de fractionnement isotopique

Les modélisations *ab initio* permettent de déterminer la structure électronique d'un système dans son état fondamental, correspondant au minimum de l'énergie totale. Le calcul des dérivées de l'énergie du système par rapport à différents paramètres (champs électriques, déplacements atomiques) donne ensuite accès à un certain nombre de propriétés, telles que les propriétés vibrationnelles du matériau. Ces dernières peuvent ensuite être utilisées pour déterminer de façon théorique les propriétés de fractionnement isotopique à l'équilibre de la phase étudiée.

Dans cette section nous rappellerons tout d'abord les bases de la théorie du fractionnement isotopique à l'équilibre et montrerons que le calcul des propriétés isotopiques se ramène au calcul des propriétés vibrationnelles des phases étudiées. Nous verrons ensuite comment le calcul des propriétés vibrationnelles peut être réalisé dans le cadre de la Théorie de la Fonctionnelle de la Densité (DFT).

2.3.1 Théorie du fractionnement isotopique à l'équilibre

Une réaction d'échange isotopique peut se produire lors d'une réaction chimique ou d'une transformation physique telle qu'un changement d'état. Cette réaction au cours de laquelle deux isotopes stables d'un élément, Y et Y' (où Y' correspond à l'isotope léger) sont échangés entre deux phases A et B peut s'écrire



Cet échange donne lieu à un partage des isotopes entre les deux phases, l'une devenant enrichie isotopiquement par rapport à l'autre : ce phénomène est appelé fractionnement isotopique.

Comme pour n'importe quelle réaction chimique, il est possible de déterminer la constante d'équilibre, K_{eq} , à partir des enthalpies libres des réactifs et des produits :

$$K_{eq} = \exp\left(-\frac{\Delta_r G^0}{k_b T}\right) \quad (2.27)$$

où k_b est la constante de Boltzmann, T la température et $\Delta_r G^0$ la variation d'enthalpie libre standard de réaction entre les produits et les réactifs :

$$\Delta_r G^0 = G^0(AY) + G^0(BY') - G^0(AY') - G^0(BY) \quad (2.28)$$

Or l'enthalpie libre est reliée à la fonction de partition Q par la relation

$$G = -k_b T \ln Q. \quad (2.29)$$

Il est donc possible d'exprimer la constante d'équilibre de la réaction d'échange isotopique uniquement en fonction des fonctions de partition des réactifs et des produits :

$$K_{eq} = \frac{Q(AY) \times Q(BY')}{Q(AY') \times Q(BY)} \quad (2.30)$$

De façon générale la fonction de partition canonique pour une molécule est définie comme

$$Q = \sum_n \exp\left(-\frac{E_n}{k_b T}\right) \quad (2.31)$$

où E_n sont les énergies des n états quantiques de la molécule.

Il est possible de calculer la fonction de partition classique en considérant le produit d'intégrales sur les positions et sur les quantités de mouvement des atomes, associées respectivement à l'énergie cinétique et l'énergie potentielle, et tenant compte des orientations possibles de la molécule dans l'espace (Bigeleisen et Mayer, 1947). Or la masse des atomes n'intervient qu'à travers la quantité de mouvement, donc dans les termes d'énergie cinétique, alors que les énergies potentielles sont considérées comme indépendantes de la masse atomique. Il en découle que le rapport des fonctions de partition classiques de deux espèces AY et AY' substituées isotopiquement dépend uniquement de la masse m et m' des deux isotopes :

$$\frac{Q^{cl}(AY)}{Q^{cl}(AY')} = \left(\frac{m}{m'}\right)^{3/2} \quad (2.32)$$

En insérant cette expression dans l'équation (2.30), la constante d'équilibre de la réaction d'échange isotopique est alors égale à 1. La mécanique classique ne prédit donc pas de fractionnement isotopique à l'équilibre, il s'agit en fait d'un phénomène d'origine purement quantique.

La fonction de partition quantique d'une molécule en phase gaz correspond au produit des fonctions de partition translationnelle, rotationnelle, vibrationnelle et électronique. Cependant, les contributions électroniques, translationnelles et rotationnelles au fractionnement isotopique sont en général négligeables ou bien s'annulent dans la suite du calcul du facteur de partage isotopique, à l'exception notamment du fractionnement H-D. Ainsi dans la plupart des cas, seules les vibrations nécessitent un traitement quantique. La fonction de partition vibrationnelle quantique Q_{vib}^q d'un cristal s'exprime ainsi :

$$Q_{vib}^q = \left(\prod_{\{q\}} \prod_{i=1}^{3N} \frac{\exp(-hv_{q,i}/2k_b T)}{1 - \exp(-hv_{q,i}/k_b T)} \right)^{1/N_q} \quad (2.33)$$

où $v_{q,i}$ est la fréquence du mode vibrationnel i dirigé selon le vecteur d'onde q , N correspond au nombre d'atomes dans la maille et N_q le nombre de points q de la grille régulière utilisée pour discrétiser la zone de Brillouin. Pour un solide au centre de la zone de Brillouin, les trois premiers modes sont des modes de translation et le nombre de modes de vibration à considérer

dans l'équation (2.33) est alors $3N - 3$. Les contributions classiques aux fonctions de partition n'intervenant pas dans le fractionnement isotopique, on peut définir une fonction de partition réduite comme le rapport Q^q/Q^{cl} et exprimer ainsi le rapport de fonctions de partitions réduites, aussi appelé facteur β :

$$\beta_{AY} = \frac{Q^q(AY)/Q^{cl}(AY)}{Q^q(AY')/Q^{cl}(AY')} \quad (2.34)$$

Le facteur de fractionnement isotopique, α , associé à la réaction d'échange isotopique (équ. 2.26), est défini comme le rapport des facteurs β :

$$\alpha_{AY-BY} = \frac{\beta_{AY}}{\beta_{BY}} \quad (2.35)$$

La comparaison entre le facteur de fractionnement isotopique calculé et les valeurs expérimentales peut alors se faire directement via l'équation 1.5.

En combinant les équations (2.32), (2.33) et (2.34) l'expression du facteur β pour une seule substitution isotopique devient alors :

$$\beta_{AY} = \left(\frac{m'}{m}\right)^{3/2} \times \left(\prod_{\{q\}} \prod_{i=1}^{3N} \frac{\exp(-hv_{q,i}/2k_bT)}{1 - \exp(-hv_{q,i}/k_bT)} \frac{1 - \exp(-hv'_{q,i}/k_bT)}{\exp(-hv'_{q,i}/2k_bT)} \right)^{1/N_q} \quad (2.36)$$

Il est possible d'utiliser la règle du produit à haute température de Kieffer (1982) qui traduit l'absence de fractionnement isotopique à haute température pour simplifier l'équation 2.36 :

$$\left(\frac{m'}{m}\right)^{3/2} \times \left(\prod_{\{q\}} \prod_{i=1}^{3N} \frac{v'_{q,i}}{v_{q,i}} \right)^{1/N_q} = 1 \quad (2.37)$$

L'expression du facteur β pour une seule substitution isotopique peut alors être réécrite de la façon suivante :

$$\beta_{AY} = \left(\prod_{\{q\}} \prod_{i=1}^{3N} \frac{v_{q,i}}{v'_{q,i}} \frac{\exp(-hv_{q,i}/2k_bT)}{1 - \exp(-hv_{q,i}/k_bT)} \frac{1 - \exp(-hv'_{q,i}/k_bT)}{\exp(-hv'_{q,i}/2k_bT)} \right)^{1/N_q} \quad (2.38)$$

L'équation (2.38) peut ensuite être généralisée pour décrire la substitution de tous les isotopes Y' des N_Y sites qui les accueillent par l'isotope Y :

$$\beta_{AY} = \left(\prod_{\{q\}} \prod_{i=1}^{3N} \frac{v_{q,i}}{v'_{q,i}} \frac{\exp(-hv_{q,i}/2k_bT)}{1 - \exp(-hv_{q,i}/k_bT)} \frac{1 - \exp(-hv'_{q,i}/k_bT)}{\exp(-hv'_{q,i}/2k_bT)} \right)^{1/N_q N_Y} \quad (2.39)$$

Ainsi la détermination des propriétés isotopiques d'une phase cristalline à travers le calcul du facteur β à une température donnée nécessite uniquement les fréquences vibrationnelles des isotopologues considérés.

2.3.2 Calcul des propriétés vibrationnelles harmoniques d'un minéral par méthodes *ab initio*

Comme le montre la section 2.3.1, la détermination théorique des facteurs de fractionnement isotopique à l'équilibre repose sur la variation des fréquences vibrationnelles du système suite à une substitution isotopique. Dans le cadre de cette thèse les fréquences vibrationnelles des phases étudiées ont été calculées via une approche perturbative.

De nombreux ouvrages détaillent les principes des simulations *ab initio* ainsi que les fondements théoriques de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) sur laquelle reposent les calculs effectués dans le cadre de cette thèse. Quelques notions sont brièvement présentées dans cette section.

Les méthodes *ab initio* consistent à calculer l'énergie ainsi que la densité d'état de l'état fondamental d'un système en résolvant l'équation de Schrödinger :

$$\hat{H}|\psi\rangle = E|\psi\rangle \quad (2.40)$$

où E est la valeur propre (énergie) associée au vecteur propre $|\psi\rangle$ de l'Hamiltonien \hat{H} du système d'électrons en interaction dans un potentiel externe. \hat{H} décrit le système total et s'exprime comme la somme d'opérateurs cinétiques \hat{T} et de potentiels d'interaction \hat{V} :

$$\hat{H} = \hat{T}_e(\mathbf{r}) + \hat{T}_n(\mathbf{R}) + \hat{V}_{e,e}(\mathbf{r}) + \hat{V}_{n,n}(\mathbf{R}) + \hat{V}_{e,n}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \quad (2.41)$$

où \mathbf{r} et \mathbf{R} sont les coordonnées électroniques et nucléaires respectivement, $\hat{T}_e(\mathbf{r})$ et $\hat{T}_n(\mathbf{R})$ sont les opérateurs cinétiques respectifs des électrons et noyaux atomiques, $\hat{V}_{e,e}(\mathbf{r})$, $\hat{V}_{n,n}(\mathbf{R})$ et $\hat{V}_{e,n}(\mathbf{r}, \mathbf{R})$ sont les potentiels d'interaction de Coulomb électrons-électrons, noyaux-noyaux, et électrons-noyaux.

L'approximation de Born-Oppenheimer (1927) consiste à découpler les mouvements électroniques des mouvements nucléaires en s'appuyant sur la différence de masse (de l'ordre de 3 ordres de grandeur) entre électrons et noyaux. Le traitement adiabatique des électrons permet de réécrire la fonction d'onde totale, $\psi(\mathbf{r}, \mathbf{R})$, comme le produit d'une fonction d'onde décrivant les noyaux, $\varphi(\mathbf{R})$, et d'une fonction d'onde décrivant les électrons et ne dépendant que de façon paramétrique des positions ioniques, $\psi_R(\mathbf{r})$. L'Hamiltonien total \hat{H} du système peut lui aussi être écrit comme la somme de deux Hamiltonien, \hat{H}_n et \hat{H}_e , où

$$\hat{H}_e = \hat{T}_e(\mathbf{r}) + \hat{V}_{e,e}(\mathbf{r}) + \hat{V}_{n,n}(\mathbf{R}) + \hat{V}_{e,n}(\mathbf{r}, \mathbf{R}). \quad (2.42)$$

Cette approximation permet ainsi de ramener le problème à la résolution de l'équation :

$$\hat{H}_e|\psi_R(\mathbf{r})\rangle = E_e|\psi_R(\mathbf{r})\rangle \quad (2.43)$$

où l'énergie du système, E_e , est fonction des positions des noyaux atomiques.

Toutefois l'équation « électronique » 2.43 reste insoluble analytiquement en raison des interactions à N-corps, sauf pour les hydrogénoïdes (H, He⁺, Li²⁺...) qui n'ont qu'un seul électron. Parmi les méthodes *ab initio* permettant d'obtenir l'énergie de l'état fondamental, c'est la Théorie de la Fonctionnelle de la Densité (DFT) qui a été retenue dans le cadre de cette thèse. La DFT présente un coût computationnel pour les systèmes de taille moyenne semblable à celui des méthodes Hartree-Fock et post-Hartree-Fock qui recherchent directement la fonction d'onde multiélectronique solution de l'équation de Schrödinger. De plus, la DFT délivre des précisions de calcul suffisantes pour les propriétés vibrationnelles (Baroni et al. 2001 ; Lazzeri et Mauri 2003). Enfin, la DFT est particulièrement adaptée pour traiter de solides infinis. Bien que le matériau réel ne soit jamais infini, cela permet de traiter les propriétés locales de façon satisfaisante, notamment la présence de défauts dans les structures cristallines, sous réserve de construire une cellule suffisamment grande pour que les défauts n'interagissent pas avec leur image périodique. Ainsi l'ensemble des calculs effectués pendant la thèse ont été réalisés dans le cadre de la DFT et avec des conditions aux bords périodiques.

Le principe de la DFT consiste à reformuler le problème à N-corps en remplaçant la fonction d'onde multiélectronique (qui dépend de 3N variables) par la densité électronique, qui ne dépend plus que de 3 variables, comme quantité centrale des calculs. Dans ce problème mono-corps, l'énergie est alors une fonctionnelle de la densité électronique. La DFT repose sur deux théorèmes formulés par Hohenberg et Kohn (1964) dont voici une traduction.

Théorème 1 : Pour un système de N électrons dont l'état fondamental est non dégénéré, le potentiel extérieur $V_{ext}(\mathbf{r})$ est déterminé de façon unique à une constante près par la densité électronique $\rho_0(\mathbf{r})$ de l'état fondamental.

Ce théorème implique que toutes les propriétés d'un système soumis à un potentiel extérieur, tel que l'énergie, peuvent être déterminées une fois la densité électronique de l'état fondamental connue. Le potentiel extérieur correspond ici au potentiel d'interaction électron-noyau mentionné dans l'équation 2.42 et ne dépend que de façon paramétrique des positions nucléaires.

Théorème 2 : Pour un potentiel extérieur $V_{ext}(\mathbf{r})$ donné, la densité électronique de l'état fondamental $\rho_0(\mathbf{r})$ minimise l'énergie de l'état fondamental non dégénéré, $E_0[\rho]$, qui s'écrit comme une fonctionnelle de la densité électronique.

Cela signifie que l'énergie est minimale lorsque la densité électronique est celle de l'état fondamental. Toute autre densité électronique $\rho(\mathbf{r})$ que celle de l'état fondamentale $\rho_0(\mathbf{r})$ donne ainsi lieu à une énergie $E[\rho]$ plus grande que celle de l'état fondamental $E_0[\rho]$.

Afin de faciliter la résolution du problème, Kohn et Sham (1965) ont introduit la notion d'un système fictif de N électrons sans interaction évoluant dans un potentiel externe, décrit par un ensemble de N fonctions d'ondes mono-électroniques φ_i , aussi appelées orbitales de Kohn-

Sham, dont la densité électronique est la même que celle du système avec interaction. Ceci permet de séparer d'une part les énergies cinétiques des électrons sans interaction, $\tilde{T}[\rho]$, ainsi que leur énergie coulombienne évaluée par l'énergie de Hartree, $E_H[\rho]$, et d'autre part toutes les contributions liées à l'échange et la corrélation électronique, regroupées dans un terme appelé énergie d'échange et de corrélation, $E_{XC}[\rho]$. Le problème se résume alors au calcul d'un ensemble d'équations mono-électroniques (équations de Kohn-Sham) qui doivent être résolues numériquement de façon auto-cohérente, selon un processus itératif :

$$[\hat{T} + \hat{V}_{ext} + \hat{V}_H + \hat{V}_{XC}]|\varphi_i\rangle = \epsilon_i|\varphi_i\rangle \quad (2.44)$$

où \hat{V}_{ext} est le potentiel externe, \hat{V}_H le potentiel de Hartree et \hat{V}_{XC} le potentiel d'échange et de corrélation. Lors du calcul, les fonctions d'ondes mono-électroniques initiales sont d'abord construites et développées sur une base d'ondes planes et la densité électronique initiale est calculée. Le potentiel total effectif est ensuite déterminé puis les équations de Kohn-Sham associées sont résolues. L'énergie de ce système est alors obtenue comme :

$$E[\rho] = \tilde{T}[\rho] + E_{ext}[\rho] + E_H[\rho] + E_{XC}[\rho] \quad (2.45)$$

Enfin, la densité électronique correspondante est calculée et comparée à la densité initiale. Si la différence entre les deux densités électroniques est supérieure à un critère de convergence préalablement fixé, alors un nouveau potentiel effectif est déterminé et l'équation 2.44 à nouveau résolue, et ainsi de suite jusqu'à convergence.

A ce stade aucune approximation n'a été réalisée, si ce n'est celle de Born-Oppenheimer, et l'énergie $E[\rho]$ calculée par DFT est en principe exacte. Cependant la théorie ne fournit aucune expression mathématique du terme d'échange et de corrélation. C'est à ce niveau qu'il est nécessaire de faire une approximation en proposant une expression artificielle de ce terme. Historiquement la première approximation proposée fut la Local Density Approximation (LDA) formulée par Kohn et Sham (1965). Celle-ci considère les électrons du système comme un gaz homogène et suppose une densité électronique uniforme. Si la LDA permet un bon accord avec l'expérience notamment pour les systèmes dominés par les interactions covalentes, d'autres approximations ont par la suite été développées pour tenir compte de l'inhomogénéité de la densité électronique. Celles-ci sont les Generalized Gradient Approximation (GGA) où la fonctionnelle d'échange et de corrélation ne dépend pas seulement de la densité mais aussi du gradient de celle-ci. Parmi les fonctionnelles GGA, certaines comportent des paramètres ajustables tels que les fonctionnelles de type BLYP proposées par Becke (1988) et Lee, Yang, Parr (1988), alors que d'autres sont définies de manière unique sans paramètre ajustable, comme la fonctionnelle PBE proposée par Perdew, Burke, Ernzerhof (1996). La fonctionnelle la plus couramment utilisée en physique du solide est la GGA-PBE, utilisée dans le cadre de cette thèse. En général la fonctionnelle GGA-PBE améliore les résultats

que l'on pourrait obtenir avec une approximation LDA. Toutefois la GGA-PBE surestime systématiquement les paramètres de maille de la structure cristalline étudiée par rapport à l'expérience. Ceci s'accompagne d'une sous-estimation des fréquences vibrationnelles, à prendre en compte lors de l'interprétation des résultats, comme nous le verrons dans le Chapitre 4.

Comme nous l'avons mentionné au début de cette section, la DFT est particulièrement adaptée pour traiter les solides infinis. Parmi les différents codes qui implémentent la DFT, certains utilisent des fonctions d'ondes localisées (gaussiennes) et sont destinés particulièrement à l'étude des systèmes moléculaires en chimie alors que d'autres utilisent des ondes planes et sont mieux adaptés à l'étude des systèmes cristallins. C'est donc un code de cette dernière catégorie, Quantum ESPRESSO (Giannozzi et al. 2009), populaire en physique du solide, qui a été utilisé dans le cadre de cette thèse. Dans ce code, les orbitales de Kohn-Sham sont donc développées sur une base d'ondes planes. Avant d'effectuer les calculs il est impératif de tester la convergence de l'énergie en fonction du nombre d'ondes planes dans la base (énergie de coupure). En principe un nombre d'ondes planes élevé permet une meilleure précision mais augmente le coût computationnel du calcul.

Les propriétés cristallographiques que l'on souhaite ici obtenir par les calculs DFT dépendent principalement des électrons de valence, seuls à participer aux liaisons chimiques. Lors du calcul il est possible de décrire explicitement tous les électrons du système mais la construction des fonctions d'ondes mono-électroniques nécessite un grand nombre d'ondes planes pour reproduire les oscillations des fonctions d'onde dans la région du cœur, ce qui alourdit grandement calcul. Afin de réduire le coût computationnel, la description explicite des électrons de cœur peut être évitée par l'utilisation de pseudo-potentiels. Dans l'approximation du pseudo-potentiel, les électrons de cœur et les noyaux atomiques sont considérés comme gelés mais les effets liés à leur présence sont décrits par un pseudo-potentiel qui se substitue au potentiel externe en dessous d'une certaine valeur appelée rayon de coupure. En dessous du rayon de coupure les fonctions d'onde pseudisées sont lissées et ne doivent pas comporter de nœuds. Au-delà de cette valeur les fonctions d'onde pseudisées deviennent égales aux fonction d'ondes « all-electron ». Il existe deux grandes familles de pseudo-potentiels : les pseudo-potentiels qui conservent la norme de la densité électronique à l'intérieur de la région du cœur (norm-conserving) et ceux qui ne la conservent pas (ultrasoft). Tous les pseudo-potentiels utilisés dans le cadre de cette thèse sont des Optimized Norm-Conserving Vanderbilt (ONCV) (Hamann, 2013).

Une fois l'état fondamental déterminé, le calcul des propriétés vibrationnelles se ramène au calcul des dérivées secondes de l'énergie par rapport aux positions atomiques. En effet, comme nous l'avons vu en section 2.1.2, les modes de vibrations peuvent être obtenus par diagonalisation de la matrice dynamique (Eq 2.12). Celle-ci étant une matrice de taille $3N \times 3N$

3N, cela revient à calculer $9N^2$ dérivées secondes pour un vecteur \mathbf{q} donné. La théorie perturbative de la fonctionnelle de la densité (DFPT) (Baroni et al. 1987 ; Gonze 1995) permet d'alléger ce calcul. Dans cette approche, les vibrations sont perçues comme une réponse du système à une petite perturbation extérieure dont l'énergie est plus faible que l'énergie fondamentale du système. Cette théorie utilise une généralisation du théorème de Hellmann-Feynman (Hellmann 1937, Feynman 1939) permettant de relier les dérivées secondes de l'énergie par rapport aux déplacements atomiques, c'est-à-dire les constantes de force, à la dérivée première de la densité électronique :

$$\frac{\partial^2 E_{pot}}{\partial R_{ak\alpha} \partial R_{bk\beta}} = \int \frac{\partial V_{ext}(\mathbf{r})}{\partial R_{ak\alpha}} \frac{\partial \rho(\mathbf{r})}{\partial R_{bk\beta}} d^3r \quad (2.46)$$

Le calcul de la dérivée de l'énergie par rapport à un paramètre donné est alors d'un coût computationnel comparable au calcul de l'état non perturbé. Outre le calcul des coefficients de la matrice dynamique, la DFPT permet aussi d'obtenir les propriétés diélectriques du système étudié. En effet la polarisation induite peut être calculée à partir de la dérivée de l'énergie totale du système par rapport au champ électrique. Les charges efficaces sont alors obtenues par dérivée de la polarisation induite par rapport au déplacement atomique (éq 2.16) alors que les tenseurs diélectriques sont calculés à partir de la dérivée de la polarisation induite par rapport au champ électrique (éq 2.13), comme exposé en Section 2.1.2.2.

2.3.3 Implémentation pratique

Les différentes étapes du calcul d'un facteur de fractionnement isotopique dans le cas de d'une phase pure d'hydroxyapatite sont répertoriées dans le schéma de la figure 2.14.

En pratique, pour l'hydroxyapatite de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, le volume de la maille ainsi que les positions des 44 atomes dans celle-ci sont relaxées à l'aide du code PWscf de Quantum Espresso. A partir de la structure modèle de la phase cristalline (par exemple issue des données DRX) le code calcule l'énergie du système, puis fait varier les paramètres de maille et déplacer les atomes en calculant l'énergie à chaque itération, l'objectif étant de minimiser l'énergie du système. La structure alors obtenue correspond à celle pour laquelle les forces résiduelles sur les atomes sont les plus faibles possibles (inférieures à un critère de convergence préalablement défini).

Pour déterminer l'ensemble des propriétés vibrationnelles il faut connaître la matrice dynamique en tout point de la zone de Brillouin. En principe il faudrait donc calculer la matrice dynamique en un maximum de points q , ce qui aurait un coup computationnel très élevé. En pratique il est possible de réaliser le calcul exact des matrices sur une grille régulière de points q réduite, ce qui donne accès aux constantes de force par transformée de Fourier, puis interpoler les matrices dynamiques sur une grille de point q plus fine. Le calcul exact des phonons est réalisé avec le code Phonon de Quantum Espresso, puis les étapes de transformée de Fourier et d'interpolation sont réalisées en post-processing (avec les codes associés `q2r.x` et `matdyn.x`). C'est au niveau de l'étape d'interpolation que l'on fait varier les masses atomiques des atomes de la maille afin d'obtenir les fréquences vibrationnelles des isotopologues souhaités.

Le facteur β est ensuite calculé à partir des fréquences vibrationnelles selon l'équation 2.39 sur une machine locale pour différentes températures. Le facteur de fractionnement isotopique à l'équilibre α entre 2 phases est alors obtenu immédiatement comme le rapport des facteurs β de chaque phase.

Outre la phase pure d'hydroxyapatite, trois structures de défaut carbonaté dans l'apatite ont été retenues parmi les structures étudiées par Yi et al. (2014) : hydroxyapatite carbonatée en site A, hydroxyapatite carbonatée en site B et fluorapatite carbonatée en site B. Les étapes du calcul sont les mêmes, cependant s'agissant de structures de défauts et non de solutions solides, les paramètres et le volume de la maille n'ont pas été relaxés. Les positions atomiques ont été optimisées dans une maille de paramètres identiques à ceux obtenus pour l'hydroxyapatite pure après relaxation.

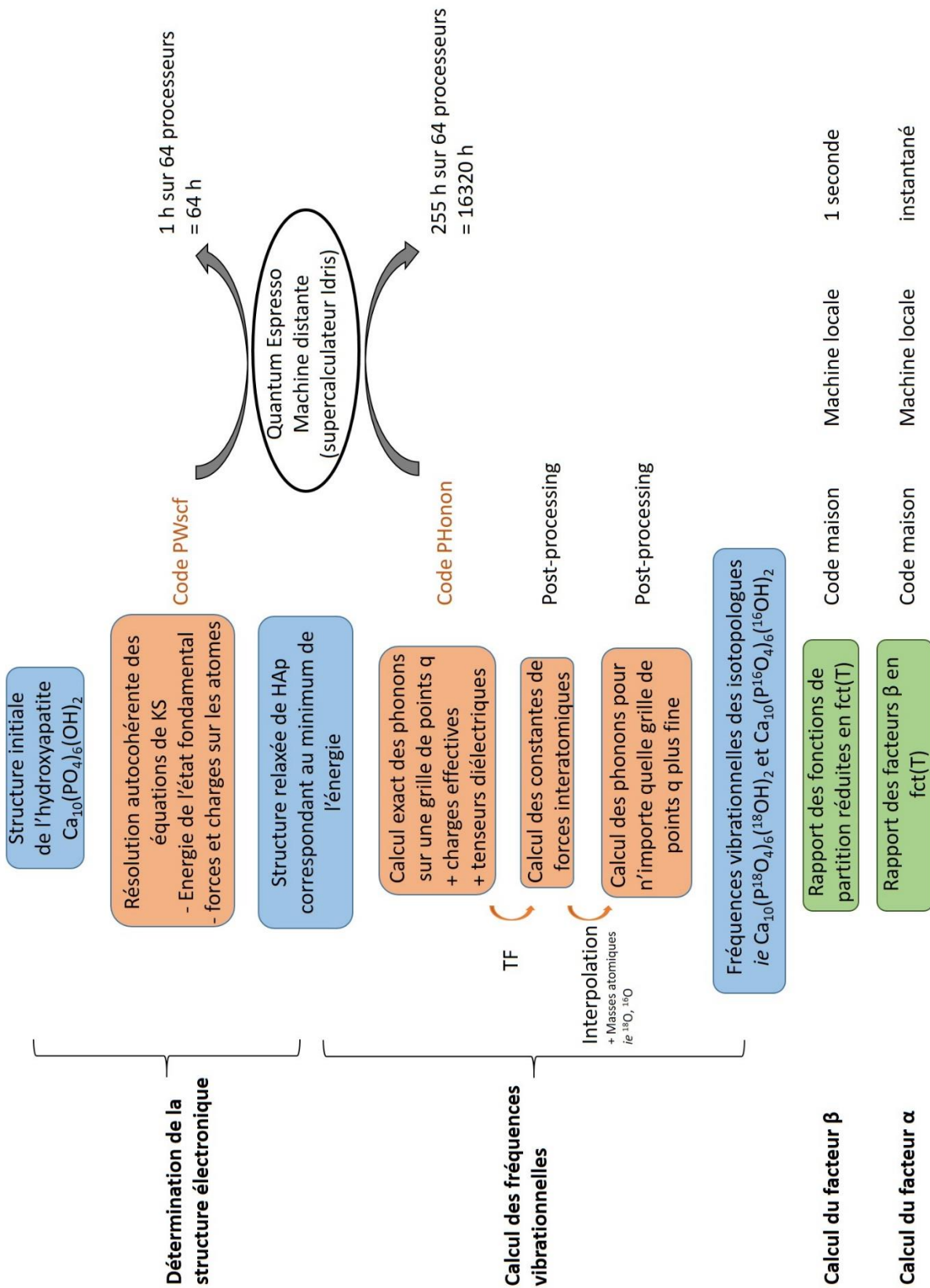


Figure 2.14 – Schéma récapitulatif des étapes du calcul théorique du facteur de fractionnement isotopique à l'équilibre de l'oxygène

Partie II

Approches théoriques

Chapitre 3 : Calcul *ab initio* des propriétés de fractionnement isotopique de l'apatite

Dans le Chapitre 1 nous avons vu que les transformations cristallographiques se produisant dans la structure des bioapatites au cours de leur fossilisation impliquent notamment l'incorporation de fluor ainsi qu'une variation de la teneur en carbonates associée à des modifications de leur environnement. Cela soulève donc la question de l'effet des substitutions par les ions fluorures et carbonates sur les propriétés de fractionnement isotopique de l'apatite.

Dans ce chapitre, les propriétés de fractionnement isotopique à l'équilibre de l'apatite, plus précisément de l'hydroxyapatite ainsi que de plusieurs phases d'hydroxy- et fluorapatites carbonatées, sont déterminées de façon théorique par calculs DFT et comparées aux propriétés de fractionnement isotopique théoriques d'autres phases comme la calcite, l'eau et le dioxyde de carbone. L'objectif est ici de fournir un cadre théorique concernant les propriétés de fractionnement isotopique à l'équilibre de l'apatite pour améliorer l'interprétation des processus naturels.

3.1 Résumé de l'étude

La composition isotopique des bioapatites fossiles est utilisée pour la reconstruction des environnements et climats passés. L'interprétation des valeurs expérimentales repose notamment sur la connaissance des lois de fractionnement isotopique à l'équilibre, par exemple entre le phosphate de l'apatite et l'eau. Celles-ci peuvent être déterminées expérimentalement dans des conditions contrôlées mais la difficulté à atteindre l'équilibre thermodynamique et l'hétérogénéité naturelle de l'apatite sont source d'incertitudes. Une autre approche consiste à déterminer les lois de façon théorique, ce qui présente l'avantage de pouvoir regarder spécifiquement les différents sites cristallographiques de la structure, notamment les sites d'incorporation d'impuretés clés du processus de fossilisation : carbonate et fluor.

Ainsi, cette étude consiste à déterminer les propriétés de fractionnement isotopique à l'équilibre théoriques non seulement de la phase pure d'hydroxyapatite, mais également de trois différentes structures d'apatites carbonatées : hydroxyapatite carbonatée en site B, fluorapatite carbonatée en site B et apatite carbonatée en site A. La détermination des facteurs beta par calculs DFT selon l'approche décrite dans le Chapitre 2 permet de décrire non seulement les propriétés isotopiques de la phase "bulk", mais aussi de chacun des sites cristallographiques au sein de la phase (e.g. CO₃, PO₄, OH, CaI, CaII...). Afin de pouvoir comparer les calculs théoriques aux données expérimentales de la littérature, et de les relier à divers contextes géochimiques, nous avons également calculé les propriétés isotopiques d'un autre minéral, la calcite, ainsi que celles de H₂O et CO₂.

Les propriétés de fractionnement isotopique de l'oxygène, du carbone et du calcium varient en fonction du site de substitution des carbonates dans la structure de l'apatite. La substitution du carbonate en site A donne systématiquement lieu à une phase plus riche en isotopes lourds (^{18}O , ^{13}C , ^{44}Ca) que lorsque le carbonate est substitué en site B. Une variation du rapport carbonate en site A / site B dans la structure de l'apatite en fonction de la température pourrait expliquer la plus forte dépendance à la température du fractionnement isotopique expérimental de l'oxygène entre le carbonate structural de l'apatite et l'eau par rapport au fractionnement entre la calcite et l'eau.

Le fractionnement interne théorique de l'oxygène entre les groupements carbonate et phosphate de la fluorapatite carbonatée en site B (~ 8 ‰ à 37 °C) est en accord avec les valeurs expérimentales mesurées sur les bioapatites fossiles. Le modèle d'apatite carbonatée en site B utilisé dans ce travail constitue donc un proxy représentatif des propriétés de fractionnement isotopique des bioapatites fossiles.

Concernant le calcium, le fractionnement isotopique calculé entre l'apatite et la calcite est faible, en accord avec les valeurs expérimentales de la littérature. La distorsion des environnements du calcium en site I et II, induite par substitutions des ions CO_3^{2-} et F^- , se traduit par une variation importante des facteurs β calculés et contribue probablement à la variabilité des valeurs de $\delta^{44}\text{Ca}$ mesurées sur les échantillons naturels.

Cette étude a permis de quantifier les divers effets induits par les substitutions par les ions fluorures et carbonates sur les propriétés de fractionnement isotopique de l'apatite. Ces résultats soulignent l'importance d'étudier le fractionnement isotopique entre différents sites cristallographiques en complément de l'étude des mécanismes de transformations cristallochimiques pour améliorer notre compréhension des processus impliqués lors de la fossilisation.

Article I : Site-specific equilibrium isotopic fractionation of oxygen, carbon and calcium in apatite

Julie AUFORT, Loïc SEGALÉN, Christel GERVAIS, Lorenzo PAULATTO, Marc BLANCHARD, Etienne BALAN

Publié dans le journal *Geochimica et Cosmochimica Acta* 219 (2017), 57-73

DOI : 10.1016/j.gca.2017.09.020

Abstract

The stable isotope composition of biogenic apatite is an important geochemical marker that can record environmental parameters and is widely used to infer past climates, biomineralization processes, dietary preferences and habitat of vertebrates. In this study, theoretical equilibrium isotopic fractionation of oxygen, carbon and calcium in hydroxyapatite and carbonate-bearing hydroxyapatite is investigated using first-principles methods based on density-functional theory and compared to the theoretical isotopic fractionation properties of calcite, CO₂ and H₂O. Considering the variability of apatite crystal-chemistry, special attention is given to specific contributions of crystal sites to isotopic fractionation. Significant internal fractionation is calculated for oxygen and carbon isotopes in CO₃ between the different structural sites occupied by carbonate groups in apatite (typically 7 ‰ for both ¹⁸O/¹⁶O and ¹³C/¹²C fractionation at 37 °C). Compared with calcite-water oxygen isotope fractionation, occurrence of A-type substitution in apatite structure, in addition to the main B-type substitution, could explain the larger temperature dependence of oxygen isotope fractionation measured at low temperature between carbonate in apatite and water. Theoretical internal fractionation of oxygen isotopes between carbonate and phosphate in B-type carbonated apatite (~8 ‰ at 37 °C) is consistent with experimental values obtained from modern and well-preserved fossil bio-apatites. Concerning calcium, theoretical results suggest a small fractionation between apatite and calcite (-0.17 ‰ at 37 °C). Internal fractionation reaching 0.8 ‰ at 37 °C occurs between the two Ca sites in hydroxyapatite. Furthermore, the Ca isotopic fractionation properties of apatite are affected by the occurrence of carbonate groups, which could contribute to the variability observed on natural samples. Owing to the complexity of apatite crystal-chemistry and in light of the theoretical results, measurements of site-specific isotopic fractionation properties could improve our understanding and the interpretation of isotopic records in apatites.

3.2 Introduction

Apatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$, X = OH, F, Cl) is the most common phosphate mineral (McConell 1973). It frequently contains minor amounts of carbonate, occurring naturally in substitution of phosphate (B site) and channel ions (A site) in the crystal structure (e.g. Fleet 2009). While sedimentary deposits of carbonated fluorapatite yield the world's major phosphorus resources (Knudsen and Gunter, 2002), carbonated hydroxyapatite is the major inorganic component of vertebrate skeletons (Elliott 2002). Stable isotope compositions of biogenic apatites, and in particular the isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$) of structural carbonate groups, are widely used to reconstruct past climates, past environments and dietary preferences of vertebrates (e.g. Kohn and Cerling 2002; Roche et al. 2013; Pack et al. 2013; Reynard and Balter 2014). For example, the carbon stable isotope composition of carbonate-bearing bio-apatites reflects that of ingested food and is used to infer dietary preferences of vertebrates in a variety of paleoecological studies (Lee-Thorp and van der Merwe 1987, Quade et al., 1992). More recently, carbonate clumped isotopes (i.e. Δ_{47}) have generated a great interest (e.g. Schauble et al. 2006; Stolper and Eiler 2015; Wacker et al. 2016) for their use as a geothermometer tool revealing formation temperatures of carbonate bearing minerals and, in particular, body temperature of vertebrates. The stable oxygen isotope composition of bioapatite is linked to the body water which depends on climatic and ecophysiological factors (Longinelli 1984; Kohn et al., 1996). Beyond $\delta^{18}\text{O}$ measurements, high-precision triple oxygen isotope analysis (i.e. $\Delta^{17}\text{O}$) of carbonate minerals and structural carbonate in bioapatites is now also used to reconstruct past water compositions and has been suggested as a possible tracer for diagenetic alteration of fossil bones and teeth (Gehler et al. 2011, Passey et al. 2014).

Beside traditional isotopes, recent analytical advances have allowed the rapid development of Ca stable isotope composition analysis on bioapatites. Skulan et al. (1997) first reported the importance of biological calcium isotopic fractionation within the global calcium geochemical cycle and the possibility of calcium isotopic composition of fossils to record information on diet and environment. Calcium isotope fractionation in carbonate minerals has been widely investigated (Lemarchand et al. 2004, Marriott et al. 2004, Gussone et al. 2005). Several studies investigated carbonated bioapatites (Skulan and DePaolo, 1999, Heuser et al. 2009, 2011, Reynard et al. 2010, Tacail et al. 2016), providing reference values for $\delta^{44}\text{Ca}$ in biogenic apatite. Though marine carbonate sediments are the phase most commonly used for the reconstruction of calcium isotopic composition of seawater through time (Skulan et al. 1997, De La Rocha and DePaolo 2000), the possibility of using other proxies such as foraminifera (Heuser et al. 2005) and phosphorites (Soudry et al. 2004) has been explored. Soudry et al. (2006) investigated the use of carbonated fluorapatite formed in marine sediments as a potential candidate for long term reconstructions of isotopic composition of seawater Ca^{2+} . Farkas et al. (2007) compiled records from various biogenic carbonates and authigenic phosphates to discuss the calcium isotope budget over Phanerozoic times. Calcium isotope fractionation might

however vary depending on the type of phosphate deposit, e.g. sedimentary peloidal phosphates or phosphorite crusts (Arning et al. 2009). Considering the importance of understanding the oceanic mass balance of calcium and its impact on the regulation of carbon dioxide concentration in the atmosphere, the potentiality for calcium phosphate too to be used as a proxy for investigating past changes in Ca fluxes has to be determined. Despite this growing interest, the mechanisms and magnitude of calcium isotopic fractionation are still under debate.

The oxygen isotopic composition of biogenic apatite can also provide important information on paleotemperatures, its interpretation relying on the knowledge of apatite isotopic fractionation properties. Since the pioneering empirical studies of Longinelli (1965) and Kolodny et al. (1983), several experimental oxygen isotope fractionation relations have been established between bioapatite phosphate and water (Pucéat et al. 2010) and between dissolved phosphate and water (Chang and Blake 2015). In low temperature systems the isotopic equilibrium cannot be achieved through efficient diffusion-mediated exchange between the relevant phases. In the case of phosphate, inorganic processes are not efficient enough to drive the system to equilibrium (Lécuyer et al. 1999). However, it has been shown that enzymatic catalysis either related to microbial activity or intracellular metabolism enhances oxygen exchange between phosphate groups and water and could account for equilibrium exchange and temperature dependence observed in bioapatites and sedimentary apatites (Blake et al. 2005, Chang et al. 2015). An equation for oxygen isotope fractionation between carbonate groups in carbonated hydroxyapatite and water has also been determined from controlled experiments (Lécuyer et al. 2010). Uncertainties remain however, due to possible out-of-equilibrium isotope fractionation during crystal growth, slow isotope exchange rates and the variability of the apatite crystal-chemistry (Rakovan and Pasteris 2015). Additional difficulties may also arise when non-conventional stable isotopes are investigated due to the small magnitude of isotopic fractionation factors (e.g. Blanchard et al. 2017). Experimental equilibrium fractionation laws may therefore be affected by large uncertainties at low temperatures.

Alternatively, equilibrium fractionation factors can be determined theoretically from the computation of vibrational properties. The advantages of calculating fractionation factors within first principles methods are to provide independent equilibrium fractionation laws, over a wide range of temperatures, from which comparison with experimental data may help understand deviations from equilibrium values and kinetic effects. Theoretical computation of isotopic fractionation properties can also be applied to non-conventional isotopes for which experimental measurements are difficult or lacking. A variety of isotopes and minerals have been investigated using first-principles methods based on density functional theory (DFT), such as stable isotopes O and C in carbonates (Schauble et al 2006), and H, O and Si in silicates (Méheut et al. 2007). Theoretical studies of calcium isotopic fractionation have also been conducted on sulfates (Griffith et al. 2008) and carbonates (Rustad et al. 2010, Wang et al.

2017). In addition, theoretical approaches make it possible to determine the isotopic fractionation properties of specific sites in the crystal structure (e.g. Méheut et al. 2007, Rustad and Zarzycki 2008, Zheng et al. 2016).

The aim of the present study is to provide a theoretical framework for equilibrium isotopic fractionation in apatite and to assess possible isotopic fractionation arising from carbonate substitution in different sites of the apatite crystal lattice. Isotopic fractionation properties of apatite are compared to that of other phases of interest in order to discuss a variety of geochemical contexts. In this work, we use the same first-principles approach as Méheut et al. (2007) to determine the stable isotopic fractionation of oxygen, carbon and calcium in the hydroxyapatite, calcite, water and CO₂ system. In addition, the equilibrium isotopic fractionation properties of three energy-minimized theoretical models for carbonate substitution in apatite whose structural and vibrational properties were discussed in Yi et al. (2014) are also investigated.

3.3 Methods

3.3.1 Equilibrium isotopic fractionation factors

The equilibrium isotopic fractionation factor $\alpha(a, b, Y)$ of an element Y between two phases a and b is defined as the ratio of isotope ratios (atomic fraction) in phase a compared to phase b . It can also be written as the ratio of the reduced partition function ratios:

$$\alpha(a, b, Y) = \frac{\beta(a, Y)}{\beta(b, Y)} \quad \text{Eq. (1)}$$

where $\beta(a, Y)$ is the reduced partition function ratio of phase a . This β -factor can be seen as the equilibrium isotope fractionation factor between phase a and a perfect gas of Y atoms. The reduced partition function ratio can be calculated from the harmonic vibrational frequencies (Bigeleisen and Mayer, 1947) as follows:

$$\beta(a, Y) = \left[\prod_{i=1}^{3N_{at}} \prod_{\{q\}} \frac{\nu_{q,i}}{\nu'_{q,i}} \frac{\exp(-h\nu_{q,i}/2k_B T)}{1 - \exp(-h\nu_{q,i}/k_B T)} \frac{1 - \exp(-h\nu'_{q,i}/k_B T)}{\exp(-h\nu'_{q,i}/2k_B T)} \right]^{1/(N_q N)} \quad \text{Eq. (2)}$$

where $\nu_{q,i}$ and $\nu'_{q,i}$ are the phonon frequencies of the two isotopologues (the prime symbol refers to the light isotope of the element Y) identified by a wavevector \mathbf{q} and a branch index $i = 1, 3N_{at}$. N_{at} is the number of atoms in the crystal unit cell, h is the Planck's constant, k_B Boltzmann's constant and T the temperature. The second product is performed on a sufficiently large grid of N_q \mathbf{q} -vectors in the Brillouin zone. In Eq. (2) the three translational modes with $\nu_{q,i} = 0$ are not considered. N is the number of sites for the Y element in the unit cell. Eq. (2) takes into account the Teller-Redlich rule (Redlich, 1935) which imposes $\lim_{T \rightarrow \infty} \beta = 1$.

3.3.2 Modelling approach and density-functional theory calculations

The phonon frequencies necessary to calculate the reduced partition function ratios (Eq. (2)) are computed from first-principles methods within density functional theory (DFT) (Hohenberg and Kohn, 1964; Kohn and Sham, 1965). All calculations reported here are performed with the generalized-gradient approximation (GGA) for the exchange-correlation functional as proposed by Perdew, Burke and Ernzerhof, abbreviated PBE (Perdew et al., 1996). The structural and vibrational calculations are performed using the PWscf and PHonon codes of the Quantum Espresso package (Giannozzi et al. 2009). The ionic cores of Ca, P, O, F, C, and H are described by optimized norm-conserving Vanderbilt (ONCV) pseudopotentials (Hamann, 2013). Electronic wave functions and charge density are expanded in plane waves using 80 Ry and 800 Ry cut-offs respectively so that total energies are converged within 1 mRy/atom. Electronic integration is performed by sampling the Brillouin zone with a $2 \times 2 \times 2$ k-points grid for hydroxyapatite and a $3 \times 3 \times 3$ k-point grid for calcite according to the Monkhorst and Pack (1976) scheme. Atomic positions are obtained after relaxation until the residual forces are less than 10^{-4} Ry/au. For the pure crystal phases, the residual pressure over the relaxed cell is smaller than 0.02 kbar.

Table 3.1 Hydroxyapatite and calcite calculated and experimental lattice parameters

Hydroxyapatite	This work	Exp ^a
a (Å)	9.567	9.417
c (Å)	6.890	6.875
Calcite	This work	Exp ^b
a (Å)	6.444	6.375
γ (°)	46.03	46.08

^aHughes et al. (1989)

^bGraf (1961)

The lattice parameters of DFT relaxed structures of hydroxyapatite and calcite compare well with their experimental counterparts (Table 3.1) and previous theoretical modelling at the PBE level (Balan et al. 2011). In both cases, calculated lattice parameters are overestimated by ~ 1 %, which is a systematic error in density functional theory calculations performed using GGA PBE functionals. Models of carbonated apatite have been built, starting from defect structures previously obtained by Yi et al. (2014). In the present study, B-type carbonated hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_5(\text{CO}_3\text{F})(\text{OH})_2$) and A-type carbonated apatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$) were considered. To test the chemical effect of F^- ions located in channel sites, an additional B-type model was also considered by exchanging F^- ions for the channel OH groups, leading to a carbonated-fluorapatite composition ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_5(\text{CO}_3\text{F})\text{F}_2$). For all these models, the atomic positions were optimized while the cell parameters were kept fixed to those of pure hydroxyapatite (constant-volume relaxation) and using a $2 \times 2 \times 2$ k-points grid. Note that only a direct chemical effect of channel fluorine on the carbonate models was tested whereas the

reduction of the cell volume observed in pure fluorapatite with respect to hydroxyapatite was not considered in the present study. A cubic cell ($a = 15.87 \text{ \AA}$) was used to build periodic models of isolated H_2O and CO_2 molecules. In addition, a periodic model of the isolated $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ molecule was also calculated using the same cubic cell to benchmark our calcium isotopic fractionation calculations. In these cases, the Brillouin zone sampling for the electronic integration is restricted to the Γ -point.

Phonon frequencies are computed using density functional perturbation theory (DFPT) (Baroni et al, 2001). Interatomic force constants are obtained from the dynamical matrices first computed exactly within DFPT on a regular $m \times m \times m$ grid of \mathbf{q} -vectors ($m = 3$ for calcite and hydroxyapatite). Vibrational frequencies for the two isotopologues are then obtained by diagonalising the dynamical matrices computed with the two different atomic masses on a $n \times n \times n$ grid obtained by Fourier interpolation of the interatomic force constants. The vibrational partition function is converged by performing the product on a $3 \times 3 \times 3$ grid for hydroxyapatite and $4 \times 4 \times 4$ for calcite (Table S1). For the models of carbonate bearing apatites, phonon frequencies, and related β -factors, were obtained at the centre of the Brillouin zone only (Γ point). The results will be discussed in terms of logarithmic β -factors, $\ln(\beta)$, and logarithmic fractionation factors, $\ln(\alpha)$, expressed in parts per thousands (‰). Polynomial fits of the β -factors are reported in Table S3.

The comparison between theoretical and actual equilibrium isotopic fractionation factors is affected by the various assumptions and approximations used in the modelling approach. As previously discussed by Méheut et al. (2007, 2009) and Dupuis et al. (2015), theoretical reduced partition function ratios are systematically affected by the choice of the functional used to compute the electronic structure of the system (here the PBE functional) and the neglect of anharmonic effects. The theoretical frequencies computed at the centre of the Brillouin zone of crystals can be compared to their experimental counterparts (Table S2). An overall $\sim 5\%$ underestimation of calculated phonon frequencies is observed, a systematic error associated with the overestimation of lattice parameters seen in DFT calculations performed with a PBE approximation (Favot and Dal Corso, 1999). Such underestimation is expected to lead to a relative underestimation of logarithmic β -factors ranging between -5 and -10% (Méheut et al. 2007, 2009). In order to correct the systematic errors encountered with PBE approximation, a uniform scaling of the calculated PBE frequencies could be used to match the experimental ones (e.g. Schauble et al. 2006). This approach however depends on the availability and accuracy of spectroscopic data recorded on molecular and crystalline systems, potentially introducing additional uncertainties. For this reason, it was not used in the present study. The β -factors were obtained solely from the raw theoretical harmonic frequencies computed within DFT.

A different source of uncertainty affecting the comparison of the theoretical data and experimental measurements arises from the strategy used to model the carbonate defects in the apatite crystal host. Although the theoretical carbonate concentration (~ 4.4 wt % of CO_2) is consistent with the concentrations observed in biogenic samples (4.8 wt % of CO_2 in bone, Elliot 2002), the periodic models do not account for the random character of substitutions affecting equivalent sites in minerals. A relaxation of the cell-parameters of the defect model would prejudicially increase this character by constraining the full system symmetry to that locally imposed by the defect. A theoretical relaxation of atomic positions using experimental cell-parameters would also introduce an unconstrained inconsistency in the model. In the present study, all the defect models were thus built by keeping the cell parameters identical to that of pure hydroxyapatite. Sensitivity tests were however performed on the A and B carbonate models using an isotropic relative contraction of the cell parameters of 0.7 % (corresponding to the relaxed volume of the defects models). They lead to 1.5 ‰, 0.8 ‰ and 0.8 ‰ increases in oxygen, carbon and calcium β -factors at 300 K, respectively. For the models of carbonate bearing apatites, oxygen, carbon and calcium β -factors were also determined from phonon frequencies calculated at the special point of the hexagonal lattice (Chadi and Cohen, 1973). They are systematically higher by 0.5 ‰, 0.4 ‰ and 0.35 ‰ at 300 K respectively, in all carbonate-bearing apatites, than β -factors determined from phonon frequencies calculated at the Γ point. Because these variations are consistent for all carbonated apatites, they would not alter the fractionation factors related to different schemes of carbonate incorporation in apatite.

3.4 Results

3.4.1 Oxygen $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ equilibrium fractionation properties

For the investigated phases, oxygen β -factors at 25 °C vary from 60 ‰ to 110 ‰ (Fig 3.1a). This significant variability is mostly due to the different nature of bonds with covalent character involving oxygen in these phases (O-H, P-O and C-O), which leads to differences in interatomic force constants. In the case of hydroxyapatite, oxygen atoms are either bound to phosphorus atoms or hydrogen atoms, a different behaviour regarding isotopic fractionation is therefore expected between phosphate and hydroxyl sites. Site-specific oxygen β -factors in hydroxyapatite were computed by either substituting the oxygen atoms belonging to hydroxyl groups (OH), or the oxygen atoms belonging to phosphate groups (PO_4), or both (Table S3).

At equilibrium, phosphate oxygens are enriched in ^{18}O relative to hydroxyl oxygens (Fig 3.1b) and the phosphate oxygen β -factor is close to the total oxygen β -factor in hydroxyapatite. Nearly all the fractionation takes place in the internal vibration of the PO_4 tetrahedron, with ν_2 , ν_4 , ν_1 and ν_3 PO_4 modes contributing to about 8 ‰, 15 ‰, 13 ‰ and 30 ‰ respectively. Smaller β -factors are observed for OH-groups compared to total oxygen β -factors (Table 3.2). The oxygen β -factor of hydroxyl groups is dominated by their stretching mode (Fig 3.2a). Overall,

the OH groups only weakly contribute to the total oxygen β -factor of hydroxyapatite, with 0.97 ‰ and 0.07 ‰ respectively.

Depletion in ^{18}O relative to calcite is observed for all oxygen sites in hydroxyapatite and carbonated apatite phases. Total oxygen β -factors in carbonate-bearing apatites (Fig 3.1a) vary depending on the carbonate substitution site, with A-type carbonate substitution leading to enrichment in ^{18}O relative to B-type substitution. Site-specific oxygen β -factors were calculated for the three carbonate defect models and results are shown at 300 K in Table 3.2. Distinctive isotopic fractionation behaviours are observed from one oxygen site to another, depending on the type of atom, H, P or C, bound to oxygen (Table 3.2). The presence of B-type carbonate groups decreases the oxygen β -factors of structural phosphates by 0.9 to 1.3 ‰ at 300 K. In contrast, occurrence of A-type carbonate leads to a smaller increase of 0.4 ‰. Oxygen is heavier in structural carbonate of apatites than in phosphate, regardless of the substitution site (A or B). However, the isotopic fractionation behaviour of oxygen in carbonate groups differs depending on the substitution site for carbonate in apatite. Carbonate substituted to hydroxyl (A-type) is more enriched in ^{18}O than is carbonate substituted to phosphate (B-type). The differences in oxygen fractionation between A-type and B-type substituted carbonate in apatites (Table 3.2) arise mainly from the $\nu_3 \text{CO}_3$ mode (Fig 3.2b). Other CO_3 modes contribute to about the same amount in both A-type and B-type carbonates whereas ν_3 contributes to 27 ‰ and 22 ‰ respectively, making up for $\sim 70\%$ of the enrichment in ^{18}O in A-type CO_3 relative to B-type (Fig 3.2b). The differences observed among experimental vibrational spectra of B-type carbonate in hydroxyapatite, bioapatite, and sedimentary carbonate-rich fluorapatite (also known as ‘francolite’) are smaller than those observed between A-type and B-type carbonate spectra. The $\nu_2 \text{CO}_3$ bending mode are observed at $\sim 865 \text{ cm}^{-1}$ in ‘francolite’ (Regnier et al. 1994; Fleet 2009) and $\sim 873 \text{ cm}^{-1}$ for B-site carbonates, whereas the two anti-symmetric stretching $\nu_3 \text{CO}_3$ modes correspond to relatively broad bands at ~ 1430 and $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$ and at ~ 1410 and $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$, respectively (Yi et al. 2014b). The observed differences arise from a different charge compensation mechanism of the carbonate for phosphate substitution which involves a nearby fluoride ion in the ‘francolite’ defect (Yi et al. 2013). Accordingly, the carbonated fluorapatite model investigated in this work can be considered a good proxy for studying isotopic fractionation properties related to B-type carbonate in apatite.

At 25 °C the oxygen β -factor is 61.8 ‰ for the isolated H_2O molecule (Fig 3.1a), this corresponds to a logarithmic difference of less than 1 ‰ with previous harmonic calculations based on DFT models (PBE functional; Meheut et al. 2007) or anharmonic calculation based on experimental molecular constants (Richet et al. 1977). In the case of water, harmonic frequencies calculated with the PBE functional are underestimated with respect to their experimental counterparts and almost coincide with the experimental (anharmonic) values (Table S2). A cancellation of errors (Balan et al 2007), i.e. underestimation of the OH bonds

harmonic frequencies in water and lack of anharmonicity in Eq. (2) fortuitously yields the good agreement observed between the calculated and experimental β -factors.

The oxygen β -factor of calcite is lower (by 6 ‰ at 25 °C) than that reported by Schauble et al. (2006). This is mostly due to the frequency scaling introduced by Schauble et al. (2006) to better match the experimentally measured frequencies. Our calculations for CO₂ differ from Richet et al. (1977) by ~2.5 ‰ at 25 °C (for a β -factor of ~110 ‰).

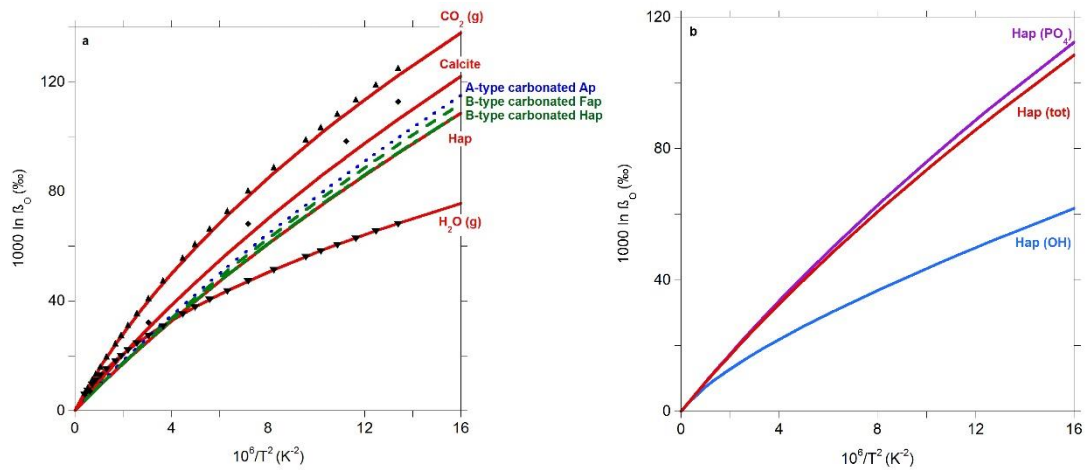


Figure 3.1 a. Oxygen isotope β -factors for: gas H₂O (isolated molecule), gas CO₂ (isolated molecule), calcite, hydroxyapatite, and three theoretical models for carbonate substitution in apatite: B-type carbonated fluorapatite (as proposed by Yi et al. (2013)) Ca₁₀(PO₄)₅(CO₃F)F₂, B-type carbonated hydroxyapatite Ca₁₀(PO₄)₅(CO₃F)(OH)₂ and A-type carbonated apatite (Ca₁₀(PO₄)₆(CO₃)). Oxygen β -factors of calcite determined using DFT calculations performed by Schauble et al. (2006, solid diamonds) and CO₂ and H₂O calculated using experimental molecular constants and anharmonic calculations by Richet et al. (1977, open upwards and downwards triangles for CO₂ and H₂O respectively). **b.** Oxygen β -factors for hydroxyapatite (OH): oxygen atoms belonging to a hydroxyl group in hydroxyapatite, hydroxyapatite (PO₄): oxygen atoms belonging to a phosphate group, hydroxyapatite (tot): total oxygen β -factor in hydroxyapatite.

Table 3.2 Logarithm of site-specific oxygen β -factors (‰) for hydroxyapatite, B-type carbonated hydroxyapatite, B-type carbonated fluorapatite and A-type carbonated apatite at T = 300 K.

1000 ln β	All O sites	PO ₄ sites	OH sites	CO ₃ sites
Hydroxyapatite	80.4056	83.1800	47.0975	-
B-type carbonated hydroxyapatite	80.6355	82.3141	48.7959	90.6614
B-type carbonated fluorapatite	83.0130	81.8706	-	90.6244
A-type carbonated apatite	85.1984	83.6017	-	97.9628

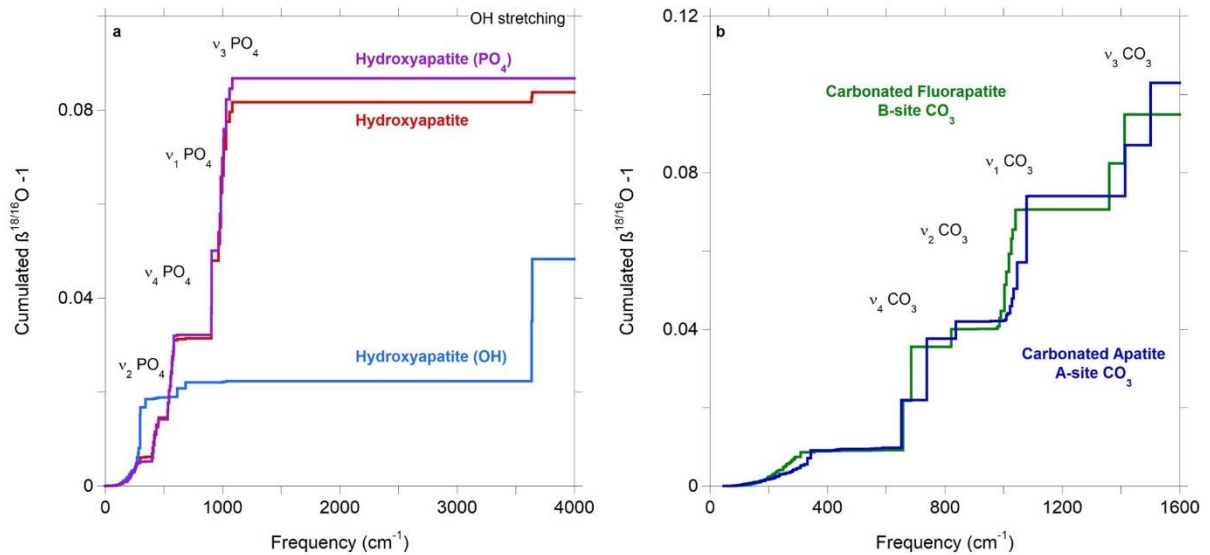


Figure 3.2 a. Cumulative contributions to the reduced partition function ratio (given as $\beta^{18/16}\text{O} - 1$, following the representation given by Rustad et al. (2010)), for $^{18/16}\text{O}$ in hydroxyapatite, hydroxyl (OH) and phosphate (PO_4) groups in Hap at 300 K. **b.** Cumulative contributions to the reduced partition function ratio given as $\beta^{18/16}\text{O} - 1$, for $^{18/16}\text{O}$ in carbonate sites in carbonated fluorapatite and carbonated apatite at 300 K

3.4.2 Carbon $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ equilibrium fractionation properties

Carbon β -factor values are higher than for oxygen β -factors and vary from 170 to 180 ‰ at 25 °C in the investigated phases, with smaller relative variations from one phase to the other than what was observed for oxygen fractionation (Fig 3.3), reflecting that carbon only occurs as a carbonate group. As in the case of oxygen, the isotopic fractionation behaviour of carbon in carbonate groups differs depending on the substitution site, A or B, for carbonate in apatite. The occupation of the structural channels in B-type carbonated apatite by hydroxyl or fluoride ions has no effect on carbon β -factor as both curves are superimposed. Carbonate substituted to channel ions (A-type substitution) is enriched in the heavy isotope (^{13}C) compared to carbonate substituted for phosphate, with an 8 ‰ difference at 300 K. Unlike oxygen fractionation, carbon in calcite is lighter than that of CO_3 in A-type carbonated apatite at equilibrium.

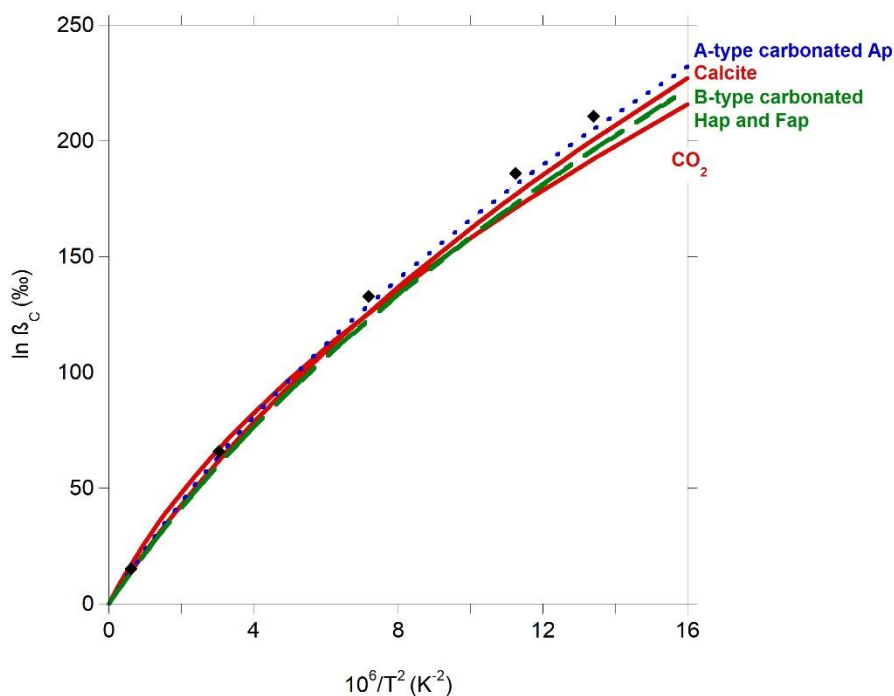


Figure 3.3 Carbon isotope β -factors in calcite, B-type carbonated hydroxyapatite, B-type carbonated fluorapatite, A-type carbonated apatite and CO_2 . Carbon β -factor of calcite determined using DFT calculations performed by Schauble et al. (2006, solid diamonds).

3.4.3 Calcium $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ equilibrium fractionation properties

Logarithmic values of calcium β -factors are one order of magnitude smaller than those of carbon and vary from 10.9 to 12.1 ‰ at 25 °C in the investigated phases (Fig 3.4a). Values for calcite from theoretical calculations performed by Rustad et al. (2010) on molecular clusters are higher than our calculations by ~ 4 ‰ at 300 K. This is to be expected because the computational method is different, involving molecular clusters instead of crystal cell and the B3-LYP hybrid functional instead of PBE. For comparison, similar calculations of $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ calcium β -factor at the PBE level lead to a 10.96 ‰ value at 37 °C, which is lower by 2.5 ‰ than the B3-LYP calculations of Moynier and Fujii (2017). This also shows that caution must be taken not to derive fractionation factors from β -factors computed with different parameters and methods when comparing with experimental measurements. Similarly to oxygen and carbon isotopic fractionation, calcium β -factors vary depending on the carbonate substitution site, with A-type carbonated apatite displaying the heaviest Ca isotopic composition.

With the growing interest in fossil bio-apatite calcium isotope composition for paleoenvironmental reconstructions, an increasing number of studies provide δ -Ca values, mainly $\delta^{44/40}\text{Ca}$ and $\delta^{44/42}\text{Ca}$. The mass difference for $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ is double compared to $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$. The mass-dependent isotope fractionation ratio of the former should therefore be about twice the isotope ratio for the latter but the exact relationship between the two depends

on the fractionation mechanism involved, equilibrium or kinetic. We calculated the factor between our theoretical $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ and $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$ β -factors for calcite and hydroxyapatite. In both cases, a 2.10 factor ($\delta^{44/40}\text{Ca} = 2.10 \times \delta^{44/42}\text{Ca}$) is obtained from theoretical computation of calcium β -factors, identical to the equilibrium value previously obtained by Young et al. (2002) using the formula $\frac{1/m_{44}\text{Ca} - 1/m_{40}\text{Ca}}{1/m_{44}\text{Ca} - 1/m_{42}\text{Ca}}$. It differs from the 2.05 factor obtained for a kinetic isotope fractionation mechanism (Young et al., 2002; Gussone et al. 2016).

Calcium atoms in apatite exist in two coordination polyhedra (Hughes et al. 1989, 1990). Ca(I) resides at the centre of a trigonal prism involving 9 oxygen atoms whereas Ca(II) is bound to 6 oxygen atoms and one column anion (OH^- , F^-). Site-specific calcium isotopic fractionation was also investigated (Fig. 3.4b) and shows that while Ca(II) is more susceptible to enrichment in heavy isotope in hydroxyapatite, the presence of carbonated groups affects the isotopic fractionation properties of nearby Ca sites. The Ca(II) is still heavier than Ca(I) in B-type carbonated fluorapatite whereas A-type carbonate substitution leads to a preference of the Ca(I) sites for the heavy isotopes. From hydroxyapatite to B-type carbonated hydroxyapatite, the difference in β -factor between Ca(II) and Ca(I) remains about the same, with carbonate substitution lowering both values equally. Replacement of structural channel hydroxyls by fluoride ions reduces the difference between Ca(II) and Ca(I) by half.

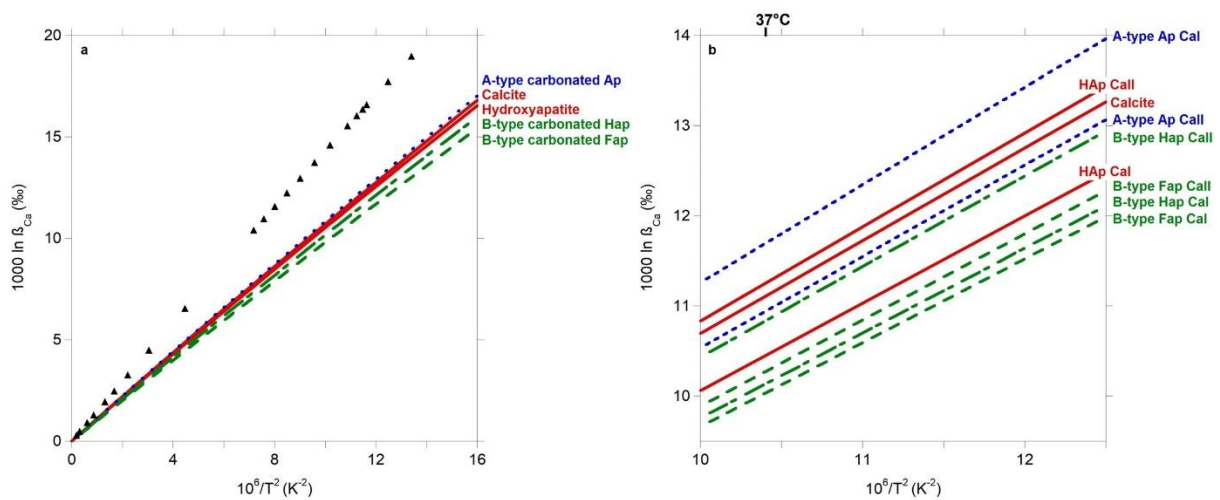


Figure 3.4 a. Calcium isotope ($^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$) β -factors in calcite, hydroxyapatite, B-type carbonated fluorapatite, B-type carbonated hydroxyapatite and A-type carbonated apatite. Solid triangles correspond to calcite-type molecular cluster calculated using the B3-LYP functional (Rustad et al. 2010). **b.** Calcium ($^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$) β -factors in calcite and for Ca(I) and Ca(II) sites in hydroxyapatite, B-type carbonated fluorapatite, B-type carbonated hydroxyapatite and A-type carbonated apatite between 10°C and 40°C .

3.5 Discussion

3.5.1 Equilibrium isotopic fractionation of oxygen $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$

3.5.1.1 Carbon dioxide/liquid water oxygen isotope fractionation

As direct calculation of the reduced partition function ratio of liquid water is computationally very demanding (eg Pinilla et al. 2014), we used the same hybrid approach as Méheut et al. (2007) and calculated the CO_2 /liquid water fractionation from the theoretical CO_2 /water vapour fractionation and the experimental liquid/vapour fractionation for water determined by Horita and Wesolowski (1994). Theoretical oxygen isotopic fractionation between carbon dioxide and liquid water (Fig 3.5) differs by $\sim 3\text{‰}$ from experimental measurements (Bottinga and Craig 1969) and calculations from Richet et al. (1977) at 25 °C , an error arising from the $\sim 2.5\text{‰}$ lower theoretical β -factor value obtained for CO_2 (Fig 3.1). The hybrid approach involving experimental liquid/vapour fractionation thus yields sound comparison between our calculations and experimental values, and the same approach was used to obtain oxygen fractionation between mineral phases and liquid water.

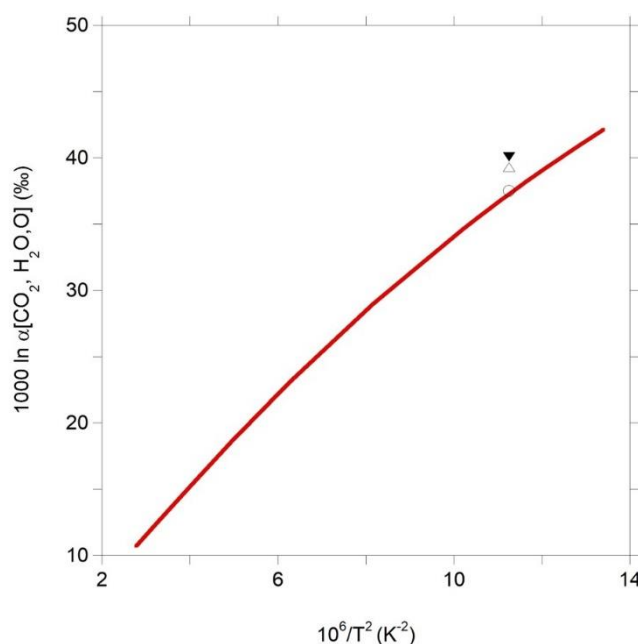


Figure 3.5 Theoretical oxygen isotope fractionation factor between gaseous carbon dioxide and liquid water (solid line). Experimental oxygen fractionation factors measured by Bottinga and Craig 1969 (solid downward triangle) Oxygen fractionation factor between CO_2 and H_2O determined from β -factors calculated using experimental molecular constants and anharmonic calculations by Richet et al. (1977, open upwards triangle) and Urey (1947, open circle) at 25 °C .

3.5.1.2 Mineral/liquid water oxygen isotope fractionation: calcite and structural phosphate in apatite

Two different empirical bio-apatite phosphate-water equations have been reported in the literature (Kolodny et al. 1983, Pucéat et al. 2010). The $\sim 2\text{‰}$ offset between the equation of

Pucéat et al. (2010) and previous determination by Kolodny et al. (1983) is related to differences in analytical methods (modern analysis of Ag_3PO_4 replaced fluorination of BiPO_4) and in values used for the NBS SRM 120c standard. The deviation observed between these equations and our calculation for hydroxyapatite phosphate – liquid water fractionation ($\sim 7\text{‰}$ compared to Kolodny et al. 1983 and $\sim 8.5\text{‰}$ compared to Pucéat et al. 2010) is similar to that observed for the calcite-water fractionation (Fig. 3.6). Between 10 and 40 $^\circ\text{C}$ the difference between calculation and measurements of oxygen isotope fractionation between calcite and liquid water (Kim and O’Neil 1997) is about 6.5 ‰ (Fig 3.6). This suggests that these differences are systematic and mostly related to the underestimation of frequencies of the vibrational modes in the solid phase calculated using the PBE functional. This sustains the model by which equilibrium between dissolved phosphate, apatite and water at low temperatures would be driven by catalytic mechanisms (Blake et al. 2005; Liang and Blake 2007). Note that the fractionation between dissolved phosphate and apatite at low temperatures could also depend on the different dissolved phosphate species (e.g. H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}) in solution with respect to pH. Zheng (2016) also calculated apatite phosphate - water fractionation using an increment method based on the correlation between bond strength and isotopic fractionation. The related values are however different since the assumptions made are not comparable with that of DFT calculations.

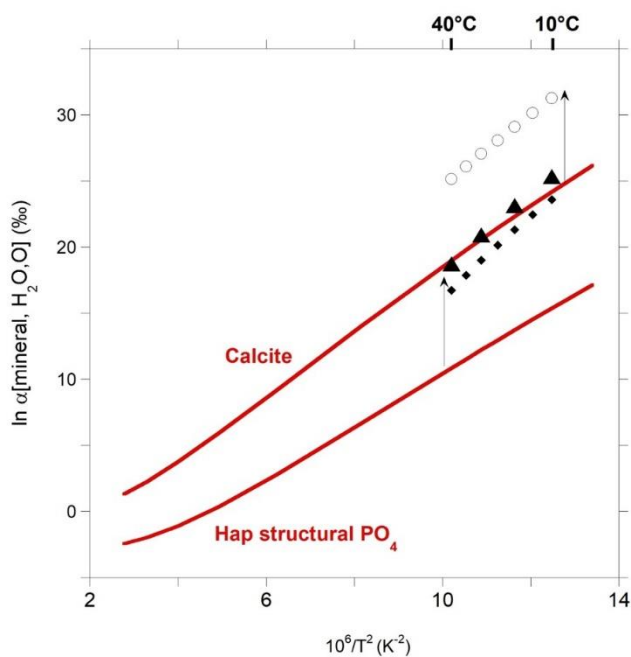


Figure 3.6 Theoretical oxygen isotopic fractionation factor between calcite or hydroxyapatite phosphate (solid lines) and liquid water $\text{H}_2\text{O}(l)$ for temperatures below T_c , the critical temperature of liquid water. Experimental calcite-water equation (Kim and O’Neil 1997, open circles), phosphate-water equation from Kolodny et al. (1983, solid diamonds) and Pucéat et al. (2010, solid triangles) between 10 and 40 $^\circ\text{C}$. Vertical arrows facilitate the visual comparison by pointing to the corresponding experimental values.

3.5.1.3 Oxygen isotope fractionation between structural carbonate in apatite and liquid water

The slope for experimental calcite - liquid water fractionation measured by Kim and O'Neil (1997) between 10 and 40 °C (Fig 3.7a) is well reproduced by the theoretical calculations. An offset of 6.5 ‰ allows for the theoretical fractionation values to match the absolute experimental values (Fig 3.7b). Oxygen isotope fractionation between B-type carbonated apatite and liquid water is close to that of calcite and water. The occupancy of the structural channels in B-type carbonated apatite by either OH⁻ or F⁻ ions does not affect the B-type carbonate / liquid water fractionation. Fractionation factors for A-type carbonated apatite are about 6 ‰ higher than those of B-type. As a result, both theoretical A-type carbonated apatite fractionation and experimental calcite-water fractionation curves seem to coincide but this is merely due to a compensation of the offset. If all theoretical fractionation curves are shifted by +6.5 ‰ so that theoretical and experimental calcite - liquid water fractionation curves coincide, a situation shown in Fig 4.7b, theoretical B-type carbonated apatite - liquid water fractionation then matches very well the measurement of Lécuyer et al. (2010) at 40 °C. At 10 °C, however, the calculated equilibrium fractionation is then ~3 ‰ lower than the experimental value. Based on the equilibrium fractionation factors, we calculate that the equilibrium fractionation factor coinciding with the value of Lécuyer et al. (2010) at 10 °C can be obtained for a carbonate-bearing apatite with roughly one third A-type and two thirds B-type carbonates. At 20 °C the experimental value is matched for a carbonate-bearing apatite with one quarter A-type and three quarters B-type carbonates. Accordingly, a possible explanation for the steeper slope observed by Lécuyer et al. (2010) in comparison to other experimental carbonate/water equations (Kim and O'Neil 1997) and our theoretical equation, could be the variation of the A/B carbonate ratio with temperature. Note that these A/B ratios are consistent with the dominant nature of B-type substitution in natural carbonate-bearing bioapatites.

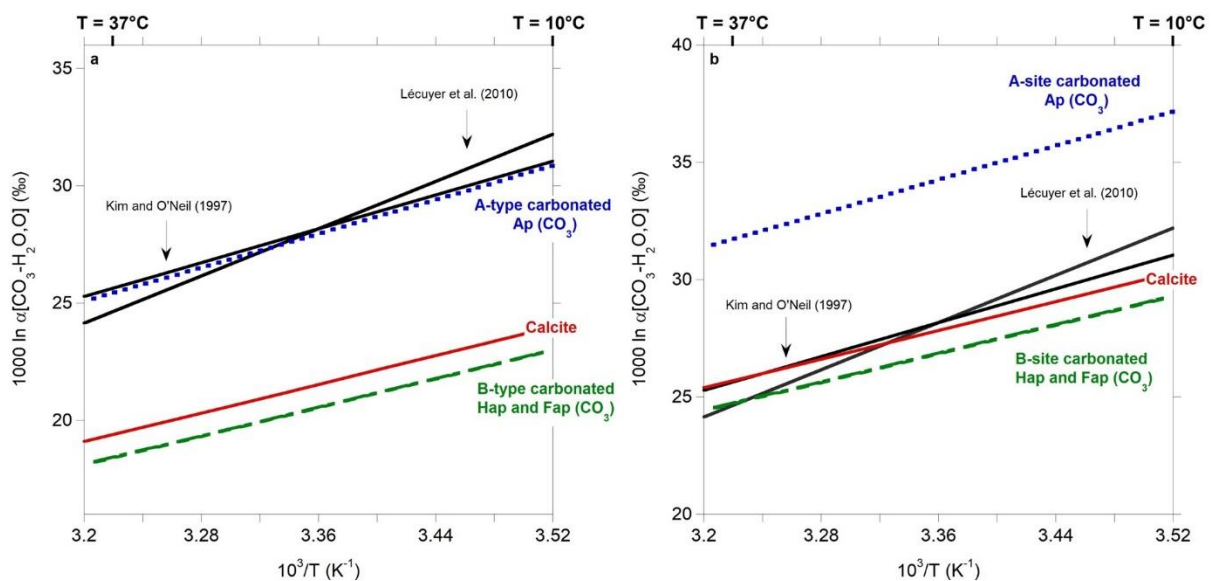


Figure 3.7 a. Theoretical oxygen isotopic fractionation factor between carbonate in calcite or in carbonate-bearing apatites and liquid water compared to experimental fractionation between inorganic hydroxyapatite carbonate and water (Lécuyer et al. 2010) and the inorganic calcite-water equation (Kim and O’Neil, 1997) in the range 10-40 °C. **b.** Theoretical oxygen isotope fractionation curves between various apatite phases (A-type carbonated hydroxyapatite, B-type carbonated hydroxyapatite and B-type carbonated fluorapatite) and $H_2O_{(l)}$ shifted by +6.5 ‰.

3.5.1.4 Hydroxyapatite oxygen internal fractionation

Internal fractionation of oxygen isotopes between sites belonging to a hydroxyl group and sites belonging to a phosphate group was computed from site specific β -factors in hydroxyapatite and in B-site carbonated hydroxyapatite (Fig 3.8). Note that some uncertainties of the theoretical models are expected to be more efficiently compensated when calculating internal fractionation factors (i.e. isotopic fractionation between two different sites in the same material). The theoretical fractionation between non hydroxyl and hydroxyl sites, 36.5 ‰ at 25 °C, is significantly more important in hydroxyapatite than in kaolinite, for which Méheut et al. (2007) calculated a 12 ‰ fractionation factor at 25 °C. In B-type carbonate-bearing models, phosphate is lighter than in non-carbonated hydroxyapatite, resulting in a smaller internal fractionation with hydroxyl (cf Table 3.2).

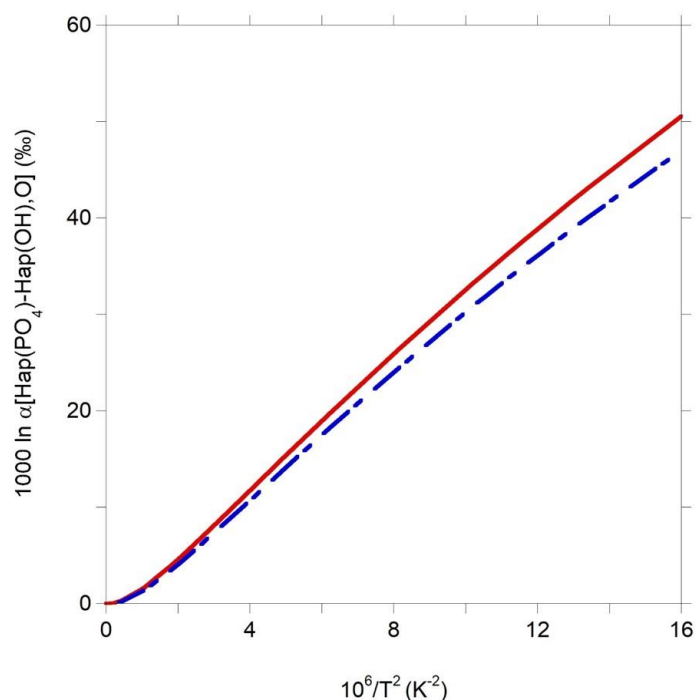


Figure 3.8 Theoretical phosphate/hydroxyl oxygen intracrystalline fractionation factor in hydroxyapatite (solid line) and in B-type carbonated hydroxyapatite (dash-dot line).

3.5.1.5 Oxygen isotope fractionation between structural carbonates and phosphates in apatite

High temperature theoretical oxygen isotope fractionation between calcite and hydroxyapatite differ by less than 0.7 ‰ from values of Fortier and Lüttge (1995) (Fig. 3.9). Carbonate substituted to channel ions is isotopically heavier than carbonate substituted to phosphate, leading to a higher oxygen intracrystalline isotopic fractionation with phosphate, by ~6 ‰ at 300 K. Theoretical carbonate - phosphate fractionation in carbonated fluorapatite at 37 °C, 8.47 ‰, compare with the measurements of Bryant et al. (1995) and Iacumin et al. (1996) on biogenic apatites, 8.56 ‰ and 8.86 ‰ respectively. This further sustains the use of the B-type carbonated apatite model investigated in this work as a representative proxy for investigating the isotopic properties of natural B-type carbonate-bearing bio-apatites. Phosphate oxygen isotope ratio is considered less susceptible to diagenetic alteration than carbonate isotope ratio since the oxygen in P-O bonds is very resistant to inorganic isotopic exchange with aqueous fluids (Lécuyer et al 1999, Sharp et al. 2000, Zazzo et al. 2004a). In contrast, during biologically-mediated reactions, the kinetics of microbially-induced oxygen isotope exchange between phosphate and water is faster than between carbonate and water (Zazzo et al. 2004a). Oxygen isotope fractionation between phosphate and carbonate in apatite is thus thought to be a test for diagenetic alteration (Iacumin et al. 1996; Zazzo et al. 2004b), with samples deviating from the mean carbonate-phosphate fractionation ratio considered to be diagenetically altered. The commonly mean value reported in the literature for carbonate - phosphate fractionation in modern and preserved fossil bio-apatites, $\Delta^{18}\text{O}_{\text{C-P}} \sim 9 \text{ ‰}$ (Martin et al., 2008), is consistent with the 8.5 ‰ fractionation factor calculated here at 37°C between carbonate and phosphate in carbonated fluorapatite. The carbonate-phosphate relationship displays a natural variability (e.g. inter-species differences, inter-laboratory differences) and Pellegrini et al. (2011) advise caution in using a constant offset between carbonate and phosphate, especially when converting bioapatite $\delta^{18}\text{O}_{\text{C}}$ to $\delta^{18}\text{O}_{\text{P}}$. Indeed, Tütken (2014) found $\Delta^{18}\text{O}_{\text{C-P}}$ offsets ranging from 7 to 10 ‰ in a series of Eocene well-preserved vertebrate fossils. Lécuyer et al. (1999) found a mean $\Delta^{18}\text{O}_{\text{C-P}} \sim 8 \text{ ‰}$ in a series of recent phosphorites but observed deviations from the mean value with increasing age that could possibly be related to diagenesis.

Carbonate/phosphate fractionation factors calculated from carbonate (Lécuyer et al. 2010) and phosphate (Kolodny et al. 1983) equations at 37 °C and 10 °C imply a stronger temperature dependence of the carbonate/phosphate fractionation than what our calculations suggest for equilibrium fractionation in this temperature range. As discussed above on the basis of mineral-water fractionation curves, this effect could be due to the temperature dependent incorporation of a fraction of carbonate groups in A sites.

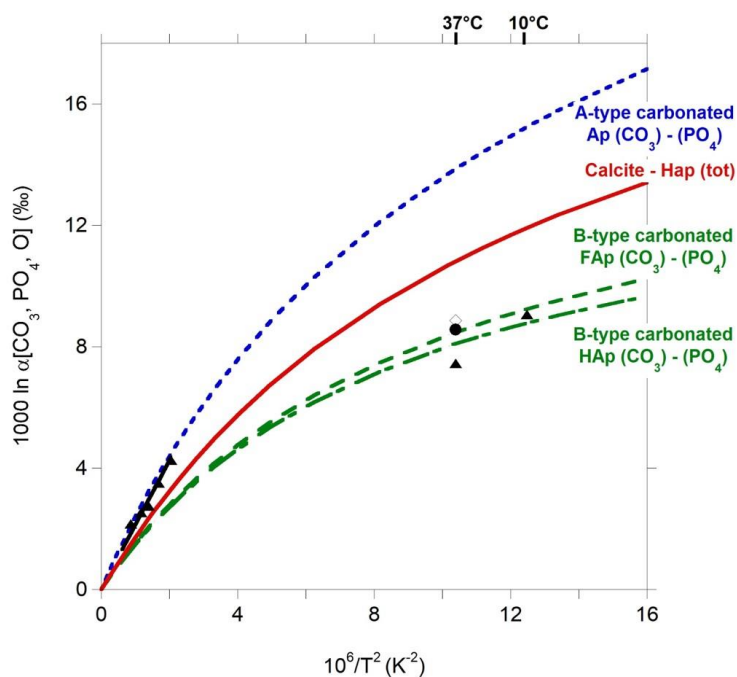


Figure 3.9 Theoretical internal oxygen isotope fractionation factor between oxygen atoms belonging to carbonate sites only (CO_3) and oxygen atoms belonging to phosphate sites only (PO_4) in B-type carbonated fluorapatite (dashed line), in B-type carbonated hydroxyapatite (dash-dot line) and in A-type carbonated apatite (dotted line). Theoretical oxygen isotope fractionation factor between calcite and hydroxyapatite with all oxygen sites (OH and PO_4) taken into account. Experimental high temperature oxygen isotope fractionation between calcite and inorganic hydroxyapatite by Fortier and Lüttge (1995) (solid triangles) and linear regression through the origin of high temperature data from Fortier and Lüttge (1995) by Chacko et al. (2001) (black solid line). Experimental isotope fractionation factors between phosphate and structural carbonate determined from bone and tooth samples of modern mammals at 37 °C by Bryant et al. (1996, solid circle) and Iacumin et al. (1996, open diamond). Experimental isotope fractionation factors between phosphate and structural carbonate determined at 10 °C and 37 °C using carbonate values from Lécuyer et al. (2010) and phosphate values from Kolodny et al. (1983) (solid triangles).

3.5.2 Equilibrium isotopic fractionation of carbon $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

High temperature carbon isotope fractionation values between carbon dioxide and calcite can be compared with data from Chacko et al. (1991). The inflexion point of the fractionation curve is calculated at around $T = 430$ °C. At low temperatures, calculated carbon isotope fractionation factors are higher than experimentally determined values (Romanek, 1991) (Fig 3.10). Here, it can be noticed that in this specific system, the cross-over between the CO_2 and calcite β -factor curves may amplify the relative discrepancy between theoretical and experimental fractionation factors.

Carbon isotope fractionation between calcite and carbonate-bearing apatite phases is ~ 4 ‰ at 300 K. B-type carbonated apatites are depleted in ^{13}C while A-type carbonated apatite is enriched in ^{13}C relative to calcite (Fig 3.11). Once again the substitution site for carbonate in apatite affects the isotopic properties of the apatite - calcite system. A major question pertains

to the alteration mechanisms of bio-apatite, particularly whether they involve dissolution - recrystallization of biogenic apatites in favour of a phase approaching carbonated fluorapatite or rather leaching of channel ions and their replacement by fluoride (Kolodny et al. 1996; Zazzo et al. 2004b; Pasteris et al. 2009; Trueman and Tuross 2002; Kohn 2008; Kohn and Moses 2013). Results shown in Fig. 3.11 suggest that, ionic exchange at A-site and leaching of channel carbonate could deplete apatite in the heavy isotope.

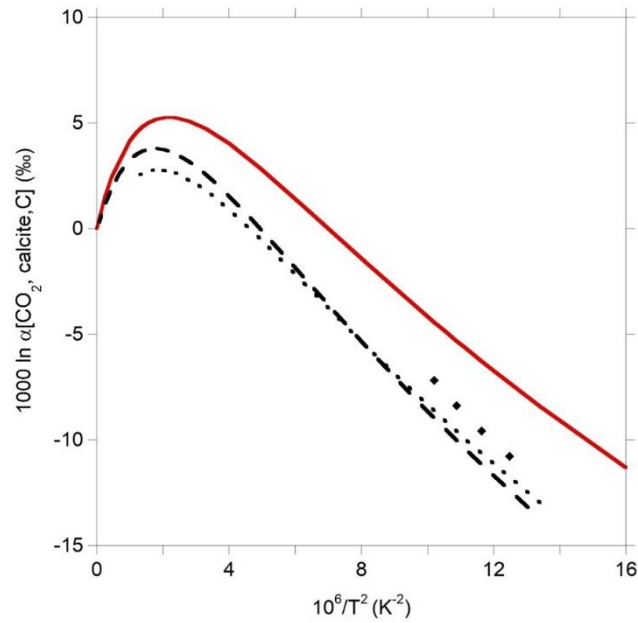


Figure 3.10 Theoretical carbon isotope fractionation factor between carbon dioxide and calcite (solid line). Experimental carbon fractionation factors at low temperatures by Romanek et al. (1991, solid diamonds) and calculated carbon isotope fractionation factors from Chacko et al. (1991, dashed line) and Bottinga (1967, dotted line).

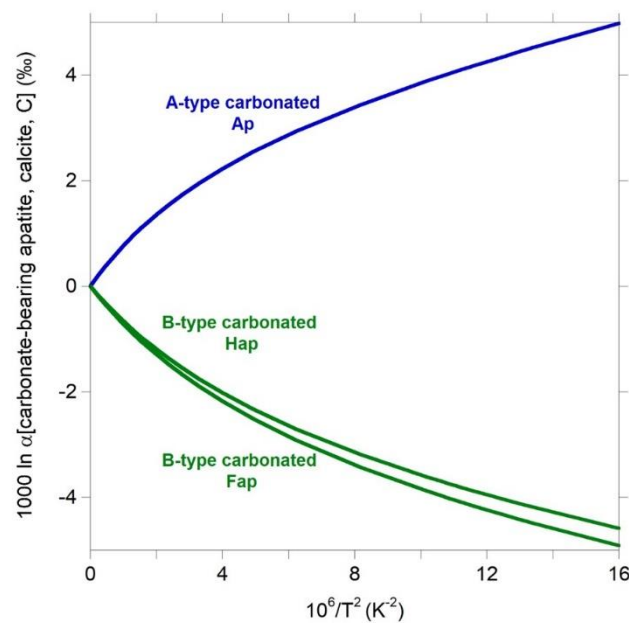


Figure 3.11 Theoretical carbon isotope fractionation factor between B-type carbonated fluorapatite, B-type carbonated hydroxyapatite or A-type carbonated apatite and calcite.

3.5.3 Equilibrium isotopic fractionation of calcium $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$

Calcium isotope fractionation between apatite phases and calcite is very small and falls within 1.5 ‰ (Fig 3.12a). Interestingly, hydroxyapatite and B-type carbonated apatites are depleted in heavy isotope while A-type carbonated apatite is to a small extent enriched in ^{44}Ca relative to calcite. Though Ca is not as closely related to the carbonate group as oxygen and carbon, the substitution site for carbonate in apatite still has an impact on the calcium isotope fractionation properties of apatite. If the equilibrium fractionation between $\text{Ca}^{2+}_{(\text{aq})}$ and calcite is almost nil, as suggested by Fantle and De Paolo (2007), theoretical equilibrium fractionation factors between apatite and calcite should match those of apatite and aqueous calcium. At equilibrium, the fractionation factor between hydroxyapatite and calcite is also weak (-0.17 ‰ at 37 °C, -0.21 ‰ at 10 °C). The variability of calcium fractionation factors calculated at $T = 37\text{ °C}$ (Table 3.3) may contribute to the range of $\delta^{44/40}\text{Ca}$ measured in vertebrates modern and fossil bio-apatite samples, between +0.7 and -2.7 ‰ (Gussone et al. 2016). Schmitt et al. (2003) showed similar Ca isotopic trends in Miocene marine calcium phosphates and carbonates with a small positive fractionation between hydroxyapatite and calcite (<0.2 ‰ for the recent samples). A small magnitude of Ca isotopic fractionation between apatite and calcite is therefore sustained by both theoretical modelling and measurements on natural samples.

Calcium isotope fractionation between hydroxyapatite and $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ is close to zero (Table S4), which differs from the enrichment in ^{44}Ca in phosphates relative to free Ca^{2+} calculated by Moynier and Fujii (2017). The presently calculated fractionation factor between B-type carbonated apatite and $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, -0.78 ‰ at 37 °C, is consistent with enrichment in ^{44}Ca observed in blood relative to bone, on average $\sim 0.7\text{ ‰}$ (Skulan and DePaolo 1999, Tacail et al. 2014). However, long-range solvation effects and potential contribution of hepta-coordinated Ca species in solution could decrease the reduced partition function ratio of Ca with respect to that of the $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ cluster (Rustad et al. 2010; Moynier and Fujii 2017). In addition, theoretical results only involve inorganic equilibrium isotopic fractionation and their extrapolation to biological processes involving a complex biomaterial such as bone should be subject to caution. The present results also indicate that long range periodicity should be taken into account for the modelling of the isotopic fractionation properties of minerals while the use of clusters could provide a more appropriate description of ionic and molecular structures in solution.

In hydroxyapatite, higher fractionation takes place at the seven-fold coordinated Ca(II) site than at the nine-fold coordinated Ca(I) site. This is consistent with the work of Colla et al. (2013) who observed a correlation between calcium isotope fractionation and coordination number between solvated calcium ions and their solid hydrates, concluding that low-coordination environments result in heavier isotopic compositions, in agreement with the general rule of thumb (Schauble 2004; Blanchard et al. 2017). In the carbonate-bearing models,

the presence of the carbonate group affects both the Ca(I) and Ca(II) sites (Fig. 3.12 b). Although the B-type substitution affects the average values of reduced partition function ratio of Ca in the H-apatite model by less than 0.6 ‰ (Fig. 3.4b), a site-by-site analysis reveals a range of variation exceeding 3 ‰. A similar range of variation is observed in the F-bearing model, with a decrease in the reduced partition function ratio of the Ca(II) site reaching 1.25 ‰. This stronger variation may be due to the presence of two fluorine atoms in the coordination polyhedron of Ca(II) in B-type carbonated fluorapatite. In A-type carbonated apatite, the range of variation of the Ca reduced partition function ratio reaches 4.5 ‰. This is due to the relatively high values of the reduced partition function ratios (>16.5 ‰) observed for the two Ca(I) sites not located in the same plane as the C atom ($z = 1/2$) but on the $z = 0$ plane. Because of the steric hindrance due to the addition of one oxygen belonging to the carbonate group, the distances between the Ca atom and the oxygen atoms located in the trigonal prism of their nine-fold coordination polyhedron are shorter than in pure hydroxyapatite (2.37 Å vs 2.42 Å, respectively). As shorter bonds tend to be stiffer this could favour enrichment in heavy isotopes. Although it is difficult to extract definite trends from the present theoretical results, carbonate substitution in the apatite structure has an effect on the Ca isotopic fractionation properties of apatite and could contribute to the variability measured in natural samples. In any case, the present results suggest that the use of phosphates as a record of seawater Ca isotope composition should be supported by a detailed assessment of their crystal-chemical characteristics to reduce the related variability in isotopic fractionation factors. Rather than dismissing calcium phosphate as a proxy when discrepancies arise, interpreting differences in a multi-proxy approach may actually unravel information about the Ca cycle (Fantle and Tipper 2014) and encourage to investigate Ca isotopic records in phosphates as well as carbonates.

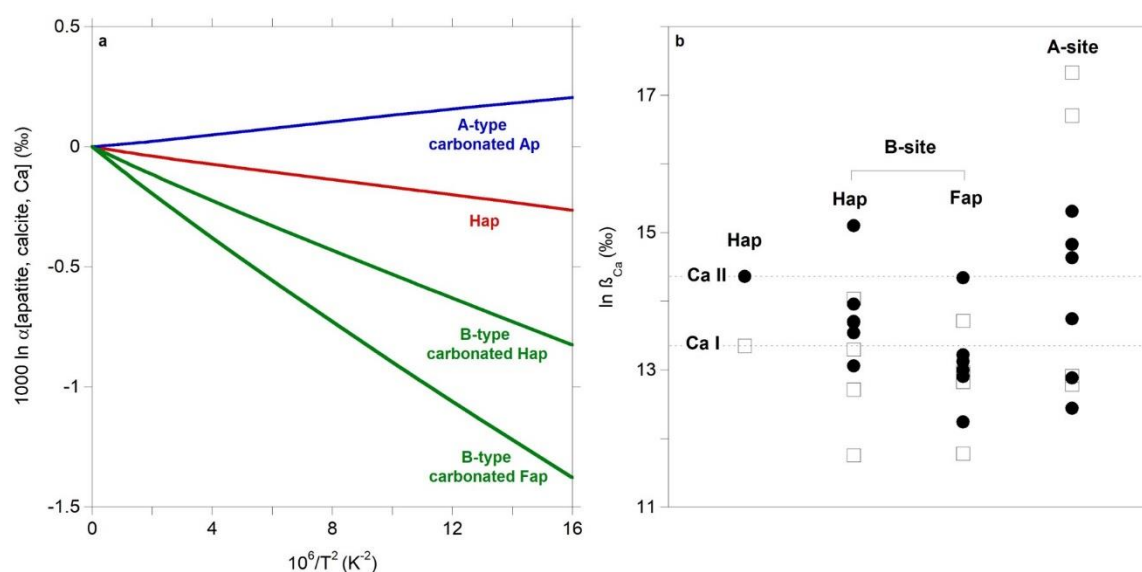


Figure 3.12 a. Theoretical calcium isotope fractionation factor between the various apatite models (hydroxyapatite, B-type carbonated fluorapatite, B-type carbonated hydroxyapatite and A-type carbonated apatite) and calcite. **b.** Theoretical calcium β -factor values at 273 K of Ca(I) and Ca(II) sites

in hydroxyapatite and for each Ca atom in B-site carbonated hydroxyapatite, B-site carbonated fluorapatite and A-site carbonated apatite.

Table 3.3 Logarithm of calcium isotope fractionation factors (‰) between hydroxyapatite, B-type carbonated hydroxyapatite, B-type carbonated fluorapatite or A-type carbonated apatite and calcite at $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

	1000 $\ln \alpha$ (apatite, calcite, Ca)
Hydroxyapatite	-0.17 ‰
B-type carbonated hydroxyapatite	-0.55 ‰
B-type carbonated fluorapatite	-0.93 ‰
A-type carbonated apatite	+0.14 ‰

3.6 Conclusion

In the present study, we have theoretically investigated the equilibrium isotopic fractionation properties of apatite which could help to discuss equilibrium vs. kinetic effect in the record of the isotopic composition associated with processes involving solids and aqueous solutions. The theoretical results revealed differences in oxygen, carbon and calcium isotope fractionation depending on the substitution site for carbonate in apatite. A-type and B-type substitution of carbonates (channel ion substitution and phosphate ion substitution respectively) are distinguishable by their isotopic properties, the A-type carbonate model being comparatively enriched in heavy isotopes (^{18}O , ^{13}C , ^{44}Ca). Beside the inter-site isotopic fractionation potentially occurring during the formation of minerals, this also demonstrates the importance of investigating site-specific isotopic fractionation alongside substitution and mineral transformation mechanisms (e.g. Putnis 2009) during diagenesis in order to assess the degree of preservation of the original isotopic signal in apatite, an important limitation for successful paleoenvironmental and paleoclimatic studies based on stable isotope analysis of fossils.

Acknowledgments

This work was performed using HPC resources from GENCI-IDRIS (Grants i2106041519). This work was supported by French state funds within the framework of the Cluster of Excellence MATISSE led by Sorbonne Universités and also by CNRS TelluS INSU 2017 INTERRVIE. We thank three anonymous reviewers and associate editor Ruth E. Blake for their thoughtful comments.

Supplementary Material

Table S1 Logarithm of the oxygen β -factor (‰) of hydroxyapatite and calcite at $T = 300\text{K}$. The dynamical matrix is first computed exactly on a $m \times m \times m$ grid of \mathbf{q} -vectors. The vibrational partition function is then obtained performing the product of Eq. (2) on a $n \times n \times n$ grid after Fourier interpolation of the interatomic force constants. The dynamical matrices are computed exactly on a $3 \times 3 \times 3$ \mathbf{q} -points grid for hydroxyapatite and calcite and only at Γ for water and CO_2 . The vibrational partition function is then obtained performing the product on a $3 \times 3 \times 3$ grid for hydroxyapatite and a $4 \times 4 \times 4$ grid for calcite.

	Hydroxyapatite	Calcite
	$m = 3$	$m = 3$
$n = 3$	80.4056	91.2112
$n = 4$	80.4037	91.6213
$n = 5$	-	91.6216
$n = 6$	80.4028	-

Table S2 Calculated and experimental vibrational frequencies (cm^{-1}) for calcite, hydroxyapatite, water and CO_2 . ^aExperimental data from, Hellwege et al. (1970) for calcite, Rehman and Bonfield (1997) for hydroxyapatite, Allen (1990) for CO_2 , Khachkuruzov (1959) and Lide (1998) for H_2O harmonic and anharmonic frequencies, respectively. ^bOther theoretical data are PBE frequencies from Méheut et al. (2007) for H_2O .

Mineral	Mode	This work	^a Experimental	^b Other theoretical
Calcite	A_{1g}	1056.1	1088	
	E_g	144.5	156	
	E_g	257.42	283	
	E_g	684.03	714	
	E_g	1391.6	1432	
	A_{2u}	105.86	92	
	A_{2u}	274.94	303	
	A_{2u}	833.87	872	
	E_u	98.807	102	
	E_u	204.40	223	
	E_u	266.02	297	
	E_u	683.78	712	
	E_u	1360.9	1407	
	A_{2g}	170.79	173	
Hydroxyapatite	$\nu_3 \text{PO}_4 \text{A}$	973.8	976	
	$\nu_3 \text{PO}_4 \text{E}$	1031.72	1091	
	$\nu_3 \text{PO}_4 \text{E}$	1031.72	1042	
	$\nu_1 \text{PO}_4 \text{E}$	979.1	962	
	$\nu_4 \text{PO}_4 \text{A}$	532.3	520	
	$\nu_4 \text{PO}_4 \text{A}$	552.6	566	
	$\nu_4 \text{PO}_4 \text{E}$	614.02	602	
	$\nu_4 \text{PO}_4 \text{E}$	614.02	632	
	$\nu_2 \text{PO}_4 \text{E}$	451.5	462	
	OH stretching	3637.62	3570	
CO_2	Bond bend	647.14	672.9	
	Symetric stretch	1314.18	1353.8	
	Asymetric stretch	2338.89	2396.5	
H_2O	Bond bend	1594.61	1648 ^h - 1595 ^{anh}	1586
	Symetric stretch	3696.31	3835 ^h - 3657 ^{anh}	3640
	Asymetric stretch	3810.00	3939 ^h - 3756 ^{anh}	3747

Table S3 Fits of $1000 \ln \beta$ based on $ax + bx^2 + cx^3 + dx^4$ function with $x = 10^6/T^2$

Element	Mineral	T(°C)	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>
¹⁸ O/ ¹⁶ O	H ₂ O _(g)	0-130	10.720	-0.83723	0.043011	-0.00088029
	H ₂ O _(g)	>130	15.610	-3.9038	0.74186	-0.056639
	CO _{2(g)}		15.989	-1.1166	0.070077	-0.0018682
	Hydroxyapatite (tot)		8.9026	-0.19119	0.0037023	
	Hydroxyapatite (PO ₄)		9.0696	-0.17697	0.0030986	
	Hydroxyapatite (OH)	0-130	6.6240	-0.38263	0.019586	-0.00040278
	Hydroxyapatite (OH)	>130	8.9130	-1.813	0.34435	-0.026233
	Calcite		10.685	-0.28537	0.0059184	
	A-type carbonated Ap (tot)		9.3727	-0.19219	0.0034841	
	A-type carbonated Ap (PO ₄)		9.1030	-0.17627	0.0030731	
	A-type carbonated Ap (CO ₃)		11.530	-0.31961	0.0067737	
	B-type carbonated FAp (tot)		9.1105	-0.18438	0.0033118	
	B-type carbonated FAp (PO ₄)		8.9088	-0.17187	0.0029887	
	B-type carbonated FAp (CO ₃)		10.455	-0.26777	0.0054671	
	B-type carbonated HAp (tot)		8.9893	-0.19989	0.00395	
	B-type carbonated HAp (PO ₄)		8.9599	-0.17318	0.0030149	
	B-type carbonated HAp (CO ₃)		10.475	-0.26978	0.0055194	
	B-type carbonated HAp (OH)	0-130	6.7808	-0.38299	0.019587	-0.00040282
	B-type carbonated HAp (OH)	>130	9.0721	-1.8151	0.34481	-0.026273
	¹³ C/ ¹² C	Calcite		23.379	-1.1318	0.052278
A-type carbonated Ap			24.202	-1.2159	0.057551	-0.0012149
B-type carbonated FAp			22.609	-1.0619	0.048219	-0.00099516
B-type carbonated HAp			22.670	-1.0683	0.048615	-0.0010045
⁴⁴ Ca/ ⁴⁰ Ca	Hydroxyapatite (tot)		1.0853	-0.0032582		
	Hydroxyapatite (CaI)		1.0367	-0.00305		
	Hydroxyapatite (CaII)		1.1177	-0.0034021		
	Calcite		1.1039	-0.0034105		
	A-type carbonated Ap (tot)		1.1162	-0.0033551		
	A-type carbonated Ap (CaI)		1.1610	-0.0034923		
	A-type carbonated Ap (CaII)		1.0863	-0.0032685		
	B-type carbonated FAp (tot)		1.0067	-0.0026882		
	B-type carbonated FAp (CaI)		0.99445	-0.0028264		
	B-type carbonated FAp (CaII)		1.0148	-0.0026003		
	B-type carbonated Hap (tot)		1.0467	-0.0030308		
	B-type carbonated Hap (CaI)		1.0046	-0.0028651		
	B-type carbonated Hap (CaII)		1.0748	-0.0031459		

Fits reproduce calculated β -factors within 0.12‰ for oxygen, 0.17‰ for carbon and 0.01‰ for calcium.

Table S4 Theoretical equilibrium calcium isotope fractionation factors between apatite and $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ at $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$

	1000 $\ln \alpha$ (‰)
$[\text{CaH}_2\text{PO}_4(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} - [\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (Moynier and Fujii, 2017)	+1.17
Hap - $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$	-0.03
A-type Carbonated Ap - $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$	+0.28
B-type Carbonated Hap - $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$	-0.41
B-type Carbonated Fap - $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$	-0.78

Chapitre 4 : Modélisation des spectres ATR-FTIR

La spectroscopie FTIR est utilisée de façon routinière dans de nombreuses études pour décrire aussi bien l'état diagénétique de l'os, en amont d'analyses isotopiques permettant la datation des squelettes ou la reconstitution d'environnements passés, que son état pathologique dans des perspectives biomédicales (ostéoporose, ostéogénèse imparfaite etc.).

Toutefois, une limitation importante de la spectroscopie FTIR réside dans une compréhension sommaire des principes physiques impliqués dans cette approche spectroscopique. En effet, celle-ci se limite souvent à la détermination d'indices de cristallinité empiriques, impliquant des rapports de largeurs de raies IR et ne permettant pas d'identifier précisément les mécanismes des transformations à l'échelle moléculaire.

De plus, l'acquisition des spectres infrarouge en mode ATR, comme alternative à la plus classique transmission, est de plus en plus populaire du fait de sa rapidité de mise en œuvre. Cependant, du fait de géométries et de natures de l'échantillon différentes en transmission et en ATR (exposées dans le Chapitre 2), la comparaison entre des spectres obtenus avec les deux modes d'acquisition n'est pas immédiate.

Il nous a donc paru important en premier lieu de s'intéresser aux phénomènes physiques mis en jeu lors de l'acquisition de spectres ATR-FTIR pour mieux comprendre les paramètres gouvernant la forme des bandes ATR. Cette approche fondamentale reposant sur la modélisation des spectres ATR-FTIR a pour objectif de construire une base solide pour l'interprétation des signatures spectroscopiques recueillies sur des échantillons altérés lors d'expérience de diagénèse expérimentale (Chapitre 5) et in fine de mieux interpréter les enregistrements fossiles (Chapitre 6).

Ce chapitre s'articule en deux sous-parties :

Dans un premier temps, la stratégie utilisée pour modéliser les spectres ATR-FTIR de l'apatite est présentée à travers un article publié dans le journal *Physics and Chemistry of Minerals*. Celle-ci repose sur la construction d'une fonction diélectrique effective qui reproduit la réponse électrostatique de l'échantillon en poudre à partir des propriétés diélectriques des constituants individuels (apatite, air) en tenant compte de paramètres macroscopiques caractéristiques de l'échantillon (forme et taille des particules, porosité). A ce titre, les propriétés de deux modèles de milieu effectif brièvement introduits au Chapitre 2, Maxwell-Garnett et Bruggeman, sont comparées.

Cette stratégie de modélisation est ensuite appliquée à des échantillons d'os actuels et archéologiques présentant divers degrés de préservation du collagène, au travers d'une lettre parue dans le journal *American Mineralogist*. L'approche du milieu effectif est alors adaptée

pour tenir compte de la nature composite (minéral/organique) des échantillons d'os, ce qui permet d'évaluer l'effet de la matrice organique sur les signatures vibrationnelles de l'apatite.

4.1 Modélisation du spectre ATR-FTIR de l'apatite

4.1.1 Résumé de l'étude

Cette étude porte sur la modélisation des spectres ATR-FTIR de deux échantillons de fluorapatite, l'un synthétique et l'autre naturel. Le spectre ATR est modélisé en calculant le coefficient de réflexion à l'interface entre l'échantillon en poudre et le cristal ATR, caractérisé par son indice de réfraction ($n= 2.4$ pour le diamant et $n=4$ pour le germanium). Les propriétés diélectriques de l'échantillon en poudre, vu comme un composite apatite/air, sont décrites dans une approche de milieu effectif. Deux modèles de fonction diélectrique sont ici comparés, le modèle de Maxwell-Garnett et celui de Bruggeman (cf Section 2.1). La composante apatite est décrite par un tenseur diélectrique axial et la composante air est décrite par une constante diélectrique de valeur 1. Le seul paramètre modulable est ainsi la fraction volumique des deux constituants.

Les spectres ATR Ge et D expérimentaux présentent un certain nombre de différences par rapport au spectre en transmission obtenu pour la même substance : intensités plus faibles, positions des raies décalées vers les plus basses fréquences et forte asymétrie des bandes ATR intenses. Les raies ν_3 et ν_4 PO_4 présentent ainsi un élargissement caractéristique au niveau de la base du pic, vers les plus hautes fréquences. Contrairement au modèle de Maxwell-Garnett qui ne parvient pas à reproduire ces formes de raies, le modèle de milieu effectif proposé par Bruggeman reproduit correctement les propriétés et la forme spécifique des bandes ATR des échantillons de fluorapatite en poudre. Les propriétés mathématiques de la fonction diélectrique effective construite dans ce modèle permettent de comprendre l'origine de ces formes de raies spécifiques. En effet, l'expression de la partie imaginaire de la fonction diélectrique effective de l'échantillon composite, qui donne le spectre ATR, fait intervenir la partie réelle de la fonction diélectrique de la substance apatite, à l'origine d'une distribution des fréquences depuis la position du maximum, la fréquence transverse optique (TO), vers les plus hautes fréquences, jusqu'à la fréquence longitudinale optique (LO). Cela implique que les formes de raies des bandes ATR intenses sont donc principalement déterminées par des effets électrostatiques macroscopiques liés à la nature composite de l'échantillon.

L'accord entre spectre théorique et expérimental est en revanche moins bon pour l'échantillon naturel de fluorapatite, le modèle ne reproduisant pas la diminution d'intensité spectrale observée lorsque l'on passe de l'échantillon synthétique au naturel. Celle-ci résulte probablement d'une plus importante hétérogénéité de l'échantillon naturel sur une échelle supérieure à la longueur d'onde caractéristique du rayonnement IR ($\sim 10 \mu\text{m}$).

Ces résultats montrent que la spectroscopie ATR-FTIR ne fournit pas seulement une information locale sur la microstructure d'un échantillon mais délivre également une information à l'échelle mésoscopique du matériau. Les bandes intenses étant affectées par des effets électrostatiques macroscopiques, ce sont donc les raies de faible intensité qui renseignent réellement sur la structure locale à l'échelle atomique. Ceci sera à prendre en compte dans la suite de ce travail lors de l'interprétation des spectres ATR-FTIR, notamment lorsqu'il s'agira d'extraire des paramètres de cristallinité. Enfin, ces résultats soulignent la complémentarité des informations fournies par les deux types de cristal ATR, le diamant étant plus sensible aux effets électrostatiques que le germanium, une approche double qui sera donc conservée dans la suite de ces travaux.

Article II : Modelling the attenuated total reflectance infrared (ATR-FTIR) spectrum of apatite

Julie AUFORT, Loïc SEGALÉN, Christel GERVAIS, Christian BROUDER, Etienne BALAN
Publié dans le journal *Physics and Chemistry of Minerals* 43 (2016), 615-626

DOI : 10.1007/s00269-016-0821-x

Abstract

Attenuated Total Reflectance (ATR) infrared spectra were measured on a synthetic and a natural fluorapatite sample. A modeling approach based on the computation of the Fresnel reflection coefficient between the ATR crystal and the powder sample was used to analyze the line shape of the spectra. The dielectric properties of the samples were related to those of pure fluorapatite using an effective medium approach, based on Maxwell-Garnett and Bruggeman models. The Bruggeman effective medium model leads to a very good agreement with the experimental data recorded on the synthetic fluorapatite sample. The poorer agreement observed on the natural sample suggests a more significant heterogeneity of the sample at a characteristic length scale larger than the mid-infrared characteristic wavelength, i.e. about 10 micrometers. The results demonstrate the prominent role of macroscopic electrostatic effects over fine details of the microscopic structure in determining the line shape of strong ATR bands.

4.1.2 Introduction

Hard-mode infrared spectroscopy provides a detailed information on the short-range order in minerals (Salje and Bismayer 1997; Salje et al. 2000). It is a particularly relevant technique to investigate a variety of phenomena leading to structural heterogeneity, including the incorporation of molecular impurities (Yi et al. 2014), exsolution processes (Zhang et al. 1996), stacking variations in layered structures (Balan et al. 2010), phase transitions (Salje and Yagil 1996) and cationic ordering (Meyer et al. 2002).

However, the infrared spectra of minerals not only depend on their intrinsic vibrational properties, but are also a function of the sample micro-structure and experimental geometry. In many cases, the spectra are recorded on powder samples and the interplay of the various parameters involved may impede their straightforward interpretation in terms of microscopic structural parameters. This difficulty is particularly apparent when comparing absorption spectra recorded using the traditional pellet method with those obtained using the more recently developed attenuated total reflectance (ATR) infrared spectroscopy. In the first case, the sample consists of particles of the studied mineral diluted in a non-absorbing matrix, usually KBr, and the spectrum is recorded in a transmission geometry. In the second case, the absorption spectrum is recorded in a reflection geometry at the interface between the packed mineral powder and a highly refractive material. ATR thus appears as a very easy experimental procedure which facilitates the acquisition of "absorption-like" infrared spectra by avoiding the multi-step preparation of dry and well-dispersed sample pellets. In many circumstances, it is the only method available to record the infrared spectrum of a given sample. ATR measurements can also be used over a wide frequency range, as attested by measurement of electronic excitations in the near-infrared region (Salje and Güttler 1984). However, the differences in sample nature and experimental configuration lead to significant differences in the signals recorded in transmission or ATR geometry.

In the present study, we adopt a modeling approach to investigate the line shape variations observed in the ATR infrared spectra of selected samples of fluorapatite. Apatite is a widespread calcium phosphate mineral with nominal composition $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH},\text{F},\text{Cl})_2$. It occurs in many different geological contexts. For example, world phosphorus resources mainly consist of sedimentary deposits of carbonate-bearing fluorapatite (Knudsen and Gunter 2002), while carbonate-bearing hydroxyapatite is the major inorganic component of vertebrate skeletons (e.g. Elliott 2002; Reynard and Balter 2014). The flexibility of the apatite structure enables significant chemical variations, among which carbonate group incorporation is of peculiar importance (e.g. Leventouri et al. 2000; Pan and Fleet 2002; Antonakos et al. 2007). Infrared spectroscopy of apatite usually provides two different types of information. The crystalline quality of the samples is assessed from the width of absorption bands due to phosphate vibrational modes. This information is usually obtained from relative spectral intensities in the range of PO_4 bending vibrational modes ($\nu_4 \text{PO}_4$) and reported as an empirical "crystallinity" index (e.g. Shemesh 1990; Weiner and Bar-Yosef 1990; Surovell and Stiner 2001; Pucéat et al. 2004; Trueman et al. 2008; Roche et al. 2010). The other type of information is related to the concentration and location of molecular species, such as carbonate groups, that are detected by specific vibrational bands (e.g. Michel et al. 1995; Fleet and Liu 2008; Fleet 2009; Yi et al. 2014; Chevrin ais et al. 2016). Although the majority of infrared spectroscopic studies of apatite were performed using transmission experiments, recent investigations have used ATR spectroscopy to unravel the modification of biologic apatite during fossilization (e.g.

Stathopoulou et al. 2008; Lebon et al. 2014, Lang et al. 2016) and burning (Thompson et al. 2009). Systematic comparison between transmission and ATR spectra have revealed small but significant differences in the corresponding "crystallinity" index and carbonate to phosphate ratio (Thompson et al. 2009; Beasley et al. 2014).

Our modeling strategy is similar to that previously used by Balan et al. (2002) to model the ATR-FTIR spectrum of aggregates of chrysotile nanotubes. It combines the computation of the frequency-dependent reflection coefficient at the interface between the ATR crystal and the sample, with an effective medium modeling of the dielectric properties of the composite powder sample. The obtained results make it possible to discuss the respective role of the various physical parameters determining the shape of ATR spectrum and to identify the most appropriate effective medium model that accounts for the properties of apatite powders.

4.1.3 Samples and methods

Two reference apatite samples have been investigated. The first one is a pure fluorapatite sample containing trace amounts of cadmium ($\text{Cd}_{0.005}\text{Ca}_{9.995}(\text{PO}_4)_6(\text{F},\text{OH})_2$) and synthesized at high temperature (Nounah and Lacout 1993). The transmission powder infrared spectrum of this sample has been investigated in details in Balan et al. (2011). The small linewidth ($\sim 4 \text{ cm}^{-1}$) of the weak $\nu_1 \text{ PO}_4$ stretching band measured at low temperature (10K) attests to the very high crystalline quality of this sample. Scanning electron microscope (SEM) observations display a significant porosity and sub-micrometric coalesced particles with a rounded shape (Fig. 4.1.1). The second one is a natural sample of carbonate-fluorapatite, originating from the sedimentary phosphate deposit of Taiba (Senegal) (Morin et al. 2002). It contains 90 wt% of highly crystalline fluorapatite with a few associated mineral impurities (~ 7 wt% quartz, ~ 2 wt% crandallite, < 1 wt% goethite, < 1 wt% dioctahedral smectite). This sample has been previously investigated using transmission powder infrared spectroscopy and solid-state nuclear magnetic resonance by Yi et al. (2013). Importantly, the line width of the $\nu_1 \text{ PO}_4$ stretching band is similar to that observed on the synthetic sample, indicating that this natural sample is also very well ordered despite the occurrence of substituted structural carbonate groups. SEM observations reveal that it is mostly composed of aggregated sub-micrometric prisms of apatite (Fig. 4.1.1). For this sample, ATR spectra have been recorded on the as-received sample and after hand-grinding in ethanol during 15 and 60 minutes.

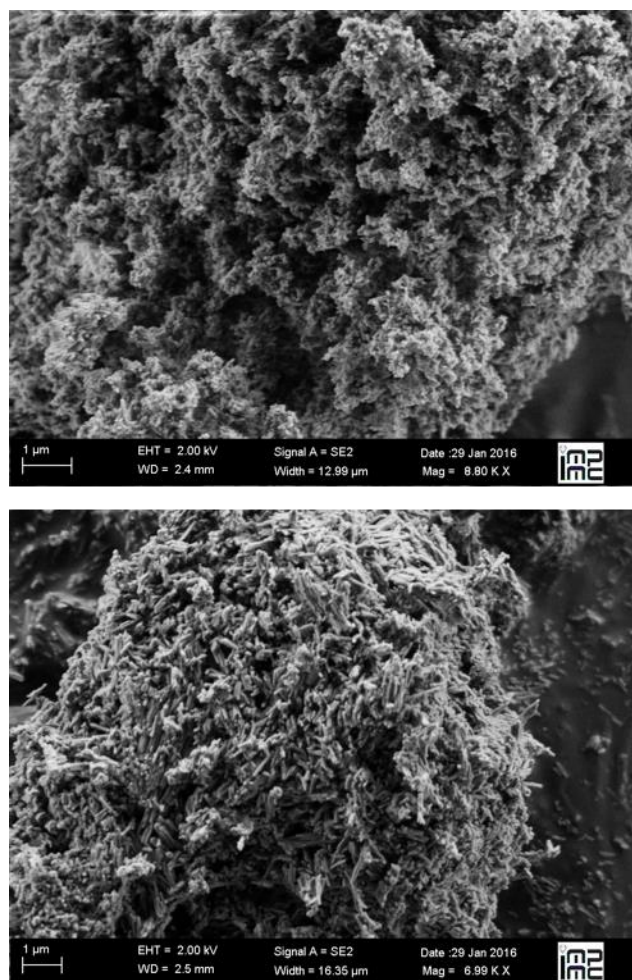


Figure 4.1.1 SEM micrographs of synthetic fluorapatite (top) and natural carbonate-fluorapatite (bottom).

Scanning electron microscope (SEM) observations were performed using a Zeiss ultra 55 SEM operating in the secondary electron mode with a 2kV accelerating tension and a 2.5mm working distance.

The ATR-FTIR spectra have been recorded using a Quest ATR device (Specac) and a Nicolet 6700 FTIR spectrometer equipped with an Ever-Glo source, KBr beamsplitter and DTGS-KBr detector. Pure powder samples have been packed at the surface of the ATR crystal and the spectra have been recorded between 400 and 4000 cm^{-1} by averaging 200 scans with a resolution of 1 cm^{-1} . For each sample, two different spectra have been recorded using a diamond or a Ge ATR crystal. The ATR spectra are reported in absorbance units.

4.1.4 Modeling strategy

The modeling strategy is closely related to that successfully used to model the ATR spectrum of a pure chrysotile aggregate by Balan et al. (2002).

The theoretical unpolarized ATR spectrum is obtained by computing the complex Fresnel reflection coefficient for s- and p- polarized waves and an incidence angle of 45° at a

perfectly plane interface between the ATR crystal and the sample (Born and Wolf 1980). The ATR crystal is defined as a homogeneous medium of constant real refractive index (4 for Ge, 2.4 for diamond); whereas the sample is defined as an infinite homogeneous medium characterized by a frequency-dependent dielectric function.

The porous powder sample corresponds to a binary composite made of the substance of interest, i.e. apatite, and air (here approximated by a homogeneous medium with a unity refractive index). Apatite displaying a crystalline structure with hexagonal symmetry, its dielectric properties are described by a diagonal uniaxial dielectric tensor with a parallel and two identical perpendicular components, noted ϵ_{\parallel} and ϵ_{\perp} , respectively. Numerous models exist that provide the approximate dielectric function of a composite sample from its individual constituents in a quasi-static approach (e.g. Sihvola and Kong 1988; Spanier and Herman 2000; Kendrick and Burnett 2016). They neglect scattering losses and can be straightforwardly extended to frequency-dependent dielectric properties when the characteristic size of individual particles is much smaller than the wavelength of the electromagnetic radiation, a condition usually approximately satisfied in mid-infrared spectroscopy ($\lambda_{\text{IR}} > 10 \mu\text{m}$). One of the simplest model (here referred to as MG model) was proposed by J.C. Maxwell Garnett (Garnett 1904), in which the particles of one of the constituents are considered as embedded in a homogeneous medium, corresponding to the other constituent for binary samples. In the MG model, the two constituents are therefore not treated in a symmetrically equivalent way. The MG model is closely related to the Clausius-Mossotti derivation of the dielectric constant of molecular substances from the polarizability of molecules. For a uniform orientation of particles, the dielectric properties of the composite sample are isotropic. For spherical particles, the MG effective dielectric function ϵ_{MG} of a uniaxial substance embedded in an isotropic matrix is given by the following expression (Levy and Stroud 1997):

$$\epsilon_{MG} = \epsilon_h + 3f\epsilon_h \frac{(\epsilon_{\perp} + 2\epsilon_h)(\epsilon_{\parallel} - \epsilon_h) - 2\epsilon_h(\epsilon_{\parallel} - \epsilon_{\perp})}{(1-f)(\epsilon_{\perp} + 2\epsilon_h)(\epsilon_{\parallel} + 2\epsilon_h) + f\epsilon_h(\epsilon_{\perp} + 2\epsilon_{\parallel} + 6\epsilon_h)} \quad (4.1.1)$$

where f is the volume fraction occupied by the particles and ϵ_h is the dielectric constant of the host matrix. The MG model is well suited to describe the dielectric properties of a sample in which a low amount of one of the constituents is diluted in a non-absorbing matrix, such as the KBr pellets used for traditional transmission experiments. Note however that the MG model leads to average properties of the pure material for $f \rightarrow 1$. It also provides physically meaningful results when the sample micro-structure ensures that the dipolar interactions between neighboring particles cancel out, even at intermediate volume fractions. For example, this was the case of the closely packed nanotube aggregates corresponding to the chrysotile sample investigated by Balan et al. (2002). However, for arbitrary micro-structures and intermediate volume fractions, the particles of one of the constituents cannot be considered as fully isolated and embedded in a homogeneous matrix of the other constituent.

Correspondingly, an alternative model was used in which each individual particle of a mixture is considered as embedded in an effective medium (Bruggeman 1935, Landauer 1978). At variance with the MG model, all constituents are treated in a symmetrically equivalent way. In this model, the effective dielectric properties of a binary sample consisting in a mixture of an isotropic phase and ellipsoidal particles of a uniaxial phase are defined by the self-consistent relation (Walker and Scharnberg 1990; Sushko 2009):

$$f \left[2 \frac{(1-g_{//})(\epsilon_{Br} - \epsilon_{\perp})}{(1+g_{//})\epsilon_{Br} + (1-g_{//})\epsilon_{\perp}} + \frac{g_{//}(\epsilon_{Br} - \epsilon_{//})}{(1-g_{//})\epsilon_{Br} + g_{//}\epsilon_{//}} \right] + 3(1-f) \frac{\epsilon_{Br} - \epsilon_h}{2\epsilon_{Br} + \epsilon_h} = 0 \quad (4.1.2)$$

In this expression, $g_{//}$ is the depolarization factor along the particle revolution axis and $(1-g_{//})/2$ corresponds to the depolarization factor in perpendicular directions (for spherical particles, $g_{//} = 1/3$). The corresponding polynomial equation displays three complex solutions among which that with a positive imaginary part has to be selected. A detailed expression of the polynomial coefficients and solutions is given in the annexes.

The uniaxial frequency-dependent dielectric properties of fluorapatite have been modeled with a Drude-Lorentz expression of the coefficients of its diagonal dielectric tensor:

$$\epsilon_{\alpha}(\omega) = \epsilon(\infty) + \sum_i \frac{A_{i,\alpha}^2}{(\omega_i^2 - \omega^2 - i\omega\Gamma_i)} \quad (4.1.3)$$

where α refers to the Cartesian axis, $\epsilon(\infty) = 2.65$ is the electronic dielectric tensor of apatite, here considered to be real, constant and isotropic, ω_i are the vibrational transverse optical (TO) frequencies of IR-active modes, $A_{i,\alpha}^2$ are effective mode oscillator strengths, and Γ_i is a damping parameter. The frequencies of vibrational modes have been experimentally determined on fluorapatite single-crystals in previous works (e.g. Klee 1970, Adams and Gardner 1974, Leroy et al. 2000). As slight differences occur between the previous experimental determinations, the frequencies used in the present work are listed in Table 4.1.1. The mode oscillator strengths used in the present work are those previously obtained by Balan et al. (2011) on fluorapatite using first-principles quantum mechanical calculations. The damping parameter Γ_i describes the homogeneous broadening of vibrational bands and has been arbitrarily sets to 8 cm^{-1} for all the modes.

Table 4.1.1 Parameters of the model dielectric tensor of apatite (Eq. 4.1.3)

Symmetry	Mode	ω_i (cm ⁻¹)	$A_{i,a}$ (arb. units) ⁴	Γ_i (cm ⁻¹)
A _u	v ₃	1030 ¹	665	8
	v ₁	874	80	8
	v ₄	560 ²	300	8
	v ₂	473 ³	45	8
E _{1u}	v ₃	1090	270	8
	v ₃	1032	630	8
	v ₁	958	110	8
		880	30	
		874	80	
	v ₄	600	215	8
	v ₄	580	120	8

¹Adams and Gardner (1974) ²Klee (1970) ³Leroy et al. (2000) ⁴Balan et al. (2011)

4.1.5 Results

4.1.5.1 Comparative properties of the MG and Bruggeman effective models

As anticipated in their presentation, the two effective medium models used in the present work display very distinct properties as a function of the volume fraction of the constituents. This is particularly evident when considering a model isotropic substance displaying a single resonance in its frequency-dependent complex dielectric function $\epsilon_S = \epsilon_S' + i \epsilon_S''$ (Figure 4.1.2). In the limit of a vanishingly small damping coefficient, the maximum of ϵ_S'' defines the transverse optical (TO) frequency; whereas the longitudinal optical (LO) frequency is defined by $|\epsilon_S|=0$. The second medium of the binary composite is characterized by its dielectric constant ϵ_h . The relation (1) for the isotropic MG model becomes:

$$\frac{\epsilon_{MG} - \epsilon_h}{\epsilon_{MG} + 2\epsilon_h} = f \frac{\epsilon_S - \epsilon_h}{\epsilon_S + 2\epsilon_h} \quad (4.1.4)$$

The MG dielectric function (Figure 4.1.2) still presents a single resonance, which progressively shifts toward the resonance frequency of the pure material when the volume fraction increases. In the limit of low volume fraction and vanishingly small damping parameter, the resonance occurs when $\epsilon_S' = 2 \epsilon_h$. For this peculiar condition, the real part of the denominator in Eq. 4.1.4 cancels out and the resonance coincides with the surface mode of the isolated sphere. The intensity of the resonance is not linearly related to the volume fraction of the composite but displays a stronger than linear decrease when the volume fraction decreases. Note that an alternative cavity-Maxwell-Garnett model (cavity-MG) can be built by considering air cavities embedded in an isotropic solid. In this case (not shown), two discrete resonances are observed at the TO and LO frequencies of the pure bulk substance.

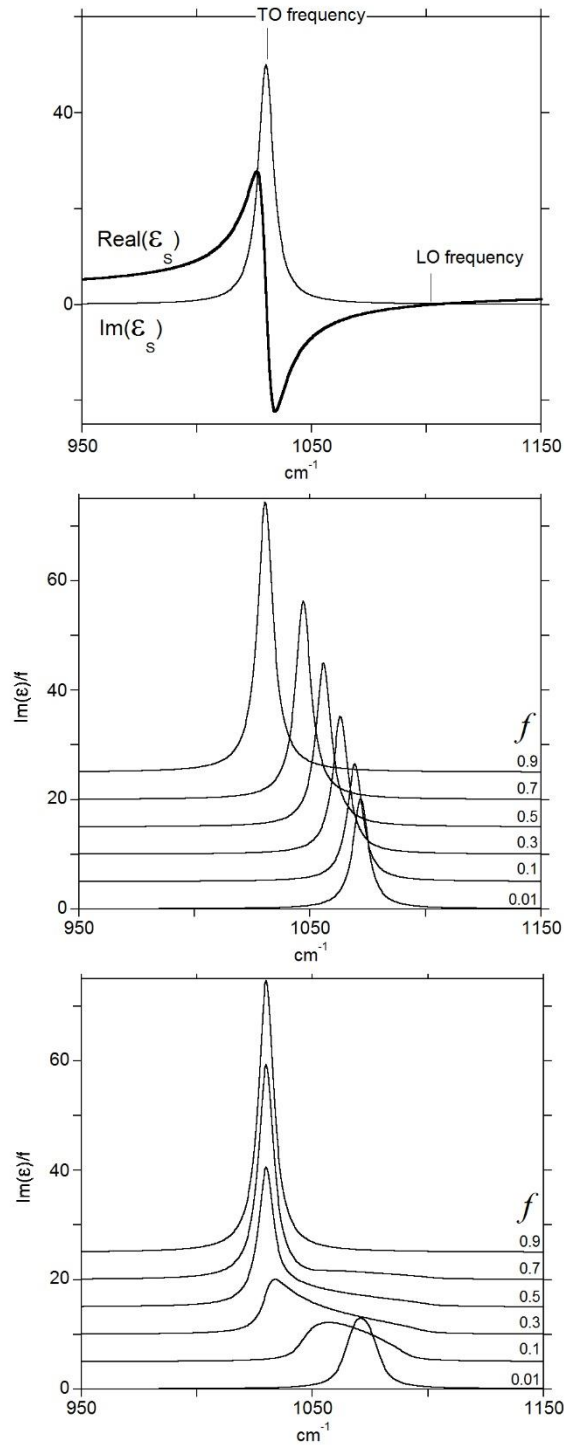


Figure 4.1.2 Real and imaginary parts of a model single-resonance dielectric function (top) and corresponding imaginary part of the effective dielectric function in the Maxwell-Garnett (middle) and Bruggeman (bottom) models. The parameters of the model dielectric function (Eq. 4.1.3) were $\omega_0=1030 \text{ cm}^{-1}$, $A_\alpha=642$, $\Gamma=8 \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon(\infty)=2.65$. The effective dielectric functions have been divided by the corresponding volume fraction f value, reported on the right side.

The symmetric Bruggeman model leads to the following isotropic relation:

$$(1-f) \frac{\epsilon_h - \epsilon_{Br}}{\epsilon_h + 2\epsilon_{Br}} + f \frac{\epsilon_s - \epsilon_{Br}}{\epsilon_s + 2\epsilon_{Br}} = 0 \quad (5)$$

In the limit cases $f \rightarrow 0$ or $f \rightarrow 1$, the Bruggeman dielectric function is identical to the MG one, with a single resonance at the characteristic frequency of the isolated sphere or of the pure bulk material, respectively. In contrast, the line shape of the imaginary part of the dielectric function at intermediate volume fractions significantly broadens and becomes asymmetric, instead of displaying a single resonance at intermediate frequencies. For volume fractions above 1/3, the lines extend between the TO and LO frequencies with a relatively higher intensity on the TO frequency side.

These peculiar shape and dependence on volume fraction can be understood by analyzing the mathematical properties of the model. More specifically, the Bruggeman dielectric function has the properties of a Herglotz function, i.e. it is analytic and maps the upper half complex plane ($(\epsilon_s/\epsilon_h)''$ is positive) to itself (ϵ_{Br}'' is also positive) (Cherkaeva and Golden 1998). In the present case, it can be shown that the imaginary part of the Bruggeman dielectric function consists in the sum of two terms (see Annexes). One is proportional to $(3f-1)\epsilon_s''$ and corresponds to the resonance at the TO frequency observed for $f > 1/3$. The second one mixes the imaginary and real parts of the dielectric function of the material and leads to the broad feature which extends to the LO frequency. For $f < 1/3$, $(3f-1)\epsilon_s''$ is negative. As the imaginary part of the Bruggeman dielectric function is positive, this term cancels out with the second one. This explains the significant change in the shape of the Bruggeman dielectric function at $f = 1/3$. This volume fraction coincides with the percolation threshold of the symmetric Bruggeman model. For conducting particles inserted in a dielectric matrix, such as cermet compounds, it corresponds to the volume fraction above which the sample properties change from the insulating to the conducting regime (e.g. Gadenne et al. 1989).

4.1.5.2 Experimental ATR spectra of apatite

The ATR spectrum of the synthetic fluorapatite sample (Fig. 4.1.3), reported in absorbance units, displays the usual absorption bands ascribed to the vibrational modes of phosphates groups. The bands associated with the ν_3 PO_4 vibrations (anti-symmetric stretch) are observed between 1000 and 1150 cm^{-1} . The weak and narrower ν_1 PO_4 band (symmetric stretch) is observed at ~ 966 cm^{-1} . The bands associated with the ν_4 PO_4 vibrations (bending modes) are observed between 540 and 620 cm^{-1} . As expected, the ATR spectra depend on the refractive index of the ATR crystal and significant variations are observed between Ge and diamond ATR spectra, with a much lower intensity for the most refractive material (here, Ge with $n_{\text{Ge}} = 4$). ATR spectra also differ from the transmission spectrum measured and modeled by Balan et al. (2011) using the traditional method i.e. dilution of apatite particles in a KBr matrix (Fig. 4.1.3). These variations not only consist in changes in spectral intensities but also

affect the position and the width of the bands. Interestingly, the line shapes are significantly asymmetric. In the Ge spectrum, the band at 1095 cm^{-1} extends to $\sim 1130\text{ cm}^{-1}$, whereas the intense $\nu_3\text{ PO}_4$ band at 1030 cm^{-1} extends to $\sim 1090\text{ cm}^{-1}$. A significant asymmetry is also observed on the $\nu_4\text{ PO}_4$ band at $\sim 600\text{ cm}^{-1}$. In the diamond ATR spectrum, the intense $\nu_3\text{ PO}_4$ band appears broadened toward lower wavenumbers and its maximum is shifted to 1017 cm^{-1} .

The ATR spectrum of the natural carbonate-fluorapatite displays similar features (Fig. 4.1.4). Additional small bands related to structural carbonates ($\nu_2\text{ CO}_3$ bending mode at $\sim 865\text{ cm}^{-1}$) and associated quartz impurities ($462, 780$ and 799 cm^{-1}) are observed. The Ge and diamond ATR spectra of the carbonate-fluorapatite are significantly less intense than the respective spectra of synthetic fluorapatite. Sample grinding tends to increase the spectrum intensity. However, the dependence of the Ge and diamond spectrum as a function of grinding time is different. For diamond ATR, a moderate grinding provides a significant recovery of spectral intensity, which is not improved by further grinding; whereas an increase of the Ge ATR intensity is only observed for the longest grinding time (60 min). This observation can be linked to a larger penetration depth for the diamond ATR than for the more refractive Ge one. The strong bands are also broader than in the pure fluorapatite spectrum. In the diamond ATR spectrum, the $\nu_3\text{ PO}_4$ band extends from 900 to 1100 cm^{-1} . The overlap with the weak band related to the $\nu_1\text{ PO}_4$ mode leads to a very asymmetric narrow resonance. Its shape shares some similarity with the derivative of a Lorentzian function, suggesting that the real part of the dielectric function related to this resonance significantly contributes to the spectrum. In contrast, this resonance appears with a standard peak shape in the Ge spectrum, in which ν_1 and $\nu_3\text{ PO}_4$ bands do not overlap.

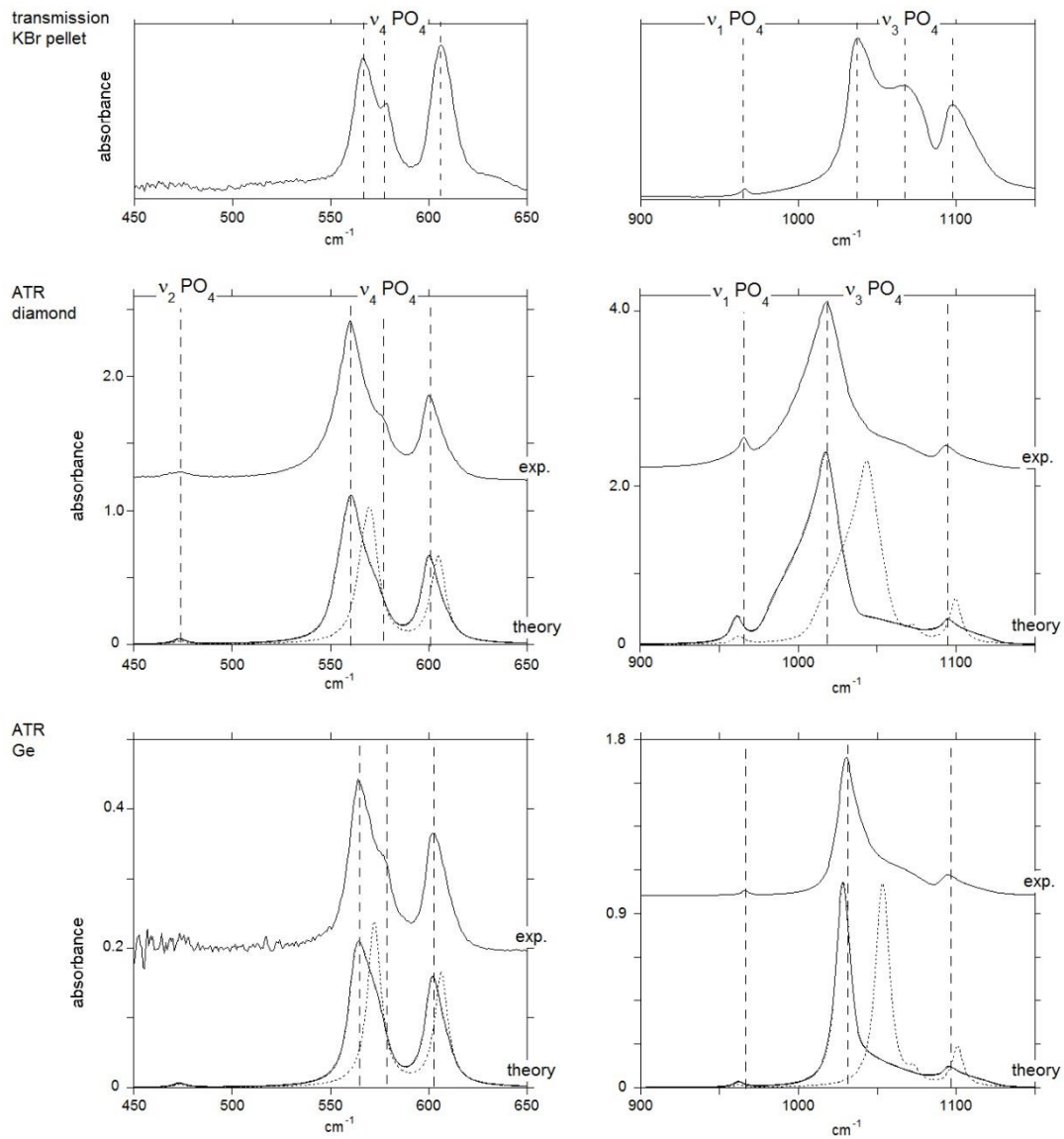


Figure 4.1.3 Experimental and modeled diamond (middle) and Ge (bottom) ATR spectra of synthetic fluorapatite. Experimental spectra have been vertically shifted for clarity. Maxwell-Garnett and Bruggeman modeled ATR spectra are displayed as dotted and solid lines respectively. The transmission spectrum recorded by Balan et al. (2011) on the same sample after dilution in KBr is reported for comparison (top). Note the significant changes affecting strong absorption bands. Vertical dotted lines serve as guide to the eye.

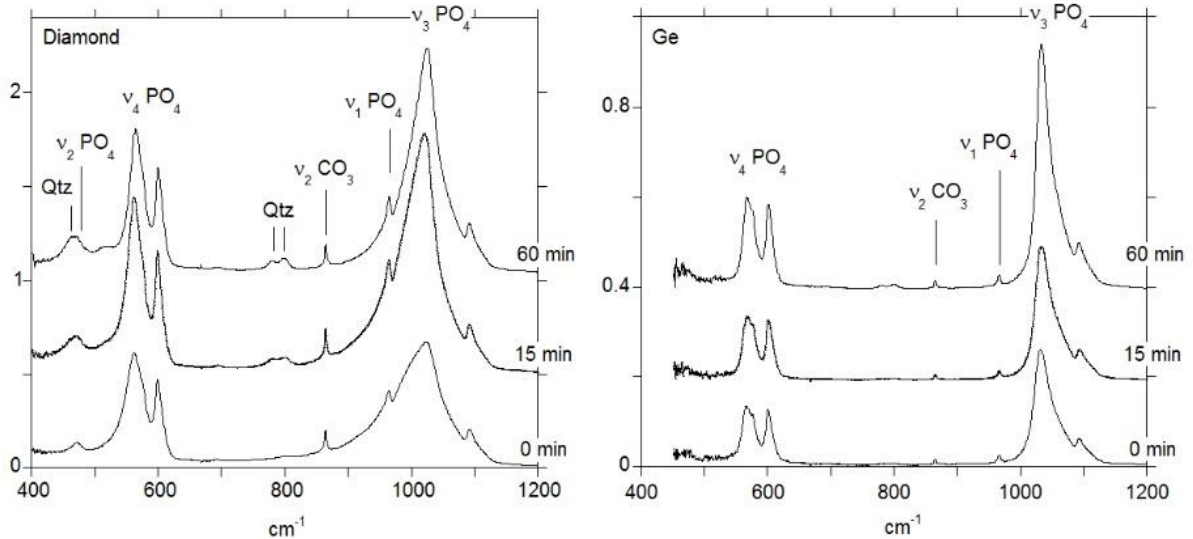


Figure 4.1.4 Experimental ATR spectra of natural carbonate-fluorapatite samples. Grinding times are reported on the right side for each spectrum. Grinding time affects the intensity of Ge and diamond spectra differently, suggesting an interplay between the sample spatial heterogeneity and characteristic IR penetration depth in the ATR crystals.

4.1.5.3 Theoretical ATR-FTIR spectra of apatite

Starting from a single dielectric function for pure fluorapatite, defined by the parameters specified in Table 4.1.1, and for a given effective medium model, the theoretical Ge and diamond ATR spectra are obtained by varying the dielectric constant of the ATR crystal. In this case, the only free parameter that can be used to optimize the agreement between the model ATR spectra and their experimental counterparts is the volume fraction. For the synthetic sample, a good agreement is achieved by using a fraction of 0.5 (Fig. 4.1.3) which is reasonable for an ordinary powder sample. For comparison, the ratio of the apparent density of quartz sand to that of pure quartz is 0.577 (Bisal and Hinman 1972).

For the two effective medium models, the shape of the theoretical Ge ATR spectra is very close to that of the imaginary part of the corresponding dielectric functions. The most significant variation are minor shifts ($< 4 \text{ cm}^{-1}$) of the most intense $\nu_3 \text{ PO}_4$ band toward lower wavenumbers. It is noteworthy that the intensity of the modeled ATR spectra compares well with the raw experimental measurements. As anticipated, the MG model leads to a series of narrow peaks related to the various resonances of the apatite dielectric tensor, accounting poorly for the experimental asymmetric line shapes. In contrast, the specific line shapes observed for intermediate volume fractions in the Bruggeman model compare well with their experimental counterparts (Fig. 4.1.3). More specifically, they reproduce the peak maximum at low frequency, corresponding to the TO frequencies of the apatite vibrational modes, and the broad absorption feature observed on the high-frequency side. As shown in the analysis of the Bruggeman model, this feature extends up to the LO frequency of apatite vibrational modes. In the $\nu_4 \text{ PO}_4$ range, the Bruggeman model also reproduces the asymmetric line shape of the band

at 600 cm^{-1} and the line splitting observed at 564 and 578 cm^{-1} . Considering the diamond ATR spectrum, its shape differs from that of the imaginary part of dielectric functions by the fact that the most intense $\nu_3\text{ PO}_4$ band is broadened toward the lower wave-numbers for the two effective medium models. This effect on the line shape is therefore specifically ascribed to the ATR experimental configuration. As for the Ge ATR spectrum, the best agreement on the line positions and spectral shape is obtained by using the Bruggeman dielectric model, both in the $\nu_3\text{ PO}_4$ and $\nu_4\text{ PO}_4$ ranges. The experimentally observed position of the bands, and more importantly, the relative changes between the spectra and the relative shifts with respect to the resonances of the dielectric tensor of pure bulk apatite are well-reproduced by the model. The slight but systematic under-estimation of the position of the weak $\nu_1\text{ PO}_4$ band (by 4 cm^{-1}) suggests that the TO frequency used to model the low-frequency dielectric tensor of apatite (Table 4.1.1) was slightly underestimated. Note that attempts using the cavity-MG model did not provide a better modeling of the observed peculiar line shapes than the standard MG model. Indeed, this model also leads to a series of discrete peaks instead of the broad features extending between TO and LO frequencies for intermediate volume fractions.

The ATR spectrum of the natural sample of carbonate-fluorapatite was modeled using the same apatite dielectric tensor as for the synthetic one (Fig. 4.1.5). No attempt has been made to take into account the small spectroscopic signal related to the structural carbonate ions. Importantly, the line width was not modified, which is consistent with the small $\nu_1\text{ PO}_4$ linewidth measured in previous transmission IR spectroscopy studies (Balan et al. 2011; Yi et al. 2013). This small linewidth attests to the weakness of the inhomogeneous broadening related to microscopic disorder parameters. A moderate increase in the apatite volume fraction significantly increases the asymmetric broadening of the intense $\nu_3\text{ PO}_4$ band in the diamond ATR spectrum. It overlaps with the narrow $\nu_1\text{ PO}_4$ band, leading to a shape similar to the derivative of a Lorentzian, consistent with the experimental observations. However, the theoretical ATR spectra do not account for the significant decrease in spectral intensity observed from the synthetic to the natural sample. The modeled diamond and Ge spectra consistently overestimate their experimental counterparts by a factor of approximately two (Fig. 4.1.5). This points to a failure in the model of the sample effective dielectric properties. A microscopic sample heterogeneity, e.g. related to carbonate substitutions, cannot explain such discrepancy because it is not supported by the observed $\nu_1\text{ PO}_4$ linewidth. In contrast, heterogeneities occurring at a length scale larger than the characteristic length scale of the spectroscopic measurements, typically the IR wavelength, could account for the observed discrepancy. We particularly suspect spatial fluctuations in the solid/air fraction to account for the observed discrepancy.

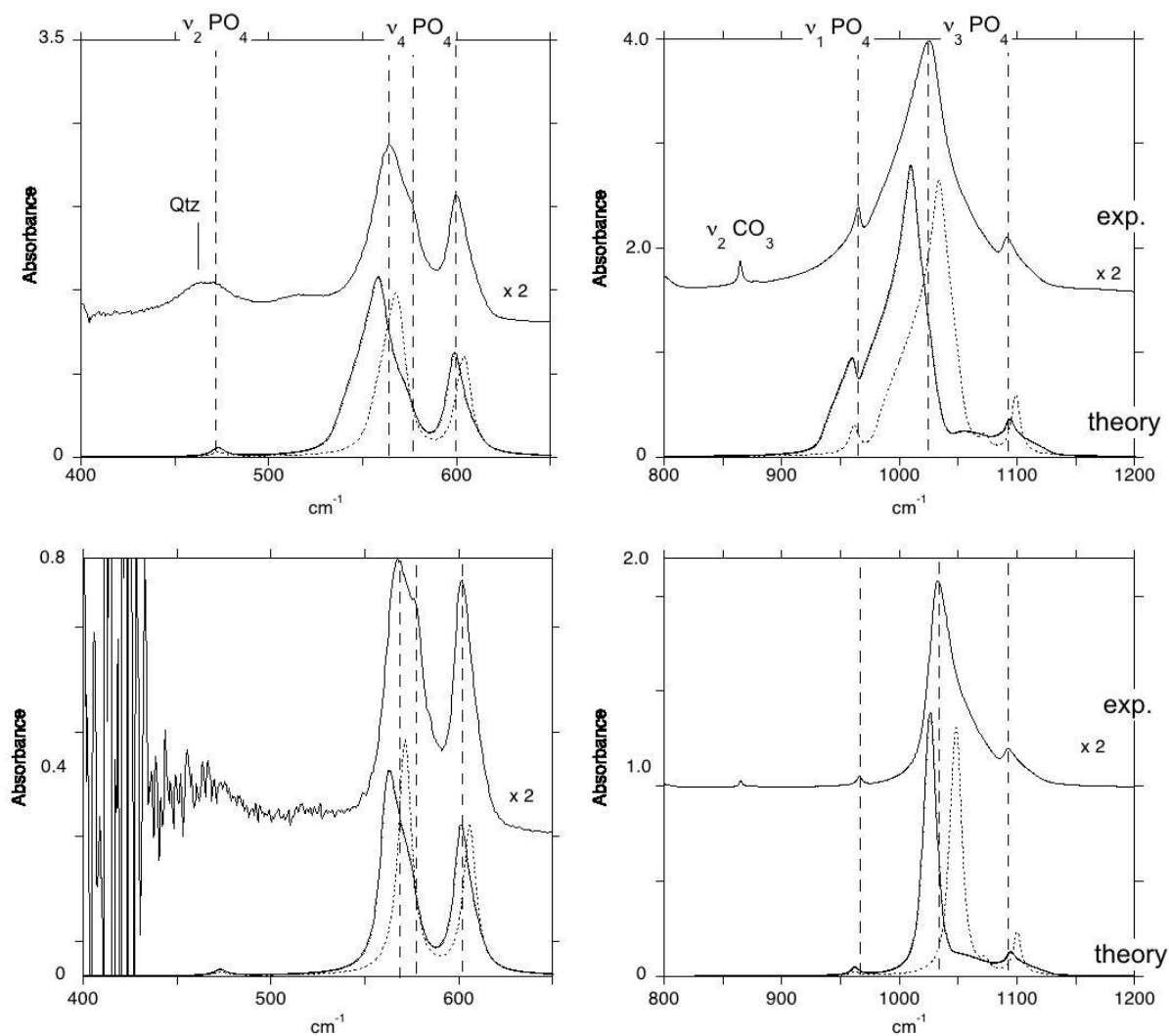


Figure 4.1.5 Experimental and modeled diamond (top) and Ge (bottom) ATR spectra of natural carbonate-fluorapatite. Experimental spectra have been vertically shifted for clarity and experimental intensities were multiplied by 2. Note that the wavenumber ranges slightly differ from those on figure 4.1.3. Maxwell-Garnett and Bruggeman modeled ATR spectra are displayed as dotted and solid lines respectively.

4.1.6 Concluding remarks

The present modeling of apatite ATR spectra demonstrates the prominent role of macroscopic electrostatic effects over fine details of the microscopic structure in the line shape of strong ATR bands. A relatively simple effective medium modeling of the dielectric properties of the sample, based on the Bruggeman approximation, already provides important insights into these respective contributions. It points to the key role of the volume fraction of the constituents, which is the only free parameter of the model. More sophisticated models would most probably improve the agreement between theory and experiment (e.g. Yagil et al. 1995; Spanier and Herman 2000) but at the price of a corresponding increase in the number of free parameters.

As previously discussed in Balan et al. (2011), macroscopic electrostatic effects have a weaker influence on the shape and position of the weak absorption bands of apatite. These bands, although often neglected and sometimes more difficult to record, are expected to provide a better insight into the short-range order in crystal structures. However, the present modeling indicates that their overlap with stronger resonances in the diamond ATR spectrum significantly affects their shape by mixing the real and imaginary parts of the dielectric function.

Finally, it appears that the relation between ATR and transmission spectra is not straightforward even though commercial softwares provide ATR correction algorithms to facilitate the comparison. The different composite nature (substance/air vs substance/KBr) and more importantly the different dilution state (pure powder vs isolated particles) of the measured samples affect their macroscopic electrostatic properties and result in changes in the position, shape and relative intensity of strong absorption bands. This can significantly bias the comparison between ATR and transmission spectra despite the fact that the analyzed bulk substance is characterized by a single dielectric function. Importantly, the differences observed in the analyzed samples are explained by the long-range character of electrostatic interactions affecting (sub-)micronic particles. They differ in essence from potential surface-induced relaxation effects which occur at the atomic scale and can become dominant in nanometer-sized particles (Waychunas and Zhang 2008).

Acknowledgments

We thank G. Morin for providing us with the fluorapatite samples. Support by M. Guillaumet, I. Estève and the IMPMC spectroscopy and SEM-FIB facilities is acknowledged. We thank Prof E.K.H. Salje and an anonymous reviewer for thoughtful and constructive reviews of this manuscript. This work was supported by French state funds managed by the ANR within the Investissements d'Avenir programme under reference ANR-11-IDEX-0004-02, and more specifically within the framework of the Cluster of Excellence MATISSE led by Sorbonne Universités. Support from the Convergence Program “*Environnements & Société*” of Sorbonne Universités is acknowledged.

Annexes

1- Complex solutions of the uniaxial Bruggeman model

The Bruggeman relation is (Eq. 2):

$$f \left[2 \frac{(1-g_{//})(\epsilon_{Br} - \epsilon_{\perp})}{(1+g_{//})\epsilon_{Br} + (1-g_{//})\epsilon_{\perp}} + \frac{g_{//}(\epsilon_{Br} - \epsilon_{//})}{(1-g_{//})\epsilon_{Br} + g_{//}\epsilon_{//}} \right] + 3(1-f) \frac{\epsilon_{Br} - \epsilon_h}{2\epsilon_{Br} + \epsilon_h} = 0$$

The solutions of the equation are the roots of a cubic polynomial with complex coefficients:

$$ax^3 + bx^2 + cx + d = 0$$

with

$$a = -3 - f + 6fg_{//} + 3g_{//}^2 - 9fg_{//}^2$$

$$b = 3(\varepsilon_h - \varepsilon_{\perp}) + (7\varepsilon_{\perp} - 5\varepsilon_h)f + (6\varepsilon_{\perp} - 3\varepsilon_{//})g_{//} + fg_{//}(3\varepsilon_h + \varepsilon_{//} - 16\varepsilon_{\perp}) - 3g_{//}^2(\varepsilon_{//} + \varepsilon_{\perp} + \varepsilon_h) + 9(\varepsilon_{//} + \varepsilon_{\perp})fg_{//}^2$$

$$c = \varepsilon_h\varepsilon_{\perp}(3 - f) + (3\varepsilon_h\varepsilon_{//} - 6\varepsilon_h\varepsilon_{\perp} - 3\varepsilon_{//}\varepsilon_{\perp})g_{//} + (9\varepsilon_{//}\varepsilon_{\perp} + \varepsilon_h\varepsilon_{\perp} - 4\varepsilon_h\varepsilon_{//})fg_{//} + 3g_{//}^2(\varepsilon_h\varepsilon_{//} + \varepsilon_h\varepsilon_{\perp} + \varepsilon_{//}\varepsilon_{\perp}) - 9\varepsilon_{//}\varepsilon_{\perp}fg_{//}^2$$

$$d = 3\varepsilon_h\varepsilon_{//}\varepsilon_{\perp}(g_{//} - g_{//}^2)$$

The three roots are:

$$x_1 = -\frac{b}{3a} - \frac{2^{1/3}(-b^2 + 3ac)}{3a(-2b^3 + 9abc - 27a^2d + \sqrt{-4(b^2 - 3ac)^3 + (2b^3 - 9abc + 27a^2d)^2})^{1/3}} + \frac{(-2b^3 + 9abc - 27a^2d + \sqrt{-4(b^2 - 3ac)^3 + (2b^3 - 9abc + 27a^2d)^2})^{1/3}}{3a2^{1/3}}$$

$$x_2 = -\frac{b}{3a} + \frac{(1+i\sqrt{3})(-b^2 + 3ac)}{3a2^{2/3}(-2b^3 + 9abc - 27a^2d + \sqrt{-4(b^2 - 3ac)^3 + (2b^3 - 9abc + 27a^2d)^2})^{1/3}} - \frac{(1-i\sqrt{3})(-2b^3 + 9abc - 27a^2d + \sqrt{-4(b^2 - 3ac)^3 + (2b^3 - 9abc + 27a^2d)^2})^{1/3}}{6a2^{1/3}}$$

$$x_3 = -\frac{b}{3a} + \frac{(1-i\sqrt{3})(-b^2 + 3ac)}{3a2^{2/3}(-2b^3 + 9abc - 27a^2d + \sqrt{-4(b^2 - 3ac)^3 + (2b^3 - 9abc + 27a^2d)^2})^{1/3}} - \frac{(1+i\sqrt{3})(-2b^3 + 9abc - 27a^2d + \sqrt{-4(b^2 - 3ac)^3 + (2b^3 - 9abc + 27a^2d)^2})^{1/3}}{6a2^{1/3}}$$

Among these three roots, only that with a positive imaginary part has to be selected.

2- Some mathematical properties of the Bruggeman model

The solutions of Eq. 5 are the roots of a quadratic polynomial equation with complex coefficients:

$$x^2 + 2bx + c = 0$$

$$\text{with } x = \frac{\varepsilon_{Br}}{\varepsilon_h}, b = -\frac{(3f-1)\frac{\varepsilon_s}{\varepsilon_h} + (2-3f)}{4} \text{ and } c = -\frac{\varepsilon_s}{2\varepsilon_h}. \varepsilon_h \text{ is the dielectric constant of the host}$$

and $\varepsilon_s = \varepsilon_s' + i\varepsilon_s''$ is the complex dielectric function of the substance.

The corresponding solutions are: $x_{\pm} = -b \pm \sqrt{\Delta}$ with $\Delta = b^2 - c$. We will now show that the imaginary part of the solution x_+ is positive.

The imaginary part of $\sqrt{\Delta}$ is equal to $\sqrt{(|\Delta| - \Delta_r)/2}$ where $\Delta = \Delta_r + i\Delta_i$. The imaginary part of x_+ is thus:

$$\text{Im}(x_+) = -b_i + \sqrt{\frac{(|\Delta| - \Delta_r)}{2}} \quad \text{Eq. A1}$$

where $b = b_r + ib_i$

We now show that the absolute value $|b_i|$ is smaller than $\sqrt{\frac{(|\Delta| - \Delta_r)}{2}}$. This is equivalent to determining that $|\Delta|^2 - (2b_i^2 + \Delta_r)^2$ is positive. Replacing the coefficients Δ and b_i by their expressions as a function of the dielectric function of the substance and matrix, we obtain:

$$|\Delta|^2 - (2b_i^2 + \Delta_r)^2 = \frac{9}{8} \left(\frac{\epsilon_s''}{\epsilon_h} \right)^2 f(1-f) \text{ which is indeed always positive for } 0 \leq f \leq 1.$$

As a consequence, $\text{Im}(x_+)$ is also positive. This property is even stronger than the Herglotz property because ϵ_s'' is not assumed to be positive. In particular for $f = 0$, $\text{Im}(x_+) = (\epsilon_s'' + |\epsilon_s''|)/2 \geq 0$ even if ϵ_s'' is negative. The condition that ϵ_h is real and positive thus implies that $\text{Im}(\epsilon_{Br})$ is positive, for any function ϵ_s .

As $-b_i = (3f - 1) \frac{\epsilon_s''}{4\epsilon_h}$ and $\epsilon_s'' > 0$, the first term in Eq. A1 is positive when $f > 1/3$. This contribution is thus proportional to the dielectric function of the pure bulk substance and always present. For $f < 1/3$, this contribution becomes negative but since $\text{Im}(x_+) \geq 0$, this negative contribution is compensated for by the second term in Eq. A1. The ϵ_s'' peak then disappears completely from the spectrum. Equation A1 has another interesting consequence. In a region where $|\Delta_i|$ is smaller than $|\Delta_r|$, there are two regimes: if $\Delta_r \geq 0$, then $|\Delta| - \Delta_r \approx \Delta_i^2 / (2\Delta_r)$ is small and the first term of Eq. A1 is dominant for $f > 0.3$; if $\Delta_r \leq 0$, then $|\Delta| - \Delta_r \approx 2|\Delta_r|$ and the deformation of the spectrum due to the second term of Eq. A1 becomes large. In other words, the deformation of the spectrum of apatite for $f > 0.3$ occurs when Δ has a large negative real part.

We now examine the properties of the imaginary part of the solution for $f=0.5$ and $\epsilon_h=1$, i.e. the parameters used to model the spectrum of synthetic fluorapatite (Fig. 6). In this case, $b^2 - c = \epsilon_s(\epsilon_s + 34) + 1$. For a vanishingly small damping parameter and out of the TO frequency, ϵ_s is real: $\epsilon_s \approx \epsilon_s'$. Therefore, only the second term contributes to the imaginary part of the solution when $b^2 - c$ is negative. This condition is met for ϵ_s' approximately ranging between -34 and zero, i.e. on the high energy side of the TO frequency and up to about the LO frequency. For ϵ_s' below -34, the imaginary part of ϵ_s becomes dominant and the spectrum is proportional to the dielectric function of the pure bulk substance.

4.2. Effets électrostatiques macroscopiques dans les spectres ATR-FTIR d'os modernes et archéologiques

Nous avons montré dans la Section 4.1 que le modèle de milieu effectif proposé par Bruggeman reproduit correctement les propriétés et la forme spécifique des bandes ATR d'échantillons d'apatite en poudre.

Cependant, comme exposé dans le Chapitre 1, l'os est un matériau composite comportant non seulement une fraction minérale d'hydroxyapatite carbonatée, mais aussi une fraction organique, le collagène, en proportions volumiques équivalentes. On s'attend donc à ce que les propriétés vibrationnelles de l'os reflètent cette nature composite. Dans cette seconde partie, la stratégie mise en place à la section précédente est adaptée à l'étude d'échantillons d'os actuels et archéologiques caractérisés par divers degrés de préservation de leur matrice collagénique.

4.2.1 Résumé de l'étude

Les fragments osseux prélevés sur des sites de fouilles archéologiques et paléontologiques constituent une précieuse source d'informations. D'une part, la datation au carbone 14 du collagène de l'os permet de dater les restes archéologiques, d'autre part les analyses isotopiques combinées du carbone du collagène et de la bioapatite renseignent sur le régime alimentaire et l'habitat du vertébré. La spectroscopie infrarouge est donc utilisée de façon routinière pour évaluer le degré de préservation du collagène en amont des analyses isotopiques et de la datation au carbone 14, le mode ATR devenant le plus populaire du fait de sa rapidité de mise en œuvre. Toutefois, les spectres ATR ne dépendent pas seulement de la microstructure mais aussi des caractéristiques macroscopiques de l'échantillon, ils devraient également varier en fonction de la teneur en collagène de l'os.

Il s'agit donc à travers cette étude d'analyser, en combinant théorie et expérience, la variabilité des spectres ATR-FTIR d'une série d'échantillons d'os actuels et archéologiques caractérisés par divers degrés de préservation de leur matrice collagénique. Le modèle de milieu effectif de Bruggeman est utilisé pour décrire les propriétés diélectriques des échantillons composites, considérés comme constitués de particules sphériques d'apatite et d'un second milieu dont la constante diélectrique varie entre celle du vide et celle du collagène pur. Il n'est donc pas tenu compte de façon détaillée des propriétés spectroscopiques du collagène. Fraction volumique et constante diélectrique du milieu environnant constituent ainsi les seuls paramètres variables du modèle.

La variabilité particulièrement importante des bandes d'absorption des phosphates dans les spectres ATR-FTIR acquis avec un cristal de diamant s'explique par une variabilité de la polarisabilité du milieu environnant et de la proportion des particules d'apatite en fonction de la teneur en collagène. Les propriétés vibrationnelles de l'apatite ayant été maintenues fixes

pour tous les échantillons, ceci montre bien que les bandes ATR intenses sont plus affectées par des effets électrostatiques d'origine macroscopique que par des interactions à l'échelle moléculaire entre les composantes organiques et minérales. La comparaison avec les spectres acquis avec un cristal de germanium, nettement moins sensibles à ces effets, confirme l'origine électrostatique de la variabilité spectrale observée en fonction de la teneur en collagène. Le modèle de Bruggeman reproduit bien cette plus faible sensibilité du cristal Ge, d'indice plus élevé, aux caractéristiques macroscopiques de l'échantillon.

Ces résultats illustrent l'importance du caractère composite de l'os, dont les propriétés ne peuvent être simplement réduites à une combinaison linéaire de celles de l'apatite et du collagène. Plus généralement, ils montrent que l'interprétation des signatures infrarouge des biomatériaux "organo-minéraux" ne peut se faire uniquement en termes de variabilité microscopique mais impose de considérer leur organisation à l'échelle mésoscopique.

Article III : Macroscopic electrostatic effects in ATR-FTIR spectra of modern and archeological bones

Julie AUFORT, Matthieu LEBON, Xavier GALLET, Loïc SEGALÉN, Christel GERVAIS, Christian BROUDER, Etienne BALAN

Lettre publiée dans le journal *American Mineralogist* 103 (2018), 326-329

DOI : 10.2138/am-2018-6320CCBYNCND

Abstract

Bones mostly consist of composite materials based on almost equivalent volume fractions of mineral (apatite) and organic (collagen) components. Accordingly, their infrared spectroscopic properties should reflect this composite nature. In this letter, we show by theory and experiment that the variability of the strong phosphate bands in the ATR-FTIR spectra of a series of modern and archeological bone samples can be related to electrostatic interactions affecting apatite particles and depending on the bone collagen content. Key parameters controlling the shape of these bands are the mineral volume fraction and the dielectric constant of the embedding matrix. The magnitude of these effects is larger than the one related to microscopic changes of the apatite structure. Consequently, the interplay of microscopic and macroscopic parameters should be considered when using FTIR spectroscopy to monitor the preservation state of bioapatite during diagenetic and fossilization processes, especially during the degradation of the organic fraction of bone.

4.2.2 Introduction

Vertebrate skeletons mostly consist of composite materials containing a mineral component and a fraction of organic and water molecules (Pasteris et al. 2008). The inorganic component is usually described as nanocrystalline carbonate-bearing hydroxylapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), although more complex structures and chemical compositions have been observed (e.g. Pasteris et al. 2008; Li and Pasteris 2014). Bones consist of about 50 vol% of ~ 2 nm thick, 10-20 nm wide and 20-50 nm long apatitic nanocrystallites and a near equivalent volume of collagen fibrils (Glimcher 2006; Pasteris et al. 2008). Compared to bone, tooth enamel lacks collagen, contains ~1-2 vol% of organic compounds and about 2 vol% of water, and displays larger apatite crystallites making up for ~90 vol% of the material (LeGeros and LeGeros 1984, Elliott 2002; Skinner 2005).

Key information on the atomic-scale organization of such complex materials is provided by spectroscopic methods (e.g. Pasteris et al. 2008, Yi et al. 2014). As it is a versatile technique requiring only small sample amounts, Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy has been widely applied to the study of bones and teeth. Although most of these studies have biomedical goals, FTIR spectroscopy also allows efficient screening of the preservation state of skeleton remains prior to isotopic and chemical analysis for paleo-environmental reconstructions or radiocarbon dating (e.g.; Trueman et al. 2008; Roche et al. 2010; Lebon et al. 2014; Snoeck and Pelligrini 2015). Diagenetic transformation of bones and teeth following burial often leads to an increase in crystallinity as well as a decrease in organic fraction and structural carbonate contents (e.g. Hedges 2002; Trueman et al. 2008).

In practice, FTIR spectra of bioapatite are increasingly recorded in the attenuated total reflection (ATR) mode (e.g. Stathopoulou et al. 2008; Thompson et al. 2009; Lebon et al. 2014; Beasley et al. 2014; Surmik et al. 2016). Unlike conventional transmission geometry, ATR spectroscopy does not require the multistep preparation of dry and homogeneous pellets containing a percent-level fraction of solid particles dispersed in a KBr matrix. The absorption-like ATR spectrum is recorded on the packed sample powder by measuring its reflection coefficient at the interface with a highly refractive material. However, the different geometry and nature of the sample may impede a straightforward comparison of ATR with transmission spectra (Aufort et al. 2016). Differences in the crystallinity degree and carbonate-to-phosphate ratio of samples measured in transmission, ATR and diffuse reflectance geometries have been reported (Beasley et al. 2014). The position and intensity of the ATR signal also depend on the refractive index of the ATR crystal (Boulet-Audet et al. 2010), typically diamond ($n=2.4$) or germanium ($n=4$). Use of Ge usually requires larger amounts of sample and leads to a comparatively smaller band intensity, thus limiting the detection of relatively weak bands, such as those related to carbonate impurities and organic matter. In addition, the ATR spectra depend on characteristics of the sample microstructure, such as porosity, nature of the embedding

medium, aggregation state, and shape of particles, as recently shown for apatite (Aufort et al. 2016). This dependence arises from the long-range electrostatic interactions within and between particles, interactions which also affect the transmission spectra (e.g. Iglesias et al. 1990; Balan et al. 2011, Kendrick and Burnett 2016).

Based on these observations, it can be anticipated that the FTIR spectra of composite biomaterials such as bone should depend on the relative fractions of mineral and organic constituents through macroscopic electrostatic interactions. In this contribution, we show that the line-shape variability of the ATR-FTIR spectrum of modern and archaeological bones can be accounted for by combining the description of the intrinsic vibrational properties of the mineral component with an electrostatic model taking into consideration their variable collagen fraction.

4.2.3 Materials and methods

Three archaeological animal bone and a modern ox bone samples (Table 4.2.1) previously investigated using ATR-FTIR spectroscopy by Lebon et al. (2014) were chosen for their various states of collagen preservation as well as a modern tooth enamel sample previously investigated by Yi et al. (2014). For each sample, about 50 mg of powder were finely ground with agate mortar and pestle. The ATR-FTIR spectra were recorded using a Quest ATR device (Specac) and a Nicolet 6700 FTIR spectrometer. Pure powder samples were packed at the surface of the ATR crystal and spectra recorded between 400 and 4000 cm^{-1} by averaging 100 scans with a resolution of 1 cm^{-1} . For each sample, two different spectra were recorded on the same Quest ATR device using interchangeable diamond and germanium ATR crystals. The raw ATR spectra are reported in absorbance units, without any correction treatment or baseline subtraction.

The modeling strategy has been extensively detailed in Aufort et al. (2016). Briefly, the theoretical ATR spectrum is obtained by computing the frequency-dependent reflection coefficient with a 45° incidence angle at the interface between the ATR crystal, defined as a homogeneous isotropic medium with constant refractive index (2.4 for diamond and 4 for Ge), and the sample. The powder sample is characterized by a dielectric function computed for a mixture of spherical apatite particles and embedding matrix, using the Bruggeman effective medium model (Bruggeman 1935). In this model, both the particles and matrix domains are considered as being inserted in an effective medium, leading to a self-consistent relation between the effective medium properties and those of individual constituents. The uniaxial dielectric tensor of bulk apatite is obtained from its microscopic vibrational and dielectric properties using a Drude-Lorentz expression (Table 4.2.2). All microscopic sources of broadening are assumed to be effectively accounted for by the damping parameter of the Drude-Lorentz model. The embedding matrix is described using a constant refractive index varying between 1 for air in a porous mineral-air sample to ~ 1.6 for pure collagen (Wang et al. 1996).

No attempt was made to consider the specific vibrational properties of collagen. The varying parameters used to calculate the theoretical spectra are thus restricted to the refractive index of the ATR crystal, the mineral fraction and the dielectric constant of the embedding matrix (ϵ_h) (Table 4.2.1). Theoretical spectra computed for systematic variations of these parameters are reported as Supplementary Information. The effective medium approximation considers the sample homogeneous at the length scale of the experiment, typically requiring particle sizes smaller than a few μm . To compare calculation with experiment, the theoretical intensities were multiplied by a scale factor, to account for inhomogeneities of the samples at larger length scales, e.g. related to the imperfect grinding of organic-mineral mixtures and/or imperfect contact between the powder sample and the ATR crystal (Table 4.2.1).

Table 4.2.1 Sample source and description, N wt%, and parameters used to define the binary composite for the corresponding modeled ATR spectra shown in Fig. 4.2.1.

Sample	Description - origin	Age	N wt. % ^a	Min. fraction vol. %	ϵ_{host}	scale factor
Ox	Ox bone	Modern	3.96 ^a	40	2.5	0.175
HAR	Harsova Tell, Romania	Chalcolithic	2.75 ^a	40	2.5	0.175
BZ-PJ1-09	Bize-Tournal Cave, France	Prehistoric	1.80 ^a	40	1.9	0.33
EH2-20	El Harroura Cave, Morocco	Neolithic	0.16 ^a	45	1.0	1.0
Enamel	Camelidae tooth enamel ^b	Modern	n.d.	55	1.0	0.8

^aLebon et al. (2014), ^bYi et al. 2014

Table 4.2.2 Parameters used to model the dielectric tensor of carbonated hydroxylapatite. The Cartesian components of the uniaxial tensor are defined by a Drude-Lorentz expression:

$$\epsilon_{\alpha}(\omega) = \epsilon_{\infty} + \sum_i \frac{A_{i,\alpha}^2}{(\omega_i^2 - \omega^2 - i\omega\Gamma_i)}$$

where α refers to the Cartesian axis, $\epsilon_{\infty} = 2.65$ is the high-frequency dielectric contribution considered here to be real, constant and isotropic, ω_i is the vibrational transverse optical frequency, $A_{i,\alpha}^2$ the effective mode oscillator strength, and Γ_i is the damping parameter of vibrational mode i .

Symmetry	Mode	ω_i (cm ⁻¹)	$A_{i,\alpha}$ (cm ⁻¹)	Γ_i (cm ⁻¹)
A _u	v ₃ (PO ₄)	1027	665	40
	v ₂ (CO ₃)	874	80	16
	v ₄ (PO ₄)	560	300	15
	v ₂ (PO ₄)	473	45	15
E _{1u}	v ₃ (PO ₄)	1090	270	40
	v ₃ (PO ₄)	1032	630	40
	v ₁ (PO ₄)	958	110	18
	v ₂ (CO ₃)	880	30	5
	v ₂ (CO ₃)	874	80	16
	v ₄ (PO ₄)	600	215	15
	v ₄ (PO ₄)	580	120	15

4.2.4 Results and discussion

Experimental diamond and Ge ATR spectra of modern ox bone (Figure 4.2.1) display the usual absorption bands ascribed to the internal vibrations of apatitic orthophosphate groups, to structural carbonate impurities located at the A and B sites (hydroxyl and phosphate sites, respectively) of apatite structure, as well as to the amide bands related to the collagen matrix (e.g. Elliott 2002). Its collagen content is estimated to be ~ 23 wt% as assessed from nitrogen concentration and intensity of amide bands (Lebon et al. 2014). A weak and broad feature at ~ 700 cm^{-1} is related to collagen absorption (Suppl. Info.). Similar spectral features for the phosphate, carbonate and amide bands are observed in archaeological bones HAR and BZ-PJ1-09 which still display a significant collagen content (16 and 11 wt%, respectively). The spectrum of altered archaeological bone (EH2-20) and modern tooth enamel display similar absorption bands except that the collagen amide bands are absent. The ATR spectra of these two samples are about four times more intense than those recorded on the collagen-rich bone samples. As previously observed by Aufort et al. (2016), significant differences are observed between the spectra recorded using a Ge or a diamond crystal for the whole series of samples. Beside a stronger intensity, the intense ν_3 stretching and ν_4 bending PO_4 bands of the diamond-ATR spectra are broadened on their low-frequency side, and the ν_3 band overlaps with the weaker ν_1 PO_4 and ν_2 CO_3 bands. They also display a greater variability among the samples, their low-frequency asymmetry being more pronounced for the collagen-rich samples (Figure 4.2.1). In contrast, the variability of the Ge spectra is weaker and mostly related to variations in the relative intensities of the amide and structural carbonate bands. Thus, the presence of the collagen matrix affects the intense phosphate bands of the diamond ATR spectra of bone samples but the similarities of Ge-ATR spectra suggest that this effect is not associated with a strong modification of the microscopic structure of apatitic crystallites.

Based on a systematic analysis of spectral changes related to variations of the macroscopic parameters describing the composite nature of the samples (Suppl. Info.), further insight in the observed variations can be gained from the comparison of experimental and modeled spectra. We stress that our modeling strategy involves a compromise between a minimal variation of model parameters (Table 4.2.1) and a reproduction of relative variations observed among the spectra. The bulk apatite properties (Table 4.2.2) are modeled using frequencies and force oscillator strengths close to those previously used to model fluorapatite spectra (Aufort et al. 2016). However, significantly higher broadening parameters must be used to account for the lower degree of crystalline order and higher strain of biogenic apatite particles. The ν_2 CO_3 bands which can overlap with phosphate-related bands of apatite have also been introduced in the model. The B-type resonance corresponds to substitution of CO_3 for PO_4 , presumably occupying a triangular face of the tetrahedral phosphate sites, and has been assumed to be isotropic. Its broadening parameter is similar to that used for ν_4 and ν_1 PO_4 bands. The A-type bands correspond to carbonate groups occupying channel sites with an orientation

parallel to the c-axis. A comparatively smaller broadening parameter was found to account for the shape of the A-type band, suggesting that the local environment of channel carbonates is less sensitive to variations in the apatite structural order. The stretching CO₃ and amide bands observed at higher frequencies (Figure 4.2.1) have not been included in the models as they do not overlap with the apatite-related phosphate bands. A single set of parameters (Table 4.2.2) describing the microscopic properties of bulk apatite is used to model the ATR spectra of the whole sample series. Each sample is thus considered as a binary composite defined by three parameters (Table 4.2.1): the mineral fraction, the dielectric constant of the other component, and a scale factor. The Ge and diamond ATR spectra are then computed by only varying the refractive index of the ATR crystal.

Collagen-poor enamel and EH2-20 bone samples are well-described as an apatite/air composite, with a larger mineral fraction for enamel than for the heavily transformed archeological bone (55 % vs. 45 %). These samples require almost no scaling of theoretical intensities to match the experimental ones (Table 4.2.1). When comparing the diamond and Ge spectra, the model reproduces the stronger spectral intensity and the downshift of ν_4 and ν_3 PO₄ bands observed in the diamond spectrum. Although the maximum of the ν_3 PO₄ bands was observed at 1026 cm⁻¹ in the Ge spectrum, close to the corresponding transverse optical frequencies (1027 & 1032 cm⁻¹; Table 3.2.2), it is shifted to 1014 and 1006 cm⁻¹ in the diamond-ATR spectrum of the EH2-20 and modern enamel samples. Similar but smaller (~6 cm⁻¹) shifts are observed and modeled for the ν_4 PO₄ band at ~560 cm⁻¹.

In contrast, the spectroscopic properties of collagen-rich modern bone samples are better reproduced considering a binary composite containing 40 vol. % of apatite particles and a second component with a dielectric constant $\epsilon_h = 2.5$, consistent with the dielectric properties of a collagen matrix (Wang et al. 1996). Compared with an apatite-air composite and for intermediate volume fractions, the increase in dielectric constant of the matrix leads to a prominent asymmetry of the ν_4 and ν_3 PO₄ bands in the diamond-ATR spectrum but only weakly affects the line shape of the Ge-ATR spectrum (Suppl. Info.), which is consistent with the experimental observations. This pertains to the stronger effects due to anomalous dispersion in the case of a reflection on an ATR crystal with lower refractive index such as diamond (Boulet-Audet et al. 2010). The low-frequency asymmetry of the ν_4 PO₄ band in the diamond ATR spectrum is particularly sensitive to the dielectric properties of the embedding matrix (Figure 3.2.1). Note that their overlap with the broad and intense ν_3 PO₄ band results in an asymmetric line shape of the weak ν_2 CO₃ and ν_1 PO₄ bands in the diamond-ATR spectrum, a feature reproduced in the modeled spectrum. The spectra of HAR and BZ-PJ1-09 samples with intermediate amounts of collagen are close to those of modern ox bone. The properties of sample HAR, the estimated collagen content of which is ~ 16 wt. %, are well reproduced using the same mineral fraction and matrix dielectric constant (ϵ_h) as for the modern bone. For the more transformed sample BZ-PJ1-09, the estimated collagen content (~ 11 wt. %) of which is

about half that of a modern bone, a better agreement with the experimental spectra is achieved for a lower value of the dielectric constant of the host matrix ($\epsilon_h = 1.9$), keeping the mineral fraction constant (40 vol. %). The decrease in collagen content is correlated to a less pronounced broadening of the ν_3 PO₄ and ν_4 PO₄ ATR bands toward lower frequencies, reproduced in the model by lowering the dielectric constant of the host matrix.

In agreement with experimental observations, variations of ϵ_h result in little changes in the line shape of modeled Ge ATR spectra (Suppl. Info.). However, the theoretical spectra of collagen-rich samples overestimate the intensity of their experimental counterparts, which are about four times less intense than those of collagen-poor samples (e.g. for modern ox bone the theoretical intensities require a 0.175 scale factor to match the experimental ones). As discussed in Aufort et al. (2016), this theoretical overestimation is most likely related to sample heterogeneities but further grinding of the collagen-rich samples did not allow recovering the theoretical intensities. Note that a decrease in the mineral fraction modifies the line shape (Suppl. Info.) and cannot account for a simple decrease of the whole spectrum intensity.

Summarizing the present results, an effective medium modeling of the powder sample's dielectric properties based on the Bruggeman scheme and using a minimum number of free parameters accounts for the variability of major phosphate bands in the ATR spectrum of bone and tooth enamel samples with various collagen contents. Importantly, the microscopic properties of the apatite are not used as free parameters in the modeling of the different spectra, underlining the key influence of effective medium parameters. This further suggests that the strong ATR-FTIR bands related to phosphate vibrations are significantly affected by electrostatic effects occurring at a mesoscopic scale in the composite samples and much less by molecular-level interactions between the organic and inorganic components. Owing to these electrostatic effects, the experimental ATR-FTIR spectrum of a bone cannot be considered as a simple superposition of the ATR-FTIR spectra of apatite and collagen.

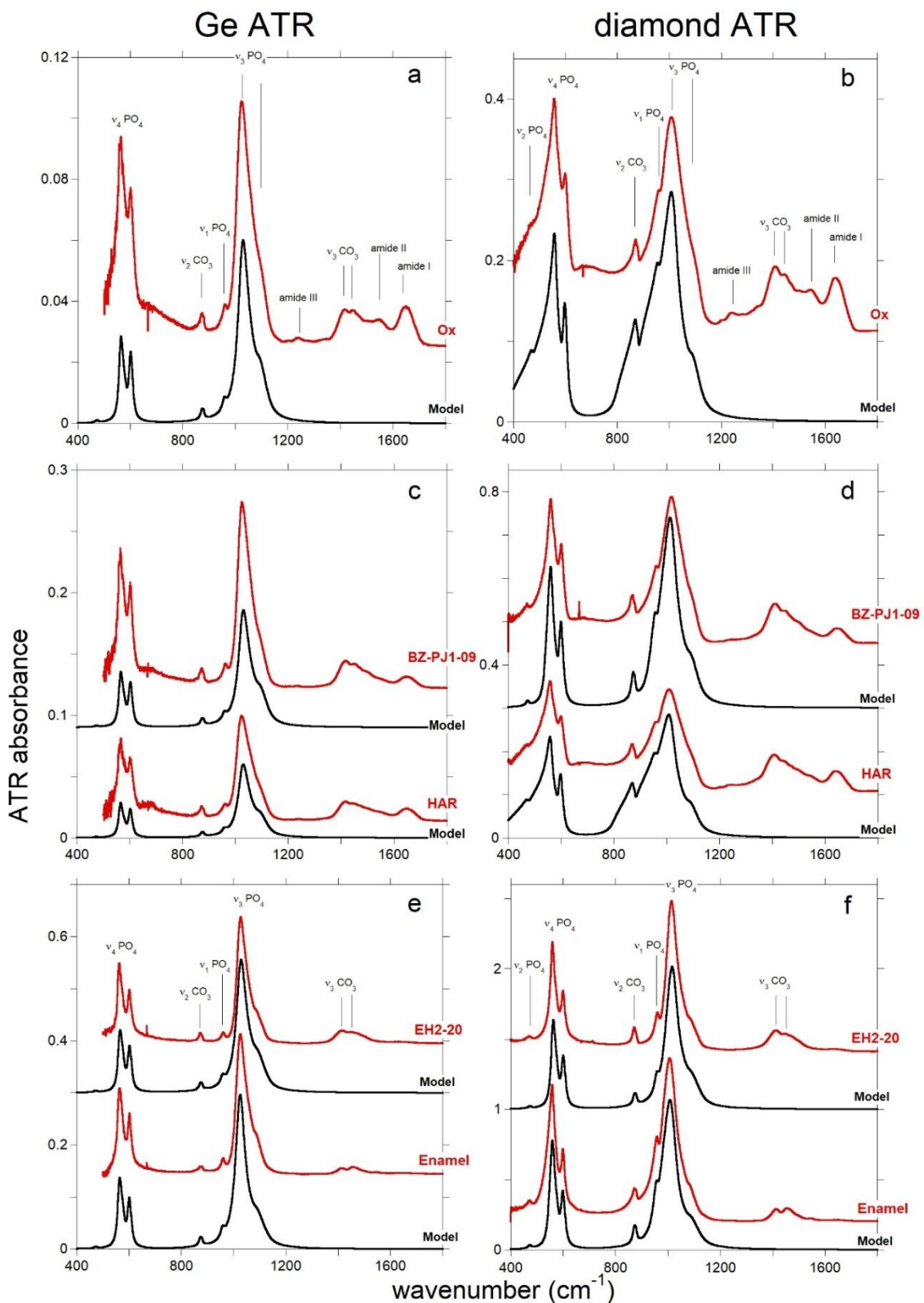


Figure 4.2.1 Experimental and modelled ATR-FTIR spectra of modern ox bones (A,B), archaeological animal bones with intermediate levels of collagen preservation (C,D); low collagen containing archaeological bone and tooth enamel (E,F). Spectra A, C and E have been recorded using a Ge ATR crystal. Spectra B, D and F have been recorded using a diamond ATR crystal. Experimental ATR-FTIR spectra have been shifted vertically for comparison.

4.2.5 Implications

The study of bone material using ATR-FTIR spectroscopy is carried out in a broad range of fields, from paleontology, archaeology and forensics to biomedical applications. Our results highlight yet another consequence of the complex composite nature of bone and of the intricate relationship between the closely intertwined organic and inorganic components at the different scales of bone's hierarchical structure. From the preservation assessment of archaeological finds to the conception of hydroxylapatite-based biomaterials for biomedical applications, the interpretation of ATR-FTIR spectra of bone materials should carefully consider mesoscopic scale effects in addition to the atomic scale organization of the sample.

Acknowledgments

This work was supported by French state funds within the framework of the Cluster of Excellence MATISSE led by Sorbonne Universités and within the INTERRVIE action of the 2016 CNRS-INSU TelluS program. We thank two anonymous reviewers and Prof. emer. Dr Robert B. Heimann for their thoughtful comments.

Supplementary information

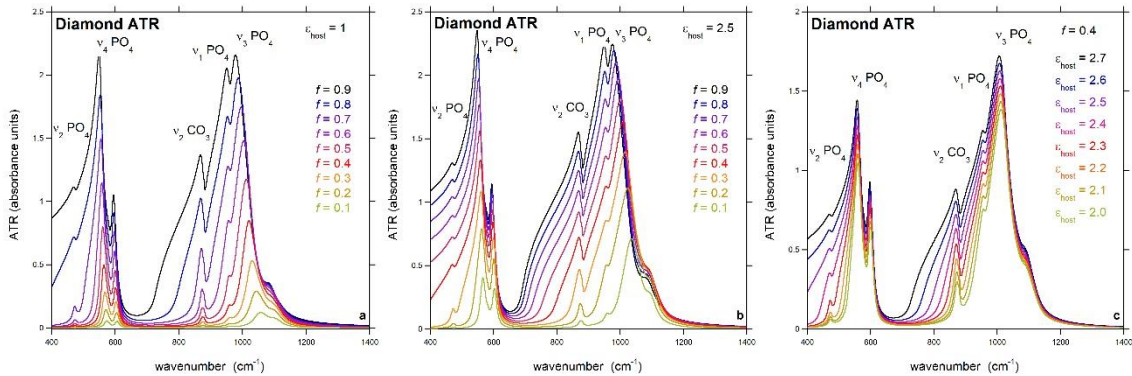


Figure S1 Modelled diamond ($n=2.4$) ATR spectra of apatite for: a. varying volume fractions of apatite in a composite apatite/host matrix where the dielectric constant of the host matrix is $\epsilon_h = 1$, b. varying volume fractions of apatite in a composite apatite/host matrix where the dielectric constant of the host matrix is $\epsilon_h = 2.5$, c. varying dielectric constant of the host matrix at a constant volume fraction of apatite $f = 0.4$.

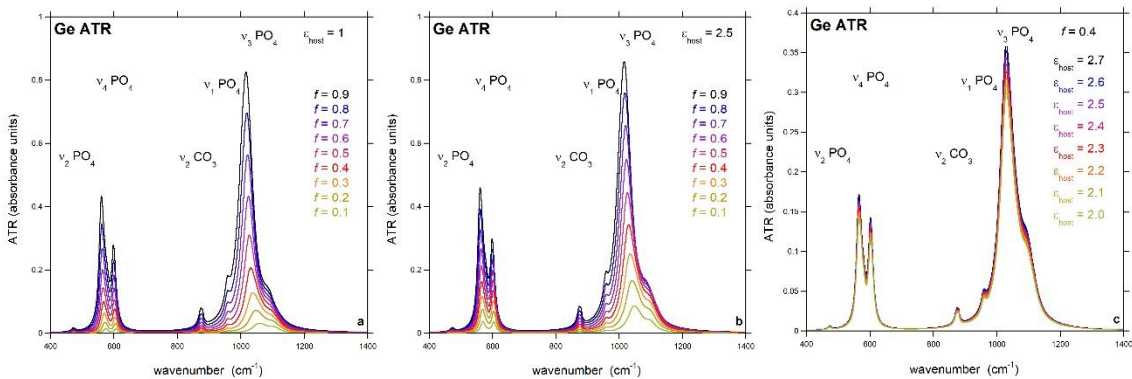


Figure S2 Modelled Ge ($n=4$) ATR spectra of apatite for: a. varying volume fractions of apatite in a composite apatite/host matrix where the dielectric constant of the host matrix is $\epsilon_h = 1$, b. varying volume fractions of apatite in a composite apatite/host matrix where the dielectric constant of the host matrix is $\epsilon_h = 2.5$, c. varying dielectric constant of the host matrix at a constant volume fraction of apatite $f = 0.4$.

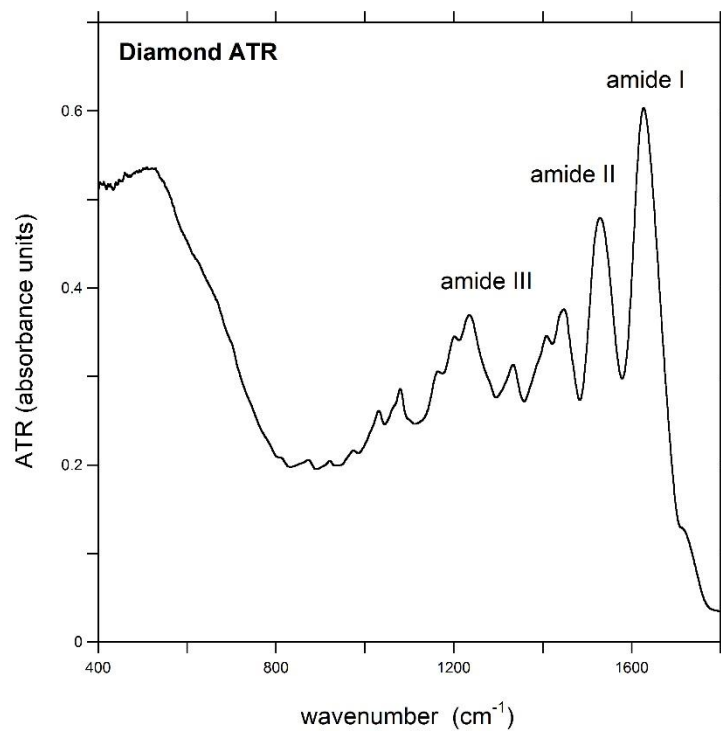


Figure S3 Diamond ATR-FTIR spectrum of pure bone extracted collagen

Partie III

Applications géochimiques

Chapitre 5 : Transformations à l'échelle atomique d'os actuel en conditions contrôlées

Ce chapitre propose l'étude des transformations cristallichimiques d'échantillons d'os actuels altérés dans des conditions contrôlées. L'objectif est ici de préciser les modes d'incorporations du fluor dans l'os ainsi que les mécanismes de couplage entre le fluor et les groupements carbonates. Une attention particulière est portée au comportement isotopique et à une éventuelle fermeture du système après un certain degré de transformation de la bioapatite. Si à terme l'objectif est d'évaluer l'influence des transformations sur l'enregistrement isotopique, une meilleure connaissance des mécanismes de transformation des os permettra également de mieux contraindre leur utilisation comme témoins des conditions précoces de fossilisation.

5.1 Résumé de l'étude

Les reconstructions des environnements, climats et régimes alimentaires anciens basés sur l'analyse de la composition isotopique de restes de vertébrés fossiles dépendent crucialement de leur degré de préservation. Par rapport à l'apatite biologique originelle, la composition chimique et les caractéristiques structurales des fossiles tendent vers celle de la fluorapatite carbonatée. Si la littérature s'accorde sur le fait que cette transformation se produit par dissolution-recristallisation de la bioapatite, les processus impliqués à l'échelle atomique ne sont pas encore élucidés.

Dans cette étude, de l'os actuel (poudre et monolithes) est altéré dans des solutions aqueuses de pH variable (neutre à basique), à des températures comprises entre 20 et 70°C et pendant 1 à 3 semaines. Chaque expérience est réalisée deux fois, en présence et en l'absence de fluor dans la solution. Les transformations sont sondées par une approche multi-analytique combinant analyse chimique et isotopique, spectroscopie infrarouge et Raman, RMN et DRX.

Les transformations observées suite à l'altération de l'os en solution aqueuse attestent d'un processus de dissolution-recristallisation partielle de la bioapatite à l'origine de la formation d'apatite secondaire à la surface des cristallites. Celle-ci correspond à de la fluorapatite carbonatée en présence de fluor et à de l'hydroxyapatite carbonatée en l'absence de fluor. La déconvolution de la bande ν_1 PO₄ des spectres Ge ATR-FTIR montre que la fraction maximale d'apatite secondaire formée dans ces conditions est d'environ 60%. Sa formation à la surface des cristallites d'apatite biogénique pourrait donc avoir un rôle protecteur empêchant une transformation plus importante du matériau d'origine. Les échantillons fluorés présentent des fractions d'apatite secondaire plus élevées que les échantillons non fluorés, ce qui suggère que la transformation est plus rapide en présence de fluor, en accord avec la plus faible solubilité de la fluorapatite comparée à l'hydroxyapatite. L'incorporation de carbonates dans l'apatite

secondaire est plus facilement détectée en présence de fluor car le défaut mixte (CO_3^{2-} , F^-) présente des signatures spécifiques en ATR-FTIR et ^{19}F RMN. En l'absence de fluor, les perturbations de la composition isotopique en carbone suggèrent que l'hydroxyapatite secondaire est également carbonatée.

La dissolution-recristallisation de la bioapatite se produit sans modification significative du rapport des carbonates en site A et B sans pour autant exclure l'incorporation de carbonates dans l'apatite secondaire. Ces résultats soulignent donc la difficulté de relier les transformations minéralogiques à la préservation de la composition isotopique. Enfin, ils montrent également qu'il est possible d'élucider les processus de dissolution-recristallisation de l'os en combinant des outils spectroscopiques pour sonder la matière à l'échelle atomique à des mesures de la composition isotopique des différents sites structuraux de l'apatite.

Article IV: Atomic scale transformation of bone in controlled aqueous alteration experiments

Julie AUFORT, Christel GERVAIS, Loïc SEGALÉN, Nathalie LABOURDETTE, Cristina COELHO DIOGO, Benoît BAPTISTE, Olivier BEYSSAC, Romain AMIOT, Christophe LECUYER, Etienne BALAN

Manuscrit soumis au journal *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*

Abstract

The chemical and isotopic compositions of biogenic apatite are important geochemical markers, which can suffer modifications during fossilisation. Compared with modern ones, fossil apatites generally exhibit an overall decrease in carbonate content, enrichment in fluorine, incorporation of trace elements and an increase in crystallinity parameters. Detailed understanding of these transformations induced by fossilisation should help assess the preservation of geochemical records in apatites. In this contribution, we investigate the transformation of modern bone altered under controlled conditions. Modern bone samples were soaked in aqueous solutions of neutral to alkaline pH for periods up to 3 weeks at various temperatures (20-70°C) and experiments were duplicated in fluorine-free and in 10^{-2} M NaF solutions. Their transformation was monitored through the modifications of chemical (F, Ca, P) and isotopic ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}_c$, $\delta^{18}\text{O}_p$) composition as well as using vibrational (ATR-FTIR, Raman) and solid-state NMR spectroscopies. The observed modifications sustain a transformation mechanism through partial dissolution of biogenic apatite and precipitation of secondary apatite. This transformation occurs irrespective of the presence or absence of fluorine and leads to the formation of carbonate-bearing fluorapatite or hydroxyapatite, respectively. The fraction of secondary apatite seems to be limited to ~60 %, suggesting that its formation

has a protecting role against further dissolution of the primary apatite. The observation of clumped (CO_3^{2-} , F^-) defect in the structural B-site of some samples as well as perturbation of the isotopic compositions attest to carbonate incorporation in the secondary apatite. Although the incorporation of fluoride ions can serve as a probe revealing dissolution-recrystallization of bone, the present study also underlines the difficulty to systematically relate mineralogical transformations to the geochemical opening of apatite.

5.2 Introduction

Vertebrate bones and teeth are composed of three constituents: a mineral component and a fraction of organic and water molecules (Pasteris et al. 2008). The inorganic component is a form of hydroxyl-deficient nanocrystalline carbonate-bearing hydroxylapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) (Elliott 2002). During biomineralization, the stable isotope compositions of structural carbonate and phosphate groups in bioapatite record a combination of environmental features and biological processes. Carbon and oxygen isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$) in bioapatite reflect that of ingested food (DeNiro and Epstein 1978; Lee-Thorp et al. 1989; Cerling and Harris 1999; Passey et al. 2005) and drinking water (Longinelli 1984). They can provide information on the dietary preferences (Cerling et al. 1999) of vertebrates and on the climatic conditions that prevailed in the environment (Fricke et al. 1998; Levin et al. 2006). The stable isotope compositions of fossil remains of vertebrates are thus widely used to reconstruct past climates and past environments (e.g. Kohn and Cerling 2002; Amiot et al. 2004; Kingston and Harrison 2007; Tütken et al. 2007; Roche et al. 2013).

The fossilisation process involves several mechanisms that can affect the mineralogical and crystal-chemical composition of vertebrate skeletal tissues: degradation of the organic matrix, variation of the carbonate content, enrichment in foreign elements such as rare earth elements and fluorine, as well as an increase in crystallinity (e.g. Hedges 2002; Trueman et al. 2008; Roche et al. 2010; Keenan et al. 2015). However not all skeletal tissues exhibit the same chemical-structural characteristics. Bones consist of about 50 vol% of ~ 2 nm thick, 10-20 nm wide and 20-50 nm long apatitic nanocrystallites and a nearly equivalent volume of collagen fibrils (Glimcher 2006; Pasteris et al. 2008). In contrast, tooth enamel is made of ~90 vol% of larger apatite crystallites and low organic matter and water content (LeGeros and LeGeros 1984, Elliott 2002). In bones, the smaller crystal size leads to a high specific surface area, resulting in higher reactivity and solubility compared to tooth enamel (LeGeros 1991). Bone is thus expected to be less resistant to post-mortem alteration than the more mineralized and less porous tooth enamel (Michel et al. 1995; Lee-Thorp and Sponheimer 2003; Pasteris and Ding 2009). For this reason, paleoenvironmental reconstructions in continental environments are mainly carried out based on stable isotope analysis of fossil enamel (Wang and Cerling 1994; Ayliffe et al. 1994). However, fossil enamel may be scarce in certain fossilisation contexts whereas bone fossils can be retrieved in larger quantities and a few major taxa do not have teeth, such

as birds or primitive fishes. Moreover, while in mammals enamel is mineralized during childhood, bone apatite also provides dietary information about adult life stages that can be further completed by the joint stable isotope analysis of collagen, when preserved (Lee-Thorp and Sponheimer, 2003; Lee-Thorp, 2008). Furthermore, the study of bone diagenetic processes has wide implications, both in archaeological contexts where preservation assessment of bones is key to bone collagen dating (Lebon et al. 2016) and in oceanic environments where biomineralized tissues of Devonian fishes shed light on their ontogeny and taphonomy (Chevrin et al. 2015).

Overall, fossil bones and teeth tend to display a transformation of the original apatite towards a carbonated fluorapatite. This transformation most likely occurs via a dissolution/recrystallization mechanism driven by the lower solubility of fluorapatite (Trueman and Tuross, 2002; Kolodny 1996). Recent study of early diagenetic processes suggested that formation of fluorine-enriched apatite can occur rapidly, within one month of burial (Keenan 2017). Studies that have focused on the incorporation of rare earth and trace elements in fossil bone also suggest that diffusion processes pervasively affect the organo-mineral weft (Millard and Hedges 1996, Kohn et al. 2008). Accordingly, the extent of diagenetic transformations can be assessed from the chemical or isotopic composition characteristics of fossils, whereas optical or scanning electron microscopic observations may fail to detect incipient transformations of apatite.

Mineralogical investigations based on vibrational FTIR or Raman spectra, and X-ray diffraction (XRD) can also bring precious information on the transformations of biomaterials. They often rest on the estimation of crystallinity indices (Shemesh 1990, Weiner and Bar-Yosef 1990, Person et al. 1995, Sillen and Morris 1996, Sponheimer and Lee-Thorp 1999), accounting for modifications of the size and/or structural order of apatite particles. These indices are technique-dependent and can differently reflect the natural heterogeneity of bioapatites (Surovell and Stiner 2001; Nakano et al. 2002). As a result, explicit correlations are hardly identified between crystallinity indices and intake in trace elements or perturbation of the isotopic composition of fossils (Pucéat et al. 2004; Trueman et al. 2008).

These previous studies call for in-depth analysis of the atomic scale transformations of bone when exposed to aqueous fluids. In the present contribution, artificial alteration experiments are carried out on modern bone samples in order to better specify the physical-chemical mechanisms involved in bone diagenesis. Modifications of the chemical and stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$) compositions observed on the reacted samples are interpreted under the light of the crystal-chemical transformations inferred from their vibrational spectra (ATR-FTIR, Raman), solid-state Nuclear Magnetic Resonance (^{19}F , ^{13}C , and ^1H NMR) spectra and X-ray Diffraction (XRD) patterns. A peculiar attention is given to the role of fluorine and to the behaviour of structural carbonate groups in the transformation mechanism.

5.3 Materials and Methods

5.3.1. Samples description and alteration conditions

The materials used in the following alteration experiments all come from a metapodial bone of modern ox, TH1, collected on the shores of the Bogoria Lake (Kenya). Two types of samples are investigated to provide complementary results: bone powders allow for a high rate of transformation and bone wafers provide spatial information. The cortical bone was sawn into 1 to 2 mm thick wafers using an IsoMet diamond-edged saw. Bone powders were obtained with a rotary drill equipped with a diamond-tipped burr and ground with an agate mortar and pestle. These bone wafers and powders were used directly in the alteration experiments described below without any pre-treatment. Either the bone wafer or bone powder (~ 600 mg) is soaked in 100 mL of solution for various amounts of time listed in Table 1 without stirring. The solution is then filtered to collect the powder sample while the wafer is recuperated and rinsed. In both cases, samples are then left to dry overnight in an oven at 60 °C. Various alteration conditions were investigated and are described in Table 5.1. Following the protocol used for the experimental fluorination of modern horse tooth by Pasteris et al. (2009), a phosphate buffer solution (Fisher Chemical, Fisher Scientific UK, Loughborough, Leics) was used at pH 7. A phosphate-free 20 mM piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES) organic solution was also tested as pH 7 buffer. For alkaline conditions, 100 mL of KOH solutions at pH 9 (10^{-5} M) and pH 10 (10^{-4} M) were used. For each pH condition, alteration experiments were duplicated using either a fluorine-free solution or a fluorinated solution with a 10^{-2} M NaF concentration. Throughout the manuscript, each experiment is referred to by a letter, the prime symbol referring to the fluorinated sample. Reacted samples in fluorine-free solutions will be referred to as control samples. Finally, a natural sample of carbonated fluorapatite originating from the sedimentary phosphate deposit of Taiba, Senegal, was used as a reference sample (Morin et al. 2002).

5.3.2. Analytical techniques

Fluorine content and Ca/P ratios are reported in Table 5.2. For each analysis, 100 mg of sample was dissolved in a 30% nitric acid solution for 1h at 80°C following the protocol previously used by Maurer et al. (2011). Fluorine content was measured using a fluoride ion selective electrode (Mettler Toledo), Ca was measured by energy dispersive X-ray fluorescence (Niton XL3t Thermo Fischer scientific) and phosphorus by spectrophotometry (Milton Roy Spectronic 301 spectrometer). The estimated analytical error based on the analysis of a certified reference material (bone ash SRM 1400) is about 5%.

ATR-FTIR spectra were recorded using a Quest ATR device and a Nicolet 6700 FTIR spectrometer. Pure powder samples were packed at the surface of the ATR crystal and two different spectra were recorded for each sample, using either a diamond or a Ge ATR crystal,

between 400 and 4000 cm^{-1} by averaging 200 scans with a resolution of 1 cm^{-1} . The use of a diamond ($n = 2.4$) ATR crystal allows the detection of relatively weak bands, such as those ascribed to carbonate impurities, whereas Ge ($n = 4$) ATR is less affected by electrostatic effects and provides a better insight into the sample microscopic structure (Aufort et al. 2016). All ATR spectra are reported in absorbance units $A = \log(I_0/I_R)$ where I_0 and I_R are the intensities of the incident and reflected light, respectively.

Raman spectra were obtained using a Renishaw InVia Reflex spectrometer. A microscope was used to focus the 532 nm laser beam on a $\sim 4 \mu\text{m}$ spot with a x 50 long-working distance objective (numerical aperture 0.45). A maximal 5 mW laser power was delivered at the sample surface.

X-Ray powder Diffraction measurements were carried out on a Panalytical Empyrean diffractometer using Cu K_α radiation source ($\lambda_{K\alpha 1} = 1.540598 \text{ \AA}$, $\lambda_{K\alpha 2} = 1.544426 \text{ \AA}$) and a PIXcel3D detector. X-ray data were collected between 5° and $130^\circ 2\theta$ with a $0.01^\circ 2\theta$ step for 7 hours. Cell parameters, mean coherent domain (MCD) sizes and microstrain were refined using Le Bail method as implemented in the Fullprof software (Rodriguez-Carvajal 1993). Starting from the known cell parameters of apatite, the LeBail refinements converged rapidly. Since the peak width was larger than the instrumental one, lorentzian isotropic size (Y) and lorentzian isotropic strain (X) parameters were refined. The two effects can be decoupled on the diagram measured over a wide angular range because the first induce a peak broadening as $Y/\cos\theta$ whereas the second as $X\tan\theta$. Then, anisotropic refinements of size parameters significantly improve the fit and the corresponding spherical harmonic coefficients are given in Table S1.

Single-pulse ^{19}F magic angle spinning (MAS) NMR experiments were performed on an Avance 700 Bruker spectrometer (16.3T) operating at 658.93 MHz using a 4 mm rotor at a 14 kHz spinning frequency. Cross-polarization ^{13}C CP MAS NMR experiments were performed on an Avance 300 Bruker spectrometer operating at a Larmor frequency of 75.51 MHz using a 7 mm rotor at a 5 kHz spinning frequency. Single-pulse ^1H MAS NMR experiments were performed on an Avance 700 Bruker spectrometer operating at 700.29 MHz using a 2.5 mm rotor at a 30 kHz spinning frequency.

Stable isotope measurements were performed on the carbonate and phosphate components of altered bone powder samples. For the carbonate component, the carbon and oxygen isotope compositions were measured ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonate}}$). Samples weighing 800 μg were analysed on a Kiel IV device coupled to a DeltaV Advantage IRMS. Samples were reacted under vacuum with 100% orthophosphoric acid at 70°C to generate water vapour and carbon dioxide. The resultant CO_2 was then purified in an automatic cryogenic trapping system. Measurements were normalised to the NBS 19 standard. The stable oxygen isotope ratio of carbonate in bioapatite was calculated using the temperature-dependent fractionation factor

between calcite and CO₂ (Kim et al. 2007). Uncertainties given are calculated from measuring the samples three times. Regarding the oxygen isotope composition of the phosphate component ($\delta^{18}\text{O}_{\text{phosphate}}$), apatite powders were treated following the protocol described by Crowson et al. (1991) slightly modified by Lécuyer et al. (1993). This protocol consists in the isolation of structural phosphate in apatite as silver phosphate (Ag₃PO₄) crystals using acid dissolution and anion-exchange resin. After dissolution of 15 mg of powdered bone in 2 M HF at 25 °C for 24 h, the CaF₂ residue is separated from the solution that included the phosphate by centrifugation. This solution is then neutralised by adding 2.2 mL of 2 M KOH. Then, 2.5 mL of Amberlite™ anion-exchange resin is added to the solution to separate the PO₄³⁻ ions. The solution is removed after 24 h and the resin is eluted with 27.5 mL of 0.5 M NH₄NO₃ for 4 h. a volume of 0.5 mL of NH₄OH and 15 mL of an ammoniacal solution of AgNO₃ are then added and the samples are placed in a thermostated bath at 70°C for 7 h, allowing the precipitation of Ag₃PO₄ crystals. Oxygen isotope compositions were measured using a VarioPYROcube™ elemental analyser (EA) interfaced in continuous flow (CF) mode to an Isoprime™ isotopic ratio mass spectrometer hosted by the Laboratoire de Géologie de Lyon (Université Claude Bernard). For each sample, five aliquots of ~300 µg of silver phosphate were mixed with the same amount of pure graphite powder in silver foil capsules and pyrolysis was performed at 1450 °C. Measurements were calibrated against the NBS120c standard whose value was fixed at 21.7 ‰ (V-SMOW) according to Lécuyer et al. (1993) and the NBS127 (barium sulfate, BaSO₄: $\delta^{18}\text{O} = 9.3 \text{ ‰}$ (V-SMOW); Hut, 1987).

Table 5.1 - Alteration conditions of bone wafers and powders. For each experiment, the prime symbol refers to the fluorinated bone sample.

Exp.	Sample type	Duration	Temperature (°C)	pH	Solution	[NaF]
A	Wafer	1 week	20	7	Phosphate	-
A'	"	"	"	"	"	10 ⁻² M
C	Powder	3 weeks	20	7	Phosphate	-
C'	"	"	"	"	"	10 ⁻² M
D	Powder	3 weeks	70	7	Phosphate	-
D'	"	"	"	"	"	10 ⁻² M
E	Powder	3 weeks	70	7	PIPES	-
E'	"	"	"	"	"	10 ⁻² M
F	Powder	3 weeks	70	9	KOH	-
F'	"	"	"	"	"	10 ⁻² M
G	Powder	3 weeks	70	10	KOH	-
G'	"	"	"	"	"	10 ⁻² M
H	Wafer	3 weeks	70	7	PIPES	-
H'	"	"	"	"	"	10 ⁻² M

5.4 Results

5.4.1. Chemical composition of bone samples

Fluorine content of the unaltered bone TH1 and control samples is about 0.2 wt. % (Table 5.2). Fluorinated bone powders at 70°C contain 2.0 – 2.5 wt.% fluorine whereas the bone powder fluorinated at 20°C (C') contains only 1.6 wt.% fluorine. The Ca/P molar ratio of the unaltered bone is 1.57, consistent with the range of values found in bone (Sillen and LeGeros 1991, Kourkoumelis et al. 2012). All altered bone powders have higher Ca/P molar ratios ranging from 1.64 to 1.86, values typically found in archaeological and fossil bones (Reiche et al. 2003). No significant variation in Ca/P molar ratio is observed from control to fluorinated samples but samples that reacted with phosphate buffered solutions display lower Ca/P ratios than the other samples.

Table 5.2 - Fluorine content, Ca/P molar ratio and isotopic composition of unaltered, control and fluorinated bones.

Sample	F (%)	Ca/P	$\delta^{13}\text{C}$ (‰PDB)	$\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonate}}$ (‰VSMOW)	$\delta^{18}\text{O}_{\text{phosphate}}$ (‰VSMOW)
TH1	0.20	1.57	-6.41 ± 0.20	36.31 ± 0.14	25.80 ± 0.39
C	0.23	1.66	-7.06 ± 0.02	36.19 ± 0.68	21.61 ± 0.81
C'	1.6	1.64	-7.22 ± 0.09	37.42 ± 0.02	22.65 ± 0.25
D	0.23	1.70	-7.27 ± 0.04	35.17 ± 0.19	21.18 ± 0.14
D'	2.0	1.72	-6.97 ± 0.02	36.88 ± 0.15	20.45 ± 0.13
E	0.24	1.79	-6.38 ± 0.01	33.95 ± 0.30	26.49 ± 0.17
E'	2.5	1.81	-6.50 ± 0.01	35.29 ± 0.27	26.38 ± 0.56
F	0.26	1.84	-6.50 ± 0.07	34.05 ± 0.19	26.94 ± 0.61
F'	2.2	1.82	-6.42 ± 0.01	33.15 ± 0.12	26.81 ± 0.42
G	0.24	1.86	-6.43 ± 0.01	33.55 ± 0.36	26.28 ± 0.38
G'	2.1	1.84	-6.52 ± 0.12	32.83 ± 0.23	27.03 ± 0.40

5.4.2 Oxygen and carbon isotopic compositions

Oxygen and carbon isotope compositions, ie $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonate}}$, $\delta^{18}\text{O}_{\text{phosphate}}$, and $\delta^{13}\text{C}$, of altered bone powder samples are reported in Table 5.2. Only minor deviation from the original oxygen isotope composition of structural carbonate in the non-altered bone (36.3 ‰ V-SMOW) is observed in bone powders altered in a phosphate buffer, with $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonate}}$ values ranging 35.0 - 37.5 ‰ (V-SMOW). In contrast, bone powders altered in alkaline conditions exhibit lower $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonate}}$ values, ranging 32.5 - 34.5 ‰ (V-SMOW). The situation is reversed when considering oxygen phosphate isotope compositions. The $\delta^{18}\text{O}_{\text{phosphate}}$ of samples altered in a phosphate buffer range between 20.0 and 23.0 ‰. These values are significantly lower than the initial TH1 value (25.8 ‰). Considering that inorganic oxygen exchange of phosphate groups is a very slow process (Lécuyer et al 1999, Sharp et al. 2000, Zazzo et al. 2004a), this suggests incorporation of phosphate species from the phosphate buffer, which displays a lighter oxygen

isotopic composition (12.6 ‰ V-SMOW). Other samples, altered in alkaline conditions and organic buffer, display values ranging from 26.0 to 27.2 ‰ (V-SMOW) close to that of the starting material (25.8‰). Based on isotopic compositions, it is thus possible to distinguish two groups: bone powders altered in a phosphate buffer and bone powders altered in all other conditions. This is most apparent when comparing oxygen isotope composition of phosphate, $\delta^{18}\text{O}_{\text{phosphate}}$, with carbonate, $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonate}}$ (Fig 5.1a). While oxygen isotope compositions of samples altered in alkaline conditions or in the organic buffer fall close to the $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonate}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{phosphate}}$ correlation line for bioapatites (e.g. Lécuyer et al. 2010), samples altered in the phosphate buffer deviate due to significantly lower $\delta^{18}\text{O}_{\text{phosphate}}$ values. Importantly, the type of buffer used has more incidence on the isotopic composition than the presence or absence of fluoride. Indeed, isotopic compositions do not vary significantly from non-fluorinated samples to their fluorinated counterparts. Regarding carbon isotope compositions (Fig 5.1b), samples altered in phosphate conditions also show overall $\sim 0.5\text{-}0.8$ ‰ lower $\delta^{13}\text{C}$ values than other samples, regardless of the presence or absence of fluorine.

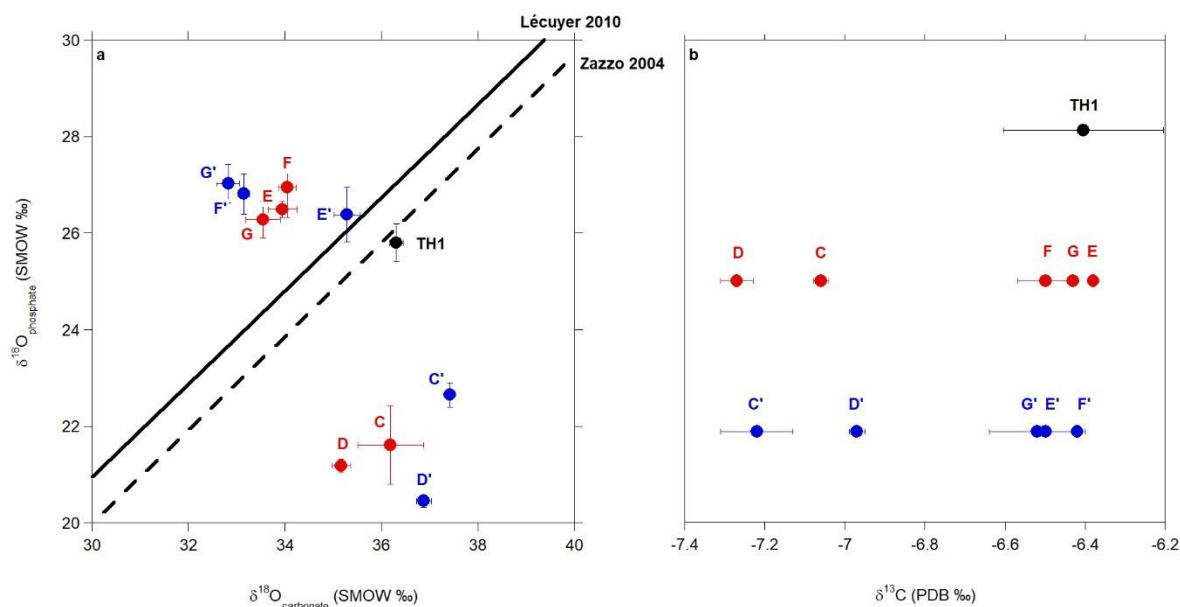


Figure 5.1 a. $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonate}}$ of the unaltered and artificially altered bone samples reported against their $\delta^{18}\text{O}_{\text{phosphate}}$ values and compared with the linear correlation derived by Lécuyer et al. (2010) from compiled data of $\delta^{18}\text{O}$ values of both carbonate and phosphate from modern mammals (solid line) and with the linear correlation derived by Zazzo et al. (2004a) from modern hippopotamuses. **b.** $\delta^{13}\text{C}$ and values of the unaltered and artificially altered bones.

5.4.3 X-ray diffraction

XRD patterns only show the presence of apatite as crystalline phase in altered bone powders (Figure 5.S1). Variations in cell parameters indicate a systematic decrease in the lattice parameter a from control to fluorinated bone powders (Table 5.3). Values of a cell parameter in samples fluorinated at 70°C range between 9.392 and 9.378 Å. An intermediate value is obtained for the sample fluorinated at 20°C (9.403 Å), consistent with its lower fluorine content

and closer to that of the original TH1 sample (9.417 Å). The process of soaking bone powders in solution leads to a significant decrease of the strain parameter and all altered samples display smaller MCD sizes in both [020] and [003] directions than the unaltered bone, TH1 (Table 5.3). Moderately larger MCD sizes are observed in fluorinated samples compared to control samples (Table 5.3).

Table 5.3 Lattice parameters (P6₃/m), average apparent size and strain from Le Bail fits of XRD data

Sample	a (Å)	c (Å)	Volume (Å ³)	Crystallite size (Å)		Average microstrain (anisotropy)
				[002]	[030]	
TH1	9.4173 (6)	6.8756 (5)	528.07 (6)	776.53	126.90	85.91 (0.094)
C'	9.4035 (3)	6.8870 (3)	527.40 (3)	308.31	114.45	31.62 (0.079)
D	9.4219 (2)	6.8867 (3)	529.44 (3)	397.58	115.30	33.74 (0.055)
D'	9.3916 (2)	6.8848 (2)	525.90 (2)	427.53	140.90	25.28 (0.062)
E	9.4155 (2)	6.8892 (3)	528.91 (3)	319.27	117.25	24.11 (0.073)
E'	9.3826 (2)	6.8879 (2)	525.13 (2)	548.21	146.92	25.41 (0.040)
F	9.4133 (3)	6.8913 (3)	528.84 (4)	441.28	120.53	39.39 (0.043)
F'	9.3777 (2)	6.8908 (2)	524.80 (2)	442.84	137.16	24.14 (0.078)
G	9.4120 (3)	6.8896 (3)	528.55 (3)	491.76	106.48	33.79 (0.047)
G'	9.3809 (2)	6.8924 (2)	525.28 (2)	520.14	141.08	27.66 (0.037)

5.4.4. Vibrational spectroscopies

Both diamond and Ge ATR-FTIR spectra of modern bone (Figure 5.2, Figure 5.S2) display the characteristic absorption bands ascribed to the internal vibrations of apatite phosphate groups, to the structural carbonate impurities located at the A and B sites (hydroxyl and phosphate sites, respectively) of apatite structure and to the amide bands related to the collagen matrix (e.g. Elliott 2002, Chadefaux et al. 2009). Intense bands observed between 550 and 600 cm⁻¹ and between 1010 and 1090 cm⁻¹ are related to the ν_4 PO₄ bending and ν_3 PO₄ stretching modes of the structural phosphate groups respectively, while the weaker band at ~960 cm⁻¹ is related to the ν_1 PO₄ stretching mode. As previously observed by Aufort et al. (2016), the line shape and particularly the width of the strong ν_4 and ν_3 PO₄ bands is affected by macroscopic electrostatic effects, i.e. related to electrostatic interactions between apatite particles and therefore depending on porosity, grain size and shapes of particles. In contrast, the position and line shape of weaker and narrower bands, such as the ν_1 PO₄ band, are less affected by these electrostatic effects and are thus expected to provide a better insight into the short-range order of the crystal structure (Balan et al. 2011, Aufort et al. 2016, 2018). However, the overlap of the ν_1 PO₄ band with the stronger ν_3 PO₄ band in the diamond ATR spectrum significantly affects the line shape of the ν_1 PO₄ band. In Ge ATR-FTIR spectra, the overlap between ν_1 and ν_3 PO₄ bands is less pronounced. Information related to the structural order of altered samples was extracted from the comparison of ν_1 PO₄ Ge ATR-FTIR bands after a baseline subtraction (Figure 5.S3) using the Baseline Spline procedure from Igor Wavemetrics.

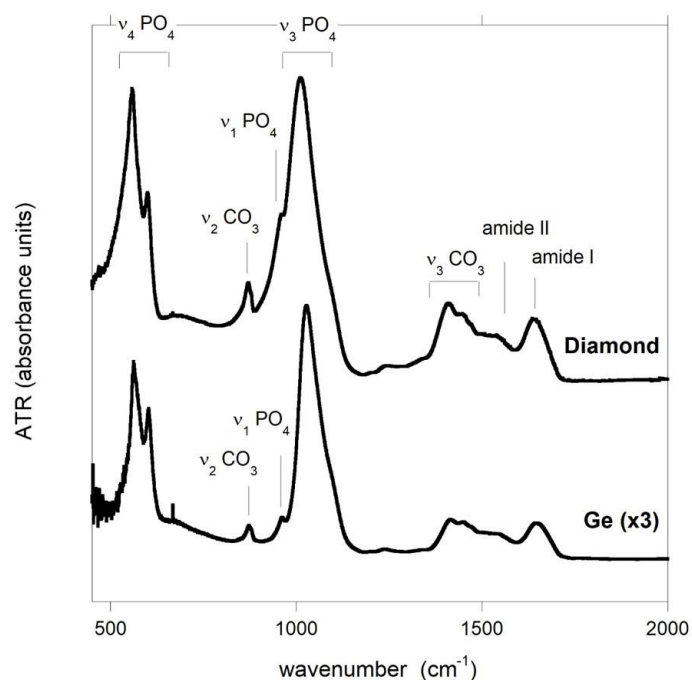


Figure 5.2 - Diamond and Ge ATR FTIR spectra of the modern bone used in all alteration experiments, TH1. For better comparison, spectra are shifted vertically and the intensity of the Ge ATR spectrum was multiplied by 3.

5.4.4.1 Structural order probed by phosphate absorption bands

5.4.4.1.1 ATR-FTIR spectrum of bone samples

The ν_1 PO_4 Ge ATR-FTIR band is located at $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ in modern ox bone TH1 and at $\sim 966 \text{ cm}^{-1}$ in the carbonated fluorapatite (C-Fap) sample. It corresponds to a large Gaussian signal in TH1 while it displays a pronounced Lorentzian shape in C-Fap. The ν_1 PO_4 Ge ATR-FTIR band is systematically shifted towards higher frequencies in all bone powder samples altered with fluorine compared to their non-fluorinated counterparts (Figure 5.3). This shift towards higher vibrational frequencies is consistent with the unit cell volume contraction typically associated with fluoride ion incorporation in the apatite channel sites. All bone powders altered with fluorine at 70°C (D', E', F', G') display a shift of $+ 2.0 - 2.5 \text{ cm}^{-1}$ compared to their respective non-fluorinated counterparts (Table 4). This shift is less pronounced ($+ 0.8 \text{ cm}^{-1}$) for the bone powder altered in a phosphate buffer at 20°C (C+NaF). This is consistent with the lower fluorine content (1.6 %) measured in this sample (Table 5.2) than in bones altered at 70°C (2.0-2.5%). Indeed, the increase in ν_1 PO_4 Ge ATR-FTIR frequency correlates with the increase in fluorine content (Figure 5.4a). In contrast, the Full width at Half Maximum (FWHM) of the ν_1 PO_4 band is not directly correlated with fluoride ion incorporation. Overall, no significant narrowing of the band is observed from non-fluorinated to fluorinated samples (Table 5.4). The line shape asymmetry was assessed from the half width at half maximum (HWHM) on the high frequency side of the band, which is systematically lower in fluorinated samples (Table 5.4). The asymmetry parameter, defined as $1 -$

$2(HWHM/FWHM)$ where HWHM is the Half Width at Half Maximum on the high frequency side, increases with increasing frequency of the ν_1 PO₄ band (Figure 5.4b). The infrared splitting factor (IRSF; Weiner and Bar-Yosef 1990) determined from the ν_4 PO₄ bands on the Ge ATR-FTIR spectra is also broadly correlated to frequency of the ν_1 PO₄ band (Figure 5.S4).

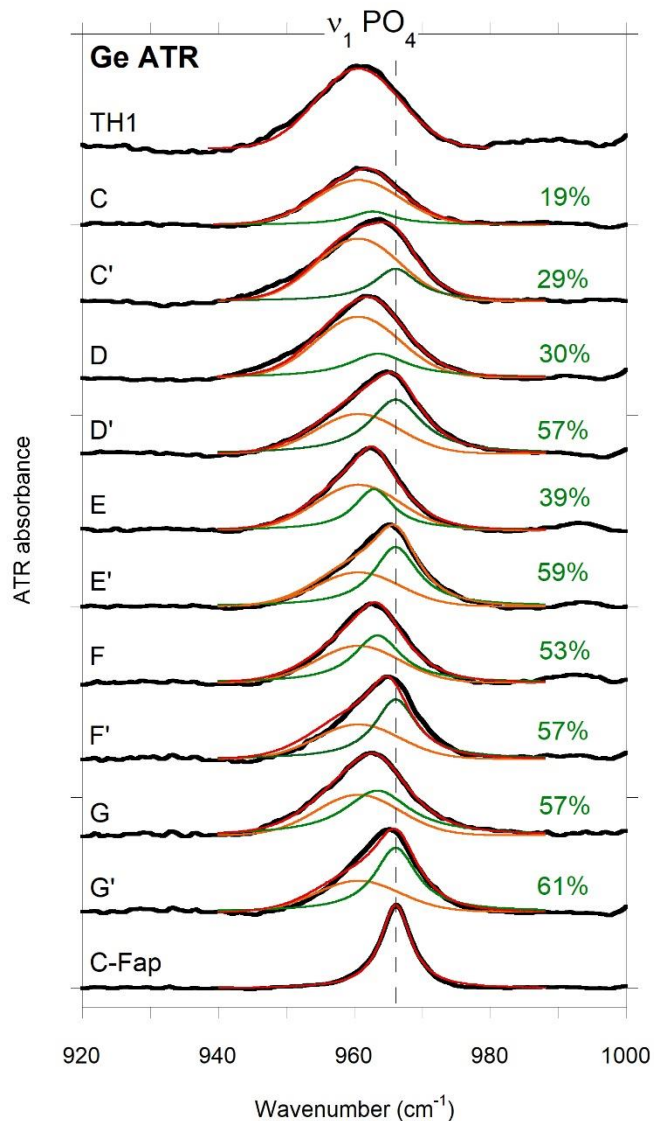


Figure 5.3 - ν_1 PO₄ Ge ATR-FTIR bands of non-fluorinated and fluorinated bone samples in different buffers and pH conditions (Experiments C, D, E, F, G) compared to the unaltered bone material (TH1) and to sedimentary carbonated fluorapatite. Fits of the ν_1 PO₄ band in altered bones Ge ATR-FTIR spectra were achieved using two components: a Gaussian signal whose position and width was kept fixed to that of the unaltered bone TH1 and a Lorentzian signal whose position was kept fixed in fluorinated samples and free in non-fluorinated samples. Parameters of the fits are reported in Table 6. Percentages of the second component are indicated on the right-hand side of the figure.

Table 5.4 - Parameters obtained from the ν_1 band in Ge ATR-FTIR spectra. In addition to the Full Width at Half Maximum (FWHM), we calculated the Half Width at Half Maximum (HWHM) on the high frequency side, the low frequency side exhibiting a pronounced asymmetry. The asymmetry parameter is then defined as $1 - 2(HWHM/FWHM)$. An asymmetry parameter equal to zero corresponds to a perfectly symmetrical band, an increase in the parameter corresponds to an increase in asymmetry. The IR Splitting Factor (IRSF) was calculated from the ν_4 PO_4 Ge ATR-FTIR band, according to Weiner and Bar-Yosef (1990). Parameters related to the Raman ν_1 PO_4 peak, i.e. position, FWHM and asymmetry, are also reported.

Sample	Ge ATR-FTIR					Raman		
	$\nu_1 \text{PO}_4$				$\nu_4 \text{PO}_4$	$\nu_1 \text{PO}_4$		
	ω (cm^{-1})	FWHM (cm^{-1})	HWHM (cm^{-1})	Asymmetry	IRSF	ω (cm^{-1})	FWHM (cm^{-1})	Asymmetry
TH1	960.6	15.1	6.86	0.091	3.64	960.5	15.6	0.051
C	961.3	15.5	6.83	0.119	3.89	960.7	13.6	0.060
C'	962.1	15.3	6.10	0.203	4.00	963.2	11.9	0.116
D	961.2	15.5	6.40	0.174	4.56	961.4	11.6	0.088
D'	963.7	15.1	5.68	0.248	5.03	963.9	10.1	0.129
E	961.7	13.3	5.57	0.162	4.28	961.6	11.6	0.088
E'	964.1	12.8	4.50	0.297	5.11	964.3	9.2	0.150
F	962.0	13.5	5.91	0.124	4.53	961.6	12.8	0.064
F'	964.0	12.7	4.56	0.282	5.88	963.9	10.0	0.140
G	962.0	15.3	6.35	0.170	4.55	961.7	13.4	0.063
G'	964.3	12.0	4.80	0.200	5.19	964.2	10.3	0.136
C-Fap	966.1	5.2	-	-	6.18	-	-	-

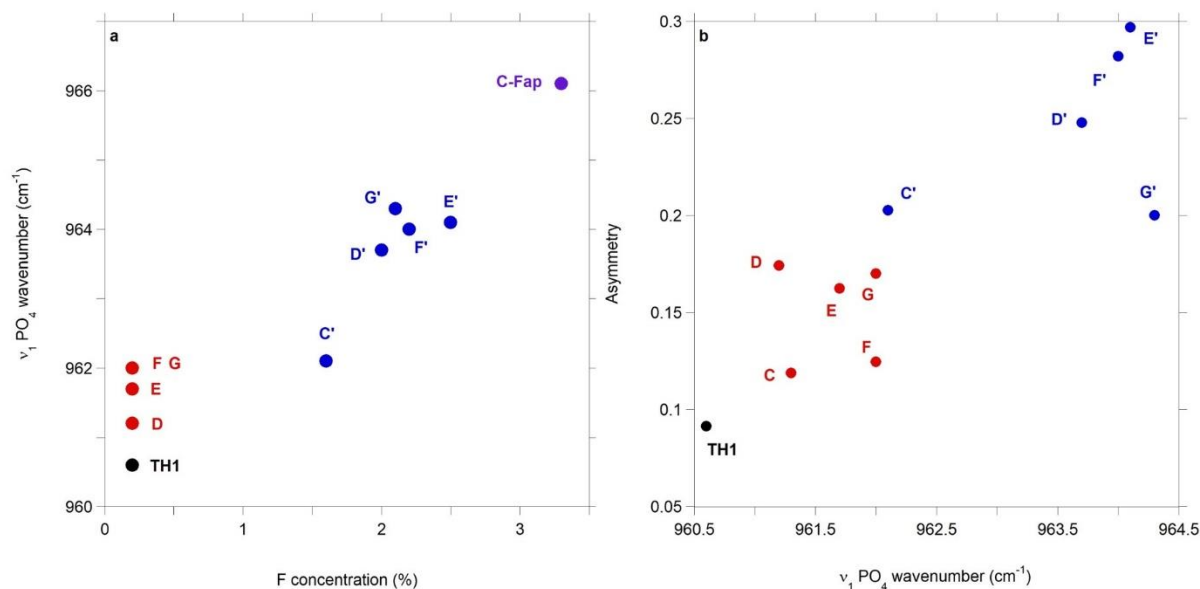


Figure 5.4 a. Position of the ν_1 PO_4 Ge ATR-FTIR band as a function of fluorine content. **b.** Asymmetry parameter as a function of the ν_1 PO_4 band frequency.

5.4.4.1.2 Raman spectrum of bone samples

Complementary information on the fluorine incorporation and structural order of the sample can also be obtained from Raman spectroscopy. An upward shift ($+1 \text{ cm}^{-1}$) in the band position of $\nu_1 \text{ PO}_4$ stretch and a decrease (-1 cm^{-1}) in FWHM was observed in the wafer sample altered in NaF for 1 week at $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Experiment A; Figure 5.5a). These observations are in agreement with the results of fluorination experiments carried out by Pasteris et al. (2009) on dentine under similar conditions and indicate fluorine incorporation in the structure. This is consistent with the similar poorer resistance to alteration of both bone and dentine relative to enamel due to smaller crystallite sizes. No further peak position shift and decrease in FWHM were observed with increasing NaF concentration (1 M), in agreement with the observations of Pasteris et al. (2009), therefore all further fluorination experiments were carried out with 10^{-2} M NaF.

A more pronounced upward shift ($+2.5 \text{ cm}^{-1}$) in the $\nu_1 \text{ PO}_4$ band position and decrease (-4 cm^{-1}) in FWHM was observed in the bone powder sample altered with NaF 10^{-2} M for 3 weeks at $20 \text{ }^\circ\text{C}$ compared to the control sample (Experiment C; Figure 5.5b). For both samples, Raman spectra were collected on various grains to check the homogeneity, reproducibility and significance of the variations observed in both peak position and FWHM. The longer duration of the experiment and the higher interface between powder and solution can account for the more important variations in Raman spectral features observed in Figure 5b compared to Figure 5a. Spectral parameters, i.e. position of the phosphate peak, FWHM and asymmetry parameter, of the other altered bone powder samples are reported in Table 5.4.

Concerning the bone wafers soaked in the organic buffer for 3 weeks at 70°C (experiment H), an upward shift ($+3 \text{ cm}^{-1}$) in the $\nu_1 \text{ PO}_4$ band position and a decrease ($\sim -4 \text{ cm}^{-1}$) in FWHM was observed in the bone wafer altered with NaF 10^{-2} M compared to the control wafer (Figure 5.5c). For both samples, Raman spectra were collected at various spots on the transect surface, from the edges to the centre, to provide spatial information on the incorporation of fluorine. Compared to spectra recorded on various grains of the bone powder (Figure 4b), a greater heterogeneity in peak positions and FWHM, ranging $959.7 - 960.6 \text{ cm}^{-1}$ and $17.1 - 13.0 \text{ cm}^{-1}$ and $962.9 - 963.8 \text{ cm}^{-1}$ and $12.5 - 9.3 \text{ cm}^{-1}$ for the control and fluorinated samples respectively, is observed between spectra collected at various spots on the transects. The whole transect is thus affected by fluorination, with some spatial variations, suggesting fluoride diffusion through the whole wafer, i.e. at the millimetre scale.

A decrease in Raman FWHM is systematically observed in samples reacted with fluorinated solutions. Raman spectroscopy thus confirms the results obtained with $\nu_1 \text{ PO}_4$ Ge ATR-FTIR bands and attests of the higher degree of crystalline order in artificially fluorinated samples. Note that Raman asymmetry parameters are about twice lower than their Ge ATR-FTIR counterparts (Table 5.4).

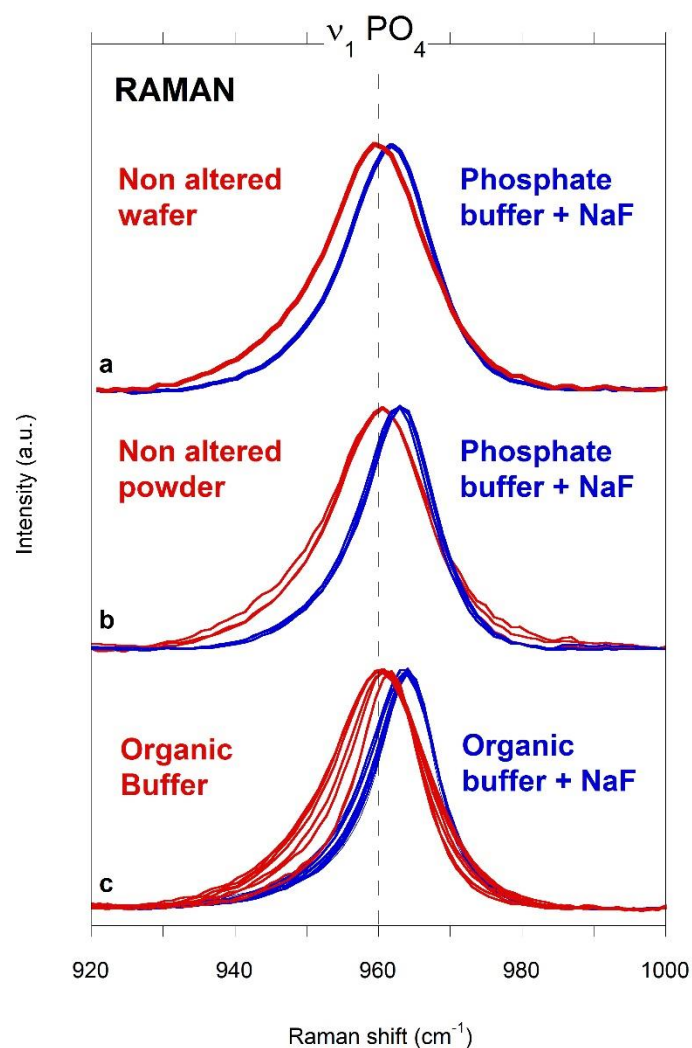


Figure 5.5 a. Raman spectra of the ν_1 PO_4 band in unaltered bone wafer and in bone wafer altered with 10^{-2} M NaF in a phosphate buffer solution for 1 weeks at 20°C (Experiment A). **b.** Raman spectra of the ν_1 PO_4 band in unaltered bone powder and in bone powder altered with 10^{-2} M NaF in a phosphate buffer solution for 3 weeks at 20°C (Experiment C). **c.** Raman spectra of the ν_1 PO_4 band collected at various loci on a transept of bone wafer altered with and without 10^{-2} M NaF in an organic buffer solution for 3 weeks at 70°C (Experiment H). Vertical line is guide for the eye.

5.4.4.2 Environment of structural carbonate groups inferred from the ν_2 CO_3 band in ATR-FTIR spectra

Regarding structural carbonate groups, diamond ATR-FTIR bands related to the ν_2 out-of-plane bending mode of CO_3^{2-} groups in bone powder samples are observed at $879\text{--}881\text{ cm}^{-1}$ for A sites and $871\text{--}873\text{ cm}^{-1}$ for B sites (Figure 5.6a). The broad band centred at $\sim 860\text{--}865\text{ cm}^{-1}$, resulting in a significant asymmetry towards low wavenumbers, is ascribed to labile carbonate groups (Rey et al. 1989; Michel et al. 1995). After normalization of the intensity using the ν_4 PO_4 band, all altered bone samples exhibit a lower carbonate content than the original TH1 sample. Furthermore, the ν_2 CO_3 band intensity decreases from non-fluorinated to fluorinated bone samples. Bone powders altered with fluorine in alkaline conditions (F', G') or at neutral pH in an organic buffer (E') display an additional signal at 865 cm^{-1} . This signal matches that

observed in the reference sedimentary carbonated fluorapatite (Figure 5.6b), i.e. a narrow peak observed at $\sim 865\text{ cm}^{-1}$. It has been ascribed to a clumped (CO_3^{2-} , F^-) defect substituting for the phosphate group in the apatite structure and has also been observed in fossil teeth from the East African Rift (Yi et al. 2013, 2014b). In contrast, no signal corresponding to the clumped (CO_3^{2-} , F^-) defect is observed in bone powders altered with fluorine in a phosphate buffer (C', D'). The clumped defect signal in the bone powder sample fluorinated in an organic buffer (E') is less intense (by $\sim 2/3$) than in bone powders fluorinated in alkaline conditions (F', G'; Figure 5.6b). Note that there is no significant variation in A/B carbonate ratios between non-fluorinated samples and their fluorinated counterparts, regardless of whether the clumped (CO_3^{2-} , F^-) defect is formed or not.

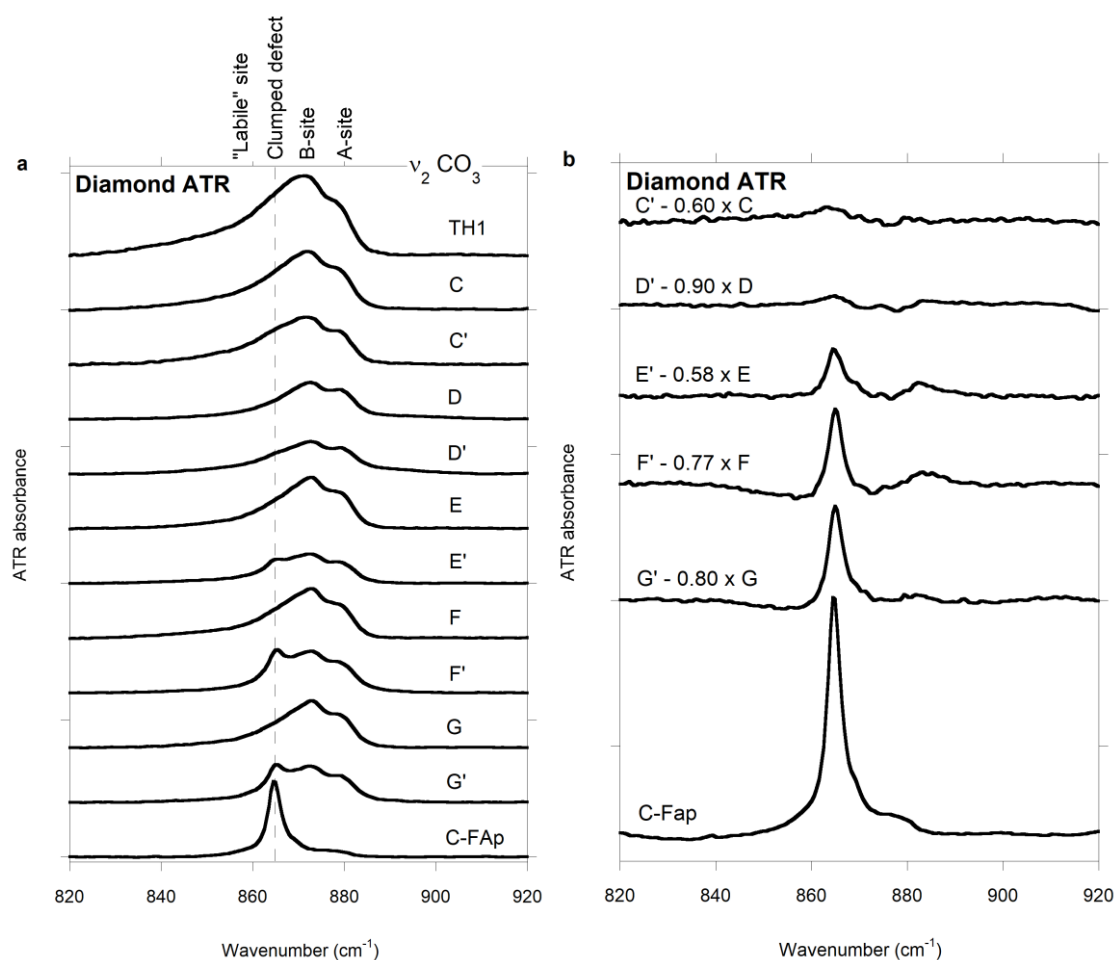


Figure 5.6 a. v_2CO_3 diamond ATR-FTIR bands of non-fluorinated and fluorinated bone samples in different buffers and pH conditions (Experiments C, D, E, F, G) compared to unaltered bone TH1 and sedimentary carbonated fluorapatite C-FAp. All spectra are normalised based on the v_4PO_4 band intensity. **b.** v_2CO_3 diamond ATR-FTIR band ascribed to the clumped defect in E', F' and G', obtained by subtracting the v_2CO_3 band of the non-fluorinated sample from the v_2CO_3 band of the fluorinated sample diamond ATR-FTIR spectra compared to the v_2CO_3 band of carbonated fluorapatite. Peak areas are 0.09, 0.13 and 0.16 respectively. Subtracted spectra were normalised on the A and B components of the v_2CO_3 band.

Ge ATR-FTIR spectra of non-fluorinated bone powders, normalized using the ν_4 PO_4 band intensity, are reported in Figure 5.7. Although displaying a lower signal/noise ratio, Ge ATR-FTIR spectra of bone powders soaked in a phosphate buffer (C, D, C', D') reveal the presence of a weak and broad signal below the ν_2 CO_3 band on its high frequency side, at ~ 890 cm^{-1} (Figure 5.7, Figure 5.S5). This spectral feature could not be observed in the matching diamond ATR-FTIR spectra, due to the strong overlap with the electrostatically broadened ν_3 PO_4 band. This signal is accompanied by a decrease in carbonate content compared to the other samples. Apfelbaum et al. (1992) observed a similar spectral feature in FTIR spectra of synthetic carbonated apatites with low carbonate contents and ascribed it to HPO_4^{2-} ions. Indeed, the P-OH stretching mode of HPO_4^{2-} absorbs in the same spectral region as the CO_3 bending mode as pointed out by Arends and Davidson (1974) who assessed the contribution of HPO_4^{2-} ions to the ν_2 CO_3 signal in sound and pathologic enamel. Wopenka and Pasteris (2005) also reported on the presence of an additional weak Raman peak around 900 cm^{-1} in calcium phosphate phases containing HPO_4^{2-} ions. We thus infer the presence of HPO_4^{2-} ions in samples reacted with phosphate buffered solutions.

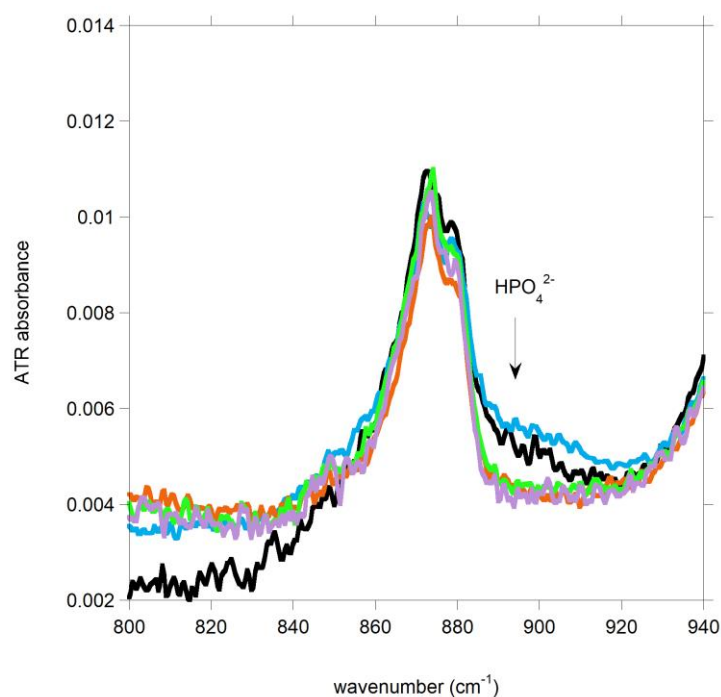


Figure 5.7 ν_2 CO_3 Ge ATR-FTIR bands of bone powder samples altered in different buffers and pH conditions: experiments C (black), D (blue), E (orange), F (green), G (purple). All spectra are normalized based on the ν_4 PO_4 band intensity.

5.4.5 Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of bone samples

The ^{13}C CP MAS NMR spectrum of modern bone displays two components related to A-type (~ 168 ppm) and B-type (~ 170 ppm) carbonate substitutions, a component at ~ 173 - 175 ppm related to the carboxylic acids from amino acids in the organic matrix, as well as numerous signals between 10 and 80 ppm corresponding to organic functions that are enhanced by the Cross-Polarization sequence (Figure 5.8a). The ^{13}C CP MAS NMR spectra of bone powders altered in an organic buffer (experiments E, E') and non-fluorinated alkaline solution (F) display a moderate decrease in the signals ascribed to the organic matrix compared to the ^{13}C CP MAS NMR spectrum of unaltered bone. In contrast, spectra of bone powders altered in a phosphate buffer (experiments D, D') and in fluorinated alkaline solution (F') reveal a significant degradation of the organic matrix, which is almost total in the D' sample. Note that the lower signal to noise ratio in this sample indicates a less effective cross-polarisation between ^1H and ^{13}C nuclei due to a lower amount of protons. Regarding the carbonate environment, all ^{13}C spectra display predominantly B-type signals at ~ 170 ppm, which is consistent with the predominant nature of the B-type substitution in bioapatites.

The ^{19}F MAS NMR spectra of bones altered with fluorine display a main signal at ~ -102 ppm ascribed to F^- ions incorporated in the channel sites of the apatite structure (Figure 5.9). This signal is broader in bone samples (FWHM of 6.1 ppm at 20°C and 3.7-4.1 ppm at 70°C) than in the reference sedimentary carbonated fluorapatite (1.8 ppm). A less intense signal is observed in sedimentary carbonated fluorapatite at -88 ppm and corresponds to the clumped (CO_3^{2-} , F^-) defect substituting for the phosphate group in the structure of carbonated fluorapatite (Yi et al. 2013). Due to the low 14 kHz spinning frequency of the rotor in this experiment, the chemical shift anisotropy distributes an important contribution of the fluorine signal into the spinning side bands. For this reason, two spinning side bands are represented on each side of the isotropic signal to better assess the presence or absence of clumped defect in the altered samples. Bone powders altered with fluorine in alkaline conditions (F', G') display the signal at -88 ppm while samples altered in a phosphate buffer (C', D') do not, which is consistent with the observations made on the $\nu_2 \text{CO}_3$ band of diamond ATR-FTIR spectra. ^{19}F NMR spectra of F' and G' suggest that the proportion of fluoride ions incorporated in the channel sites is far greater than that incorporated in the clumped defect, with the area of the clumped defect signal representing about 1% of the total ^{19}F NMR spectrum area in both samples. Unlike the $\nu_2 \text{CO}_3$ band, no defect signal could be observed in the sample altered in the organic buffer (E'). As observed in Fig 5, the intensity of the clumped defect in the $\nu_2 \text{CO}_3$ diamond ATR-FTIR band is lower for E' than in F' and G'. Furthermore, the broadness and position (-82.2 ppm) of the first spinning side band on the low ppm side may hinder the signal of the clumped defect in E'. The overlap between this spinning side band and a predictably weak clumped defect ^{19}F signal could explain why the latter is not visible in the ^{19}F MAS NMR spectrum of E'.

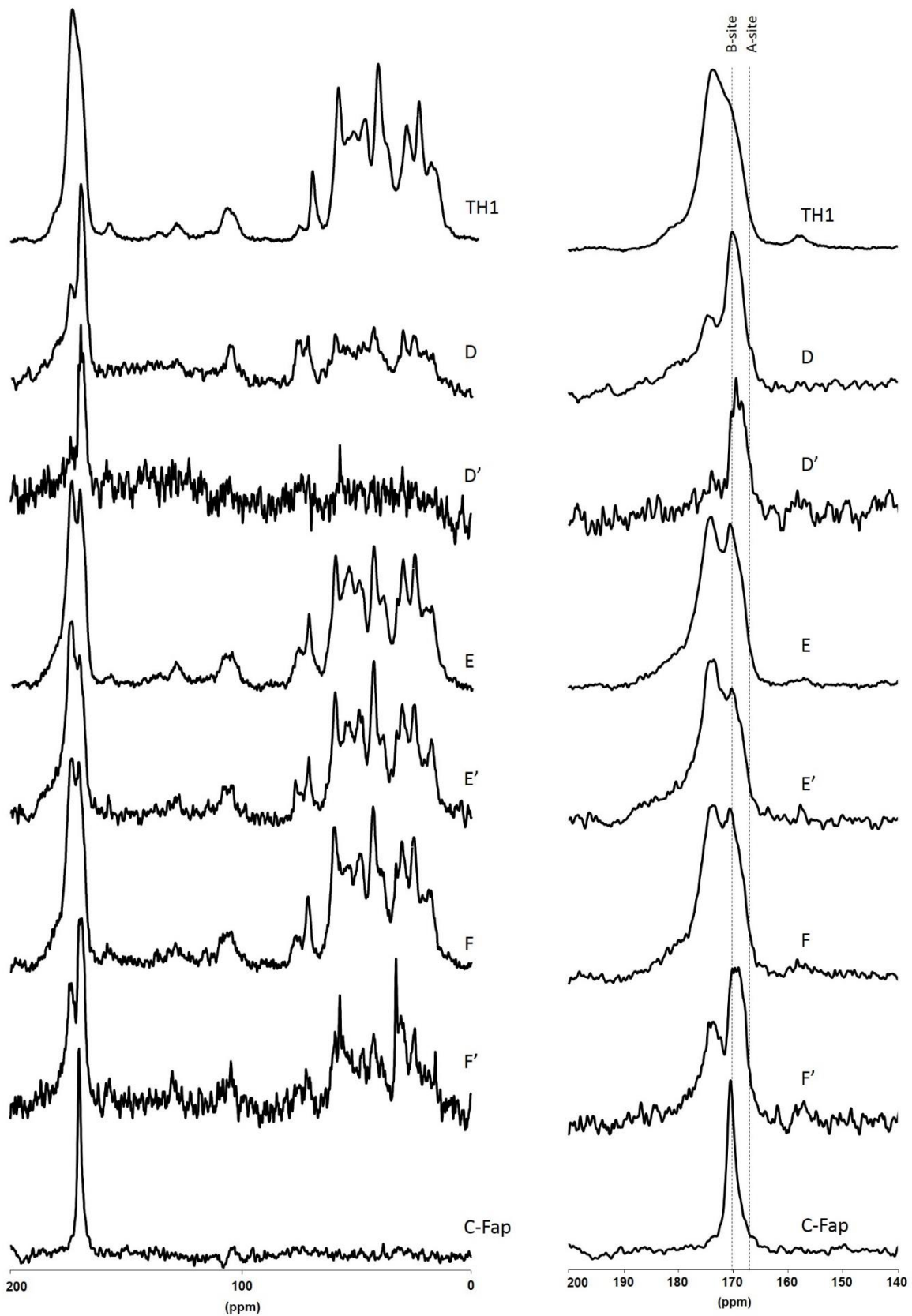


Figure 5.8 ^{13}C CP MAS NMR spectra of the unaltered bone, bones artificially altered with and without fluoride and ^{13}C MAS NMR spectrum of sedimentary carbonated fluorapatite. Vertical dashed lines indicate the ^{13}C NMR positions of A-site and B-site carbonate signals.

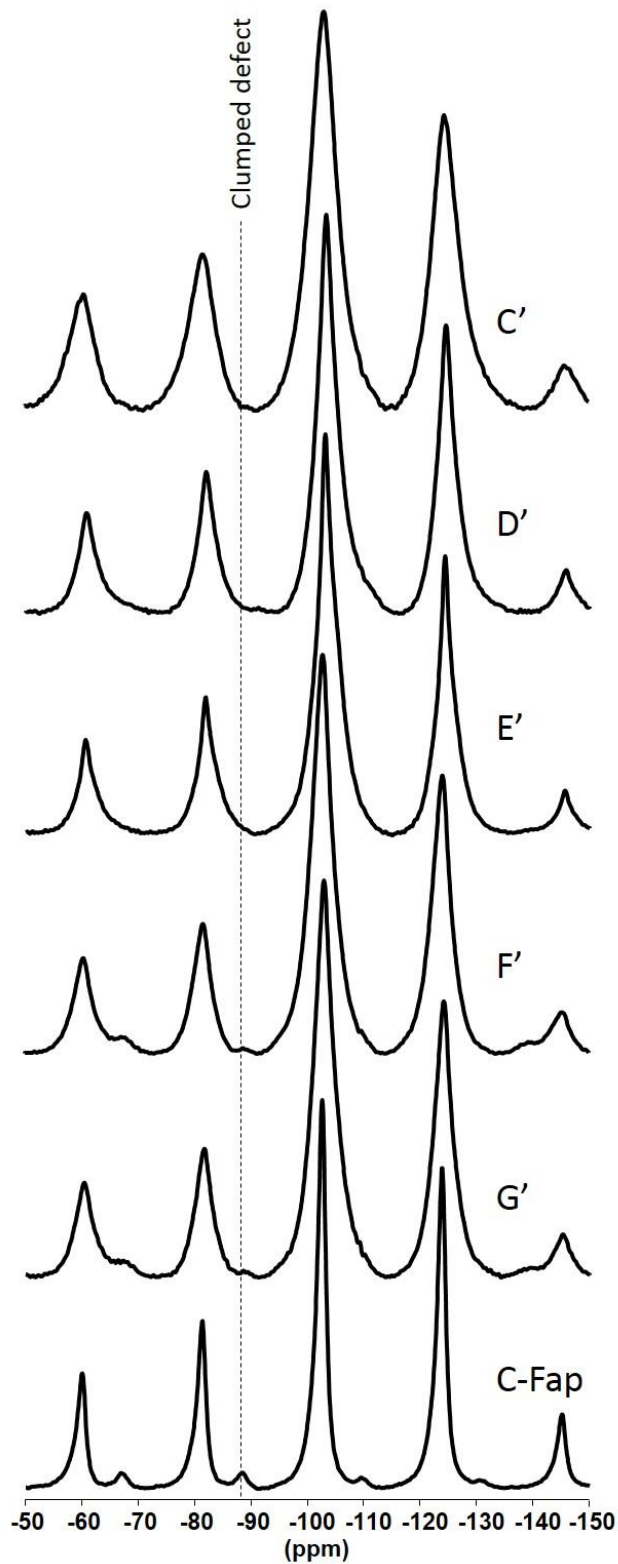


Figure 5.9 ^{19}F MAS NMR spectra of the bone samples altered with fluorine and sedimentary carbonated fluorapatite. Spectra are centred on the isotropic signal of the fluoride ions incorporated in the channels at -102 ppm with two spinning side bands on each side. The ^{19}F position of the clumped defect is indicated by a vertical dashed line.

¹H MAS NMR spectra of altered bones display a signal at 0 ppm corresponding to the hydroxyl groups located in the channel sites, aliphatic signals between 1 and 2 ppm associated with the organic matrix of the bone and a large signal at ~5 ppm related to adsorbed water (Figure 5.10). In the unaltered bone, TH1, channel hydroxyls groups are not observed because of their low concentration (Pasteris et al. 2004, Cho et al. 2003) and significant overlap of their NMR signal with aliphatic signals from the organic matrix. The contribution of aliphatic signals is reduced in artificially altered bone powders, in agreement with the degradation of the organic component observed in their respective ¹³C NMR spectra. All samples altered with fluorine display a weaker OH channel signal, consistent with an occupation of channel sites by OH⁻ and F⁻ ions. A semi quantitative estimation of the fraction of OH⁻ groups replaced by F⁻ ions can be obtained by matching the baseline due to the organic component of the control sample and its counterpart altered with fluorine. The OH signal is then fitted by a Gaussian function for the control sample and a Gaussian of identical width and position is used to fit the OH signal of the sample altered with fluorine. In the artificially fluorinated samples, OH channel signals range from 4 to 12 % of that observed in non-fluorinated samples (Table 5.5). A stoichiometric hydroxyapatite contains about 3.4 wt.% of OH groups but due to a high proportion of vacancies at anionic sites in bones, less than half of OH sites are typically filled with OH groups (Loong et al. 2000), with estimations in the literature ranging from substantial depletion (e.g. 20 % of the expected amount in Cho et al. 2003) to near absence of OH groups (e.g. Pasteris et al. 2004). Even if all channel sites were occupied by OH groups in the control bone samples, percentages of remaining OH groups after fluorination would not exceed 0.4 wt. %. This is consistent with the high fluorine contents measured in the fluorinated samples, ranging between 1.6 and 2.5 wt%. Note that the maximum fluorine amount that can be incorporated in the channel sites of apatite is 3.8 wt%, therefore not all channel sites are occupied by F⁻ nor OH⁻ ions in the fluorinated bone samples investigated here.

Table 5.5 - Parameters of the fit of the OH signal in ¹H NMR spectra of control and fluorinated bones.

Sample	Amplitude (a.u.)	Position (ppm)	Width (ppm)	% _{remainingOHsignal}
C	2.07	-0.034	0.53	
C'	0.23	-0.034	0.53	12
D	4.43	-0.063	0.45	
D'	0.37	-0.063	0.45	8
E	3.49	-0.028	0.32	
E'	0.14	-0.028	0.32	4
F	1.01	-0.018	0.36	
F'	0.09	-0.018	0.36	9

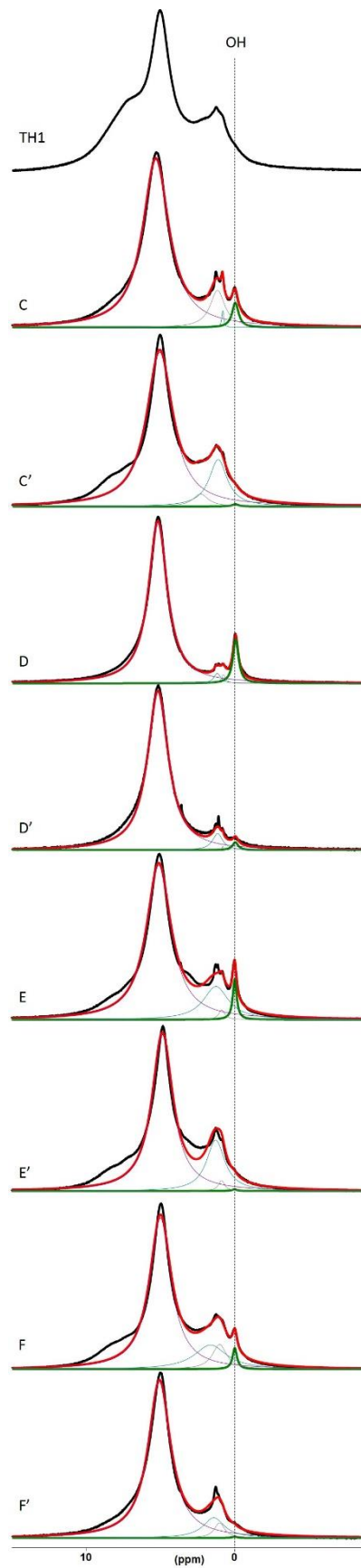


Figure 5.10 - ^1H MAS NMR spectra of the bone samples altered with and without fluoride. The position of the OH signal is indicated by a vertical dashed line.

Table 5.6 - Parameters of fits of $\nu_1\text{PO}_4\text{Ge}$ ATR-FTIR bands

Sample	“TH1-like” Gaussian signal			Secondary Lorentzian contribution		
	ω (cm ⁻¹)	FWHM	Area (%)	ω (cm ⁻¹)	FWHM	Area (%)
TH1	960.6	14.778	100	-	-	-
C	960.6	14.578	80.9 ± 3.9	962.7	7.901	19.1 ± 2.4
C'	960.6	14.578	70.6 ± 3.1	966.1	8.000	29.4 ± 2.5
D	960.6	14.578	70.5 ± 8.5	963.5	10.553	29.5 ± 7.2
D'	960.6	14.578	43.2 ± 1.2	966.1	9.530	56.8 ± 2.0
E	960.6	14.578	60.9 ± 6.3	962.9	7.025	39.1 ± 5.6
E'	960.6	14.578	41.4 ± 1.9	966.1	7.971	58.6 ± 2.9
F	960.6	14.578	47.3 ± 7.5	963.4	8.566	52.7 ± 9.0
F'	960.6	14.578	43.1 ± 2.7	966.1	7.585	56.9 ± 4.1
G	960.6	14.578	43.3 ± 4.4	963.4	11.748	56.7 ± 6.1
G'	960.6	14.578	38.5 ± 3.0	966.1	7.603	61.5 ± 4.4
C-FAp	-	-	-	966.1	5.357	100

5.5. Discussion

5.5.1 Evidence of secondary apatite formation

All reacted samples display significant changes of the chemical, isotopic and structural properties of apatite with respect to the original bone. In line with previous observation by Pasteris and Ding (2009), these changes can be interpreted as resulting from the partial dissolution of primary biogenic material and formation of a secondary apatite. In fact, a systematic occurrence of fluoride ions in apatite channel sites of samples reacted with fluorinated solutions is attested by their ¹⁹F NMR spectra and can be inferred from the upward shift in ATR-FTIR and Raman $\nu_1\text{PO}_4$ band positions and correlated decrease of *a* cell-parameter (Tables 5.3 and 5.4; Figure 5.S6). Based on the study of Brennan (1994), solid-state diffusion of fluorine is not expected to be an efficient process in the range of alteration conditions investigated here, e.g. 3 weeks at 20-70°C, even though the defective nature of biologic apatite might facilitate chemical diffusion with respect to well-crystallised samples. Several observations also reveal significant changes pointing to the formation of a secondary phase. These changes include the observation of HPO_4^{2-} groups and modification of ¹⁸O_{phosphate} composition in the samples reacted with phosphate buffered solutions, as well as the formation of the (CO_3^{2-} , F⁻) defect in some of the reacted samples. However, the lack of extensive narrowing of $\nu_1\text{PO}_4$ bands and ¹⁹F NMR signals in altered bone samples also suggests that dissolution and reprecipitation of a new phase is an incomplete process.

Based on these considerations, the $\nu_1\text{PO}_4\text{Ge}$ ATR-FTIR bands were fitted using a two-component model. One of the component is a Gaussian function, whose position and width were kept fixed to that of the unaltered bone TH1. The second component is described by a Lorentzian function whose position was kept fixed to that of the reference carbonated fluorapatite sample in fluorinated samples and was let free in non-fluorinated samples (Figure 5.3). It is expected that the relative proportion of these two spectroscopic contributions matches

the fraction of PO₄ groups occurring in the primary and secondary apatite. Thus, it should reflect the relative molar proportions of both phases. In fluorinated samples, percentages of the secondary phase are about 60 % in samples altered at 70°C (D', E', F', G') and 30% in the sample altered at 20°C. In non-fluorinated samples, the second component is observed at 962.7-963.5 cm⁻¹ and accounts for 19 to 57 % of the total ν₁ PO₄ Ge ATR band. Consistently, the frequency of the ν₁ PO₄ band reported as a function of the fraction of secondary apatite broadly defines two distinct linear trends depending on the presence or absence of fluorine (Figure 5.11). For fluorinated samples, the linear trend points to the frequency of the reference carbonated fluorapatite whereas for the other samples it points to a frequency slightly above that of hydroxyapatite (962.9 cm⁻¹, from Balan et al. 2011 and Aufort et al. 2016). For fluorinated samples, the F concentration reported as a function of secondary apatite fraction also supports a mixing model involving the starting material and newly formed fluorapatite displaying an almost full-occupancy of the apatite channel sites by fluorine. Almost full channel occupancy in the secondary phase is also consistent with the corresponding very weak OH signal observed in the ¹H NMR spectra.

This set of observations supports the precipitation of a secondary phase induced by a partial dissolution of the original bioapatite in all reacted bone samples. It is noteworthy that the secondary apatite can consist in fluorapatite or hydroxyapatite, depending on the composition of the altering aqueous solution. Accordingly, fluorine does not appear to be a key element driving the transformation of bone apatite. However, fluorinated samples tend to display a larger proportion of secondary apatite, suggesting a higher rate of transformation. A higher precipitation rate of fluorapatite is expected due to its lower solubility and corresponding larger chemical affinity of the precipitation reaction compared to that of hydroxyapatite. Another feature emerging from the present series of experiments is an apparent maximum advancement of the transformation reaction, with a fraction of secondary apatite limited at ~60%. This suggests that the formation of secondary apatite at the surface of initial grains could have a protecting role against their further transformation. In contrast, the degradation degree of the collagen matrix does not seem to affect the advancement of the apatite transformation.

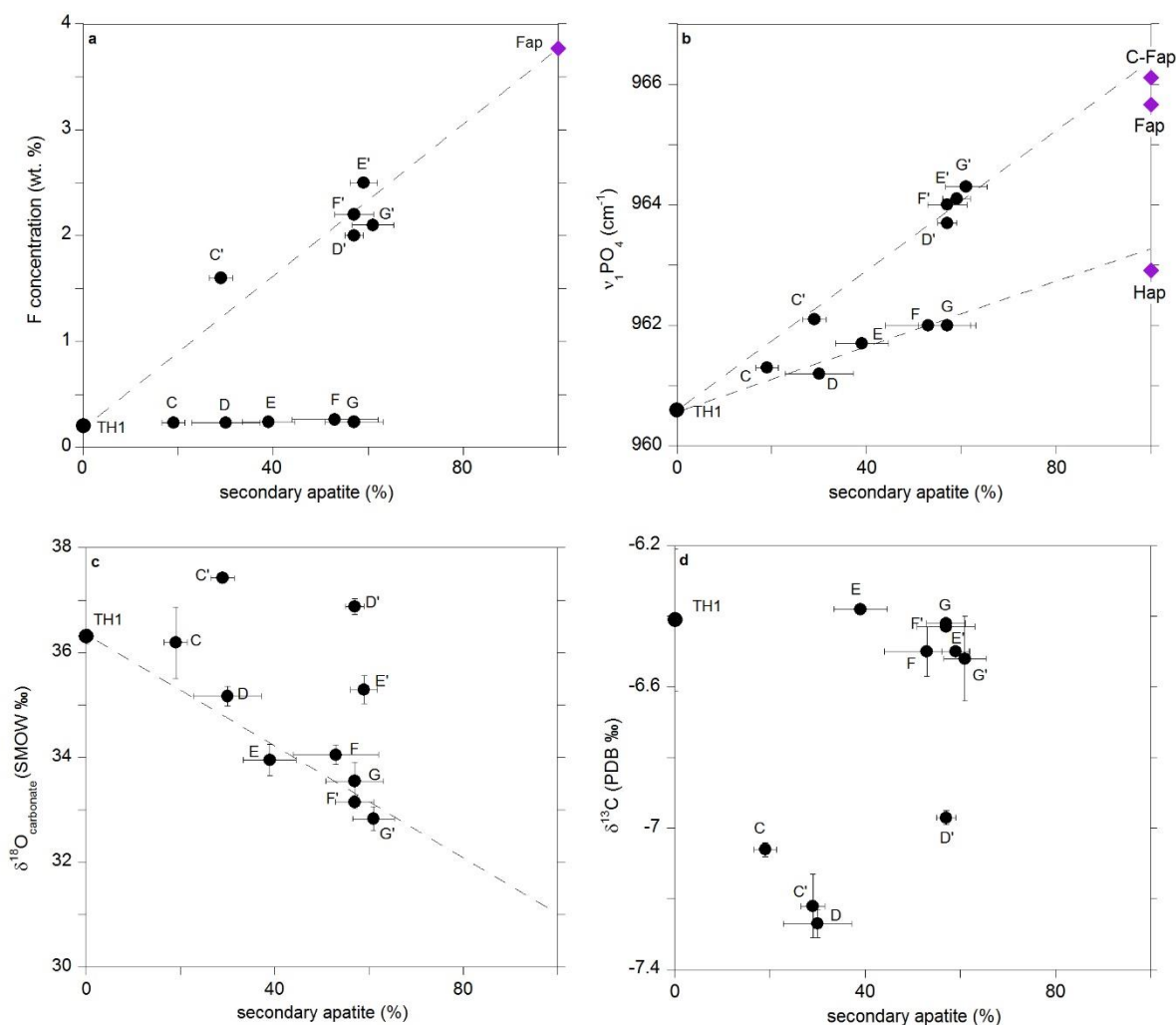


Figure 5.11 Evolution of (a) fluoride content, (b) $\nu_1 \text{PO}_4$ Ge ATR-FTIR band frequency, (c) $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonate}}$ and (d) $\delta^{13}\text{C}$ as a function of the percentage of secondary apatite. Dashed lines are guide for the eye.

5.5.2 Carbonate incorporation in secondary apatite

The oxygen and carbon isotopic compositions of structural carbonate groups from fossil apatites are important proxies for paleo-environmental reconstructions. The behaviour of carbonate groups during aqueous alteration of teeth and bones thus deserves a peculiar attention. In the present study, the overall decrease in the $\nu_2\text{CO}_3$ band intensity of reacted samples, suggests that the secondary apatite phase is impoverished in carbonate compared to the initial material. However, several observations also indicate that it is not carbonate-free.

In the fluorinated samples, the $(\text{CO}_3^{2-}, \text{F}^-)$ defect is readily identified from its peculiar vibrational and NMR spectroscopic properties. Such atomic-scale modification of the environment of carbonate groups substituted for phosphate groups is a strong indication of their incorporation during the precipitation of the secondary apatite from the solution. The absence of $(\text{CO}_3^{2-}, \text{F}^-)$ defect in samples reacted in fluorinated and phosphate buffered solutions is

consistent with their location at the apatite B-site because a high concentration of phosphate in solution should inhibit carbonate incorporation at the B-site.

In the absence of (CO_3^{2-} , F) defect, the $\nu_2\text{CO}_3$ band reveals little modification of the carbonate environment or A-type to B-type ratio, which could suggest that only structural carbonate groups initially present in the bone apatite are preserved in these reacted samples. However, the oxygen and carbon isotopic compositions of structural carbonates contradict this interpretation. The lower $\delta^{13}\text{C}$ values in bones altered in a phosphate buffer (C, C', D, D') could result from incorporation of organic carbon, characterised by lower $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios (typically $\sim -20\%$, Lee-Thorp et al. 1989, Koch 1998) than apatite structural carbonate and originating from the degradation of the collagen matrix. This is consistent with the significant loss of the signal corresponding to carboxylic functions observed in ^{13}C NMR for D and D' samples. The oxygen isotopic composition also reveals system opening. Samples tend to display a broad negative correlation as a function of secondary apatite fraction. Contrary to phosphate, oxygen exchange between carbonate in solution and water molecules occurs rapidly (Wang and Cerling 1994, Lécuyer et al. 1999; Geisler et al. 2012). Consequently, the variation of the $\delta^{18}\text{O}_{\text{carbonate}}$ values combined with almost constant $\delta^{13}\text{C}$ could reflect a partial re-incorporation of carbonate during the transformation of apatite via dissolution and reprecipitation from solution. It is noteworthy that the carbon and oxygen isotope composition of structural carbonates in samples altered in alkaline conditions display similar variations irrespective of the presence or absence of fluorine, suggesting quantitatively similar re-incorporation of carbonate groups.

5.5.3 Comparison of infrared and Raman spectroscopy in the determination of apatite structural order

Structural changes of fossil apatite are often characterized by crystallinity indices obtained from infrared spectroscopy, Raman spectroscopy or X-ray diffraction. Although usually displaying similar trends, these indices are often poorly correlated because they differ in physical nature (Rogers and Daniels 2002, Pucéat et al. 2004, Trueman 2008, Thompson et al. 2009). In the present study, a peculiar attention was given to the use of $\nu_1 \text{PO}_4$ Ge ATR-FTIR band to infer the degree of transformation of reacted samples. In previous studies (e.g. Pasteris et al. 2009, Pucéat et al. 2004), the $\nu_1 \text{PO}_4$ bands observed in Raman spectroscopy were also used to infer the structural state of experimentally or naturally altered biogenic apatite samples. It is thus relevant to compare the information obtained from IR and Raman spectroscopy using closely related vibrational modes. We note however that in crystalline apatite the intense $\nu_1 \text{PO}_4$ signal observed in the Raman spectrum is related to a A irreducible representation and differs from the vibrational mode belonging to a E irreducible representation and corresponding to the weak $\nu_1 \text{PO}_4$ signal of the IR spectrum (Leroy et al. 2000; Ulian and Valdre 2018). Both types of vibrational modes however display very close frequencies. In the present study, the position of the $\nu_1 \text{PO}_4$ Ge ATR-FTIR band correlates well with that of the

Raman ν_1 PO₄ (Figure 5.12a), both spectroscopies showing the same extent of frequency shift from non-fluorinated to fluorinated bone samples. However, Raman and Ge ATR-FTIR FWHM do not correlate well (Figure 5.12b). Indeed, the ν_1 PO₄ Raman peaks are narrower and more symmetric than their Ge ATR-FTIR counterparts, the Raman asymmetry parameters being about half that of ATR-FTIR peaks (Figure 5.12c). This difference could be related to the observation that Raman intensity is more strongly affected by a lowering of the crystal symmetry than the infrared one (Ulian and Valdre 2018). As a consequence, the smaller carbonate content of secondary apatite might lead to an increase in its Raman scattering efficiency, leading to an overexpression of its contribution in the Raman spectra. Correspondingly, the ν_1 PO₄ Raman peaks appear as narrower and more symmetric than their infrared counterparts do. These observations illustrate how the physical processes involved in related but different probing techniques can affect the determination of sample structural order.

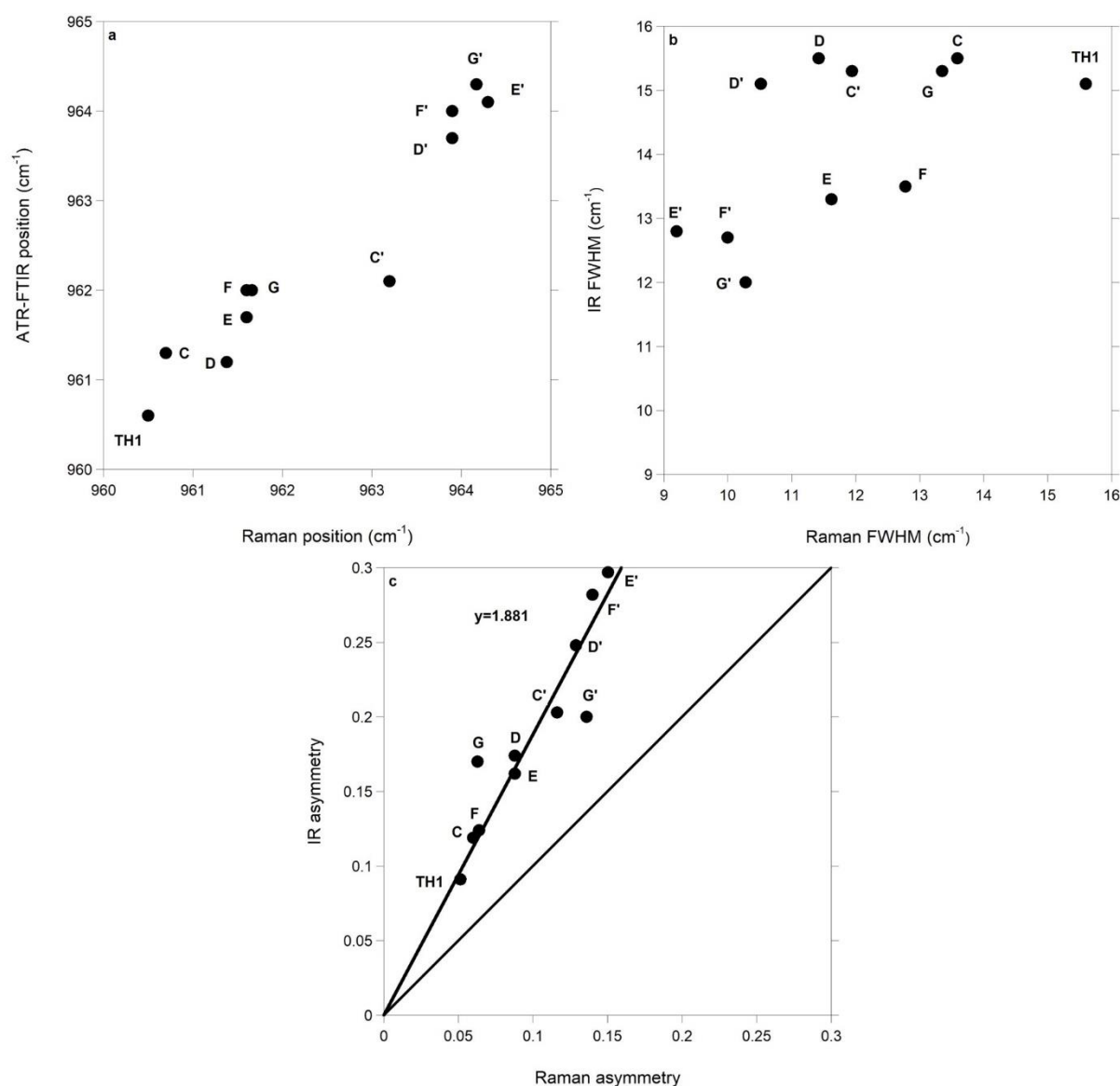


Figure 5.12 Comparison of ATR-FTIR Ge and Raman ν_1 PO₄ band position (a), FWHM (b) and asymmetry parameters (c).

5.5.4 Implications for fossilization processes

This work has implications regarding bone diagenetic processes and stable isotopes analysis of fossil bioapatite. Our results are consistent with the observations that the relative importance of dissolution/recrystallization processes during diagenesis, not only depends on the bone microstructure but also on the physical–chemical conditions prevailing in the fossilization environments (Trueman et al. 2004, Zazzo et al. 2004b). As far as paleoenvironmental reconstructions based on stable isotope analysis of bioapatites are concerned, the nature of ionic species in percolating fluids in contact with fossils could be key parameters driving the preservation or alteration of isotopic compositions. Importantly, dissolution-recrystallization of bone can occur in a fluorine-free environment to form secondary carbonated hydroxyapatite. This suggests that other factors drive the transformation of bone, such as the reactivity of a disordered surface layer on bone crystallites (e.g. Wang et al. 2013) and a high carbonate content (Hankermeyer 2002). The fact that alteration of the original bioapatite is possible without a significant variation of the A-type to B-type carbonate ratio points to a limit of single-analytical approaches in assessing bone diagenesis. In addition, it does not exclude possible reincorporation of carbonate into the structure, which makes the assessment of isotopic compositions preservation more complex. This could explain why several studies reported that indicators of diagenesis indicated little about isotope alteration (e.g. Trueman et al. 2008).

The dissolution-recrystallization process of bone is incomplete with a maximum fraction of secondary apatite limited to ~60 %. It is thus suggested that partial transformation of bone occurs even at a nanometric scale with partial dissolution-recrystallisation of individual grains (Figure 5.13). However, it is noteworthy that the changes observed between the primary and secondary phases are not fully compatible with the premise of Ostwald ripening process even though this mechanism has been proposed to account for dissolution of smaller crystallites and formation of larger crystals (Ayliffe et al. 1994). The formation of a secondary phase and the lack of increase in MCD size in altered bones observed in this study points primarily to a transformation rather than a ripening process.

Compared to modern unaltered bone, artificially fluorinated bone samples in organic and alkaline conditions show similar transformations as fossils: degradation of organic content, increase in crystallinity (e.g. increase in IRSF values), formation of carbonated fluorapatite (i.e. clumped defect at B-site). In fossil enamel from Late Tertiary continental environments, such a transformation of bioapatite to carbonated fluorapatite has been shown to occur via a dissolution-recrystallisation process, with extensive alteration of the carbonate environment (Yi et al. 2014b). The relative preservation of the carbonate environment in altered bone powders is consistent with a subtler transformation mechanism, compatible with a partial dissolution-recrystallisation process at nanometer-size scale.

Finally, this work illustrates that bone diagenesis cannot be summed up using only one crystallinity parameter and underlines the need to use multiple analytical approaches to depict a more complete picture of the extent of diagenetic alteration in bone. Furthermore, this shows that the combination of site-specific isotopic compositions measurements with atomic scale-probing spectroscopies is an effective way of deciphering dissolution-recrystallization pathways in bone.

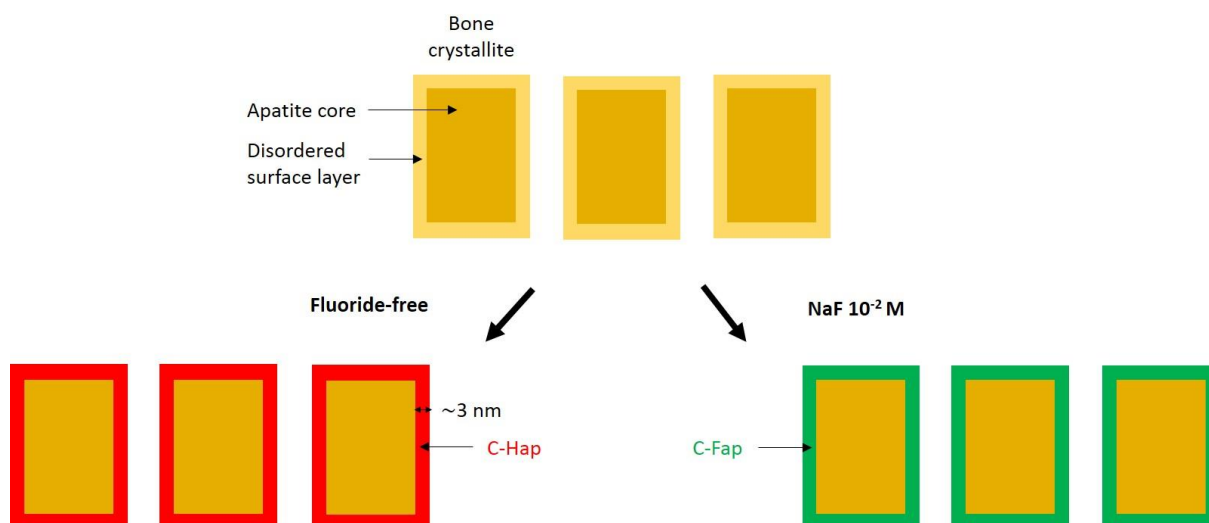


Figure 5.13 Schematic representation of bone crystallites before and after dissolution-recrystallisation in the presence or absence of fluoride in the alteration solution. For a $4 \times 20 \times 30 \text{ nm}^3$ crystallite size, a maximum fraction of secondary carbonated apatite of 60 % corresponds to a $\sim 3 \text{ nm}$ thick layer. Partial dissolution-recrystallization of bone occurs at the nanometre scale on each individual grain.

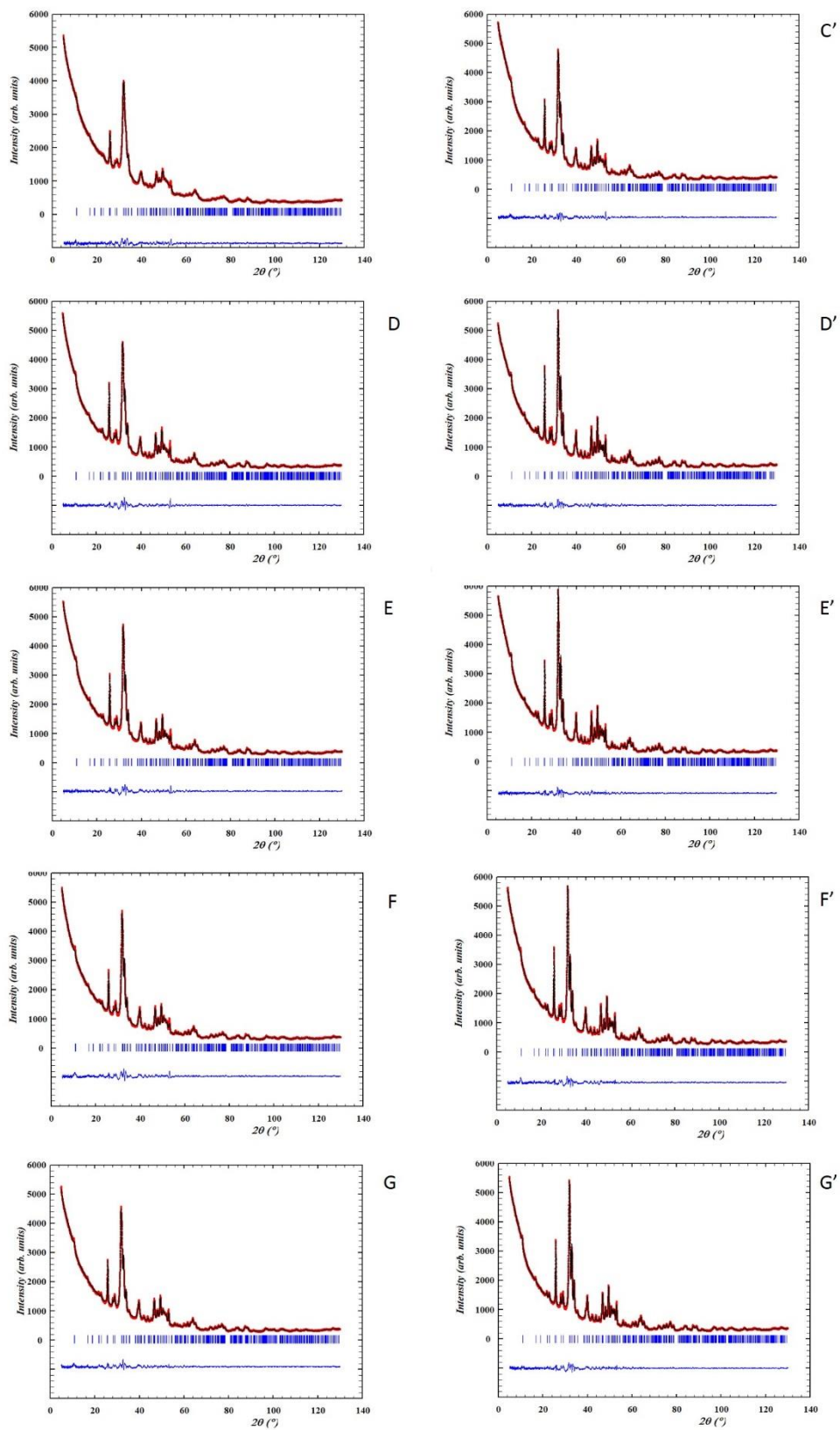
Acknowledgements

This work was supported by French state funds within the framework of the Cluster of Excellence MATISSE led by Sorbonne Universités and within the INTERRVIE action of the 2017 CNRS-INSU TelluS program.

Supplementary information

Table 5.S1 - Anisotropic size parameters (spherical harmonic coefficients) for Laue class **6/m**

Sample	Y00	Y20	Y40	Y60	Y66+	Y66-
TH1	6.01 (8)	-4,52 (9)	-0.67 (13)	0.46 (14)	Not refined (NR)	NR
C'	6.85 (5)	-2,71 (5)	0.38 (7)	-1.27 (7)	NR	NR
D	6.72 (4)	-3.14 (5)	0.07 (7)	-1.14 (7)	NR	NR
D'	5.21 (3)	-2.60 (3)	0.72 (5)	-0.99 (4)	NR	NR
E	6.94 (2)	-2.47 (5)	-0.10 (7)	-1.23 (7)	NR	NR
E'	4.85 (3)	-2.90 (3)	0.67 (5)	-0.80 (4)	NR	NR
F	6.29 (5)	-3.24 (5)	0.20 (7)	-0.99 (7)	NR	NR
F'	5.34 (3)	-2.68 (4)	0.70 (5)	-1.10 (5)	NR	NR
G	7.11 (5)	-4.13 (5)	-0.11 (7)	-0.83(7)	NR	NR
G'	5.15 (3)	-2.89 (4)	0.56 (5)	-0.90 (5)	NR	NR



11

Figure 5.S1 - XRD patterns and LeBail refinements of the unaltered and altered bone powder diffraction patterns. Red crosses are experimental points, the black line is the calculated pattern, blue vertical tick marks refer to Bragg reflections and the blue line is the difference (observed-calculated) pattern.

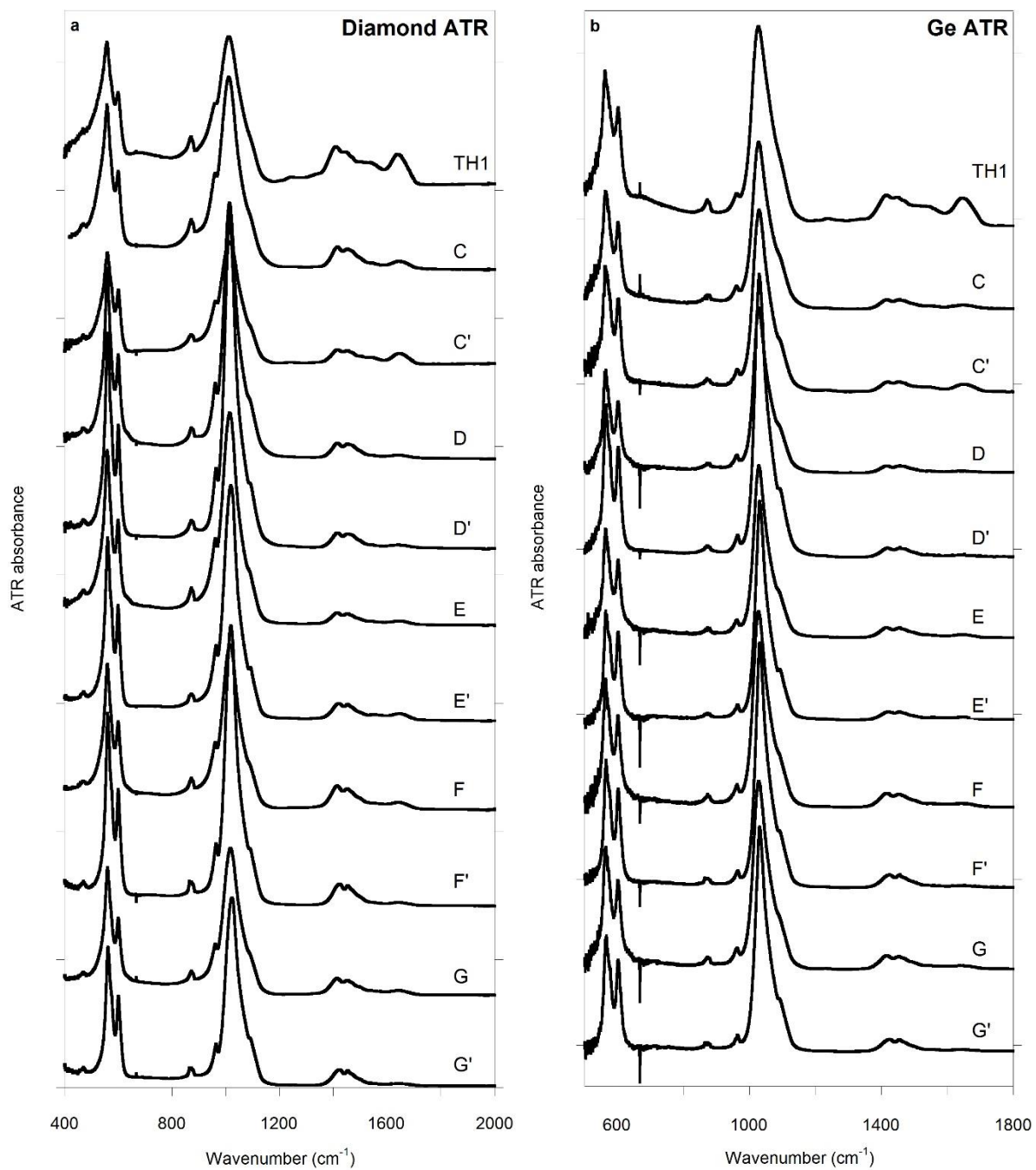


Figure 5.S2 - Diamond (a) and germanium (b) ATR-FTIR spectra of unaltered and altered bone powders.

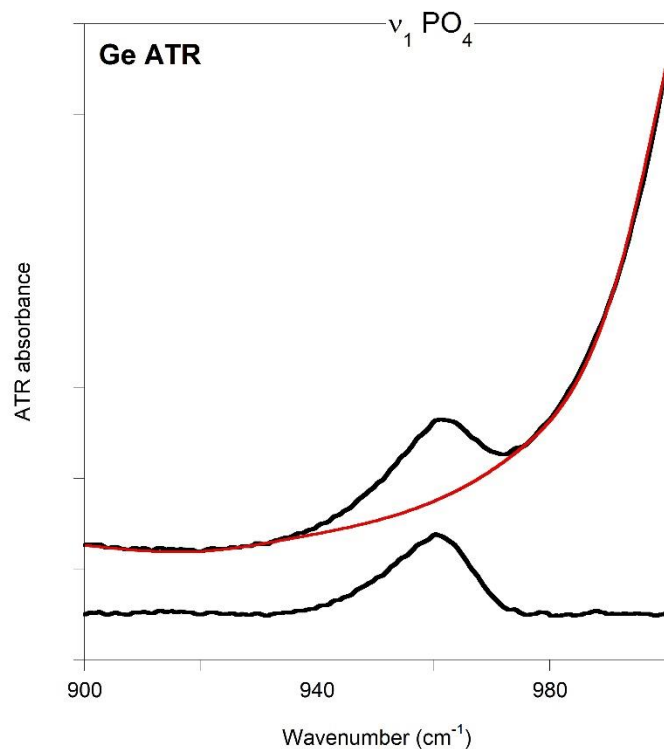


Figure 5.S3 - Baseline subtraction of the $\nu_1 \text{PO}_4$ Ge ATR-FTIR band (sample C). The band displays a significant asymmetric shape with a tail towards lower frequencies, retained after baseline removal.

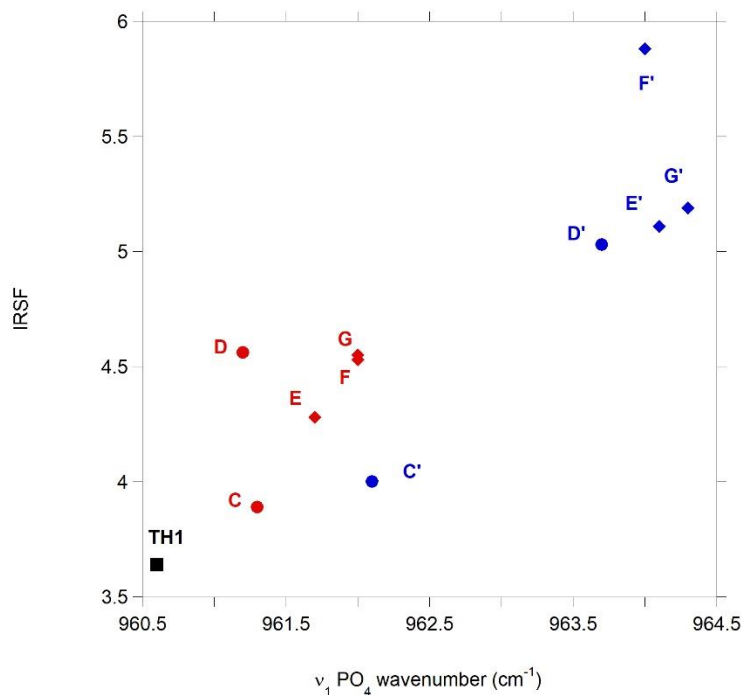


Figure 5.S4 - Infrared splitting factor (IRSF) calculated from the $\nu_4 \text{PO}_4$ Ge ATR-FTIR band intensity according to Weiner and Bar-Yosef (1990) as a function of the $\nu_1 \text{PO}_4$ Ge ATR-FTIR band position.

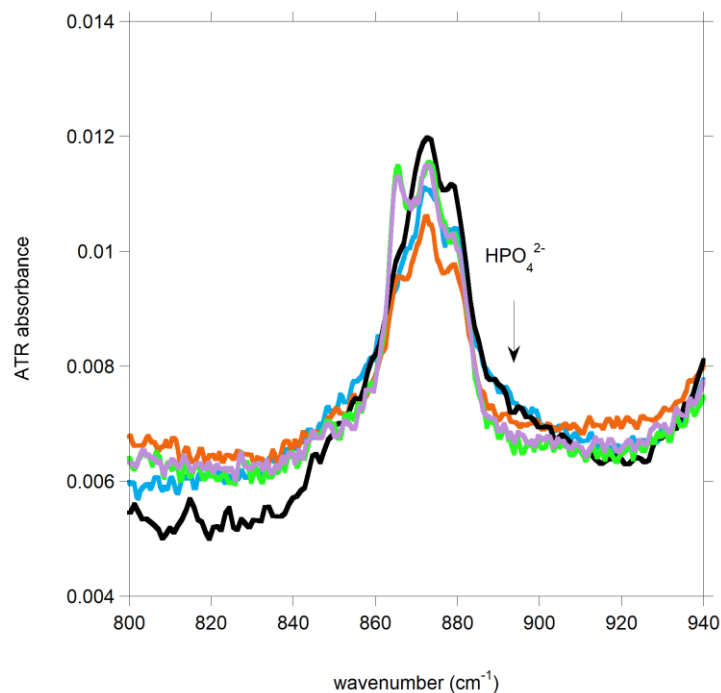


Figure 5.S5 - ν_2 CO₃ Ge ATR-FTIR bands of bone powder samples fluorinated in different buffers and pH conditions: experiments C' (black), D' (blue), E' (orange), F' (green), G' (purple). All spectra are normalized based on the ν_4 PO₄ band intensity.

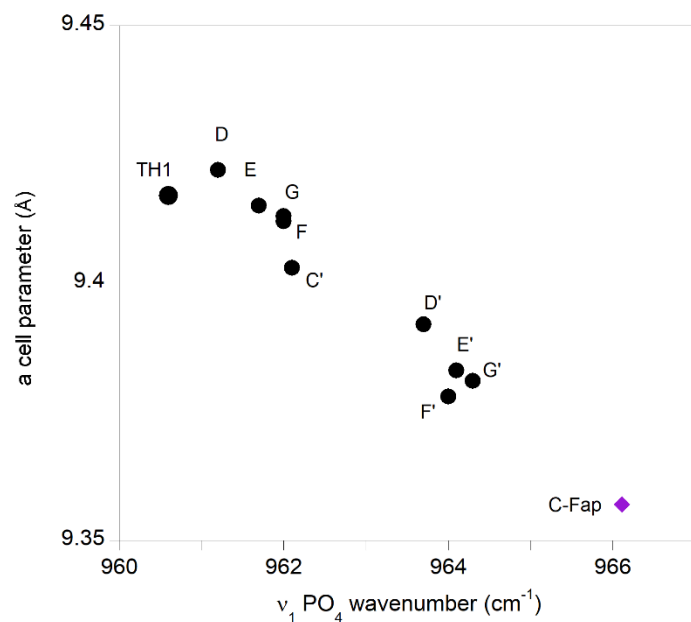


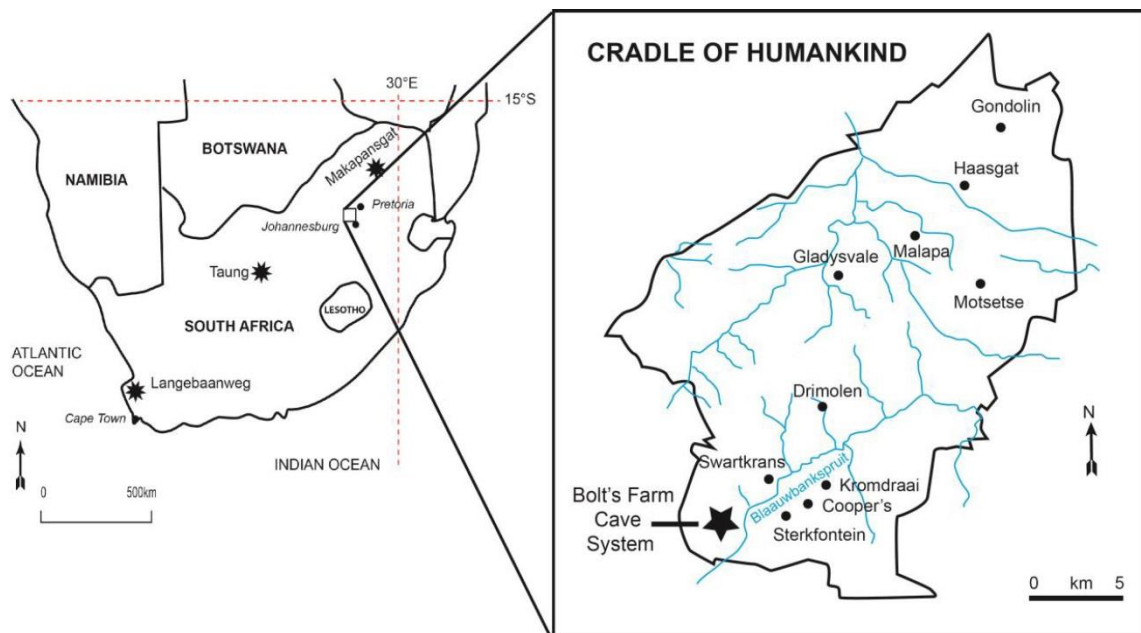
Figure 5.S6 - Evolution of *a* cell parameter as a function of ν_1 PO₄ Ge ATR-FTIR band frequency.

Chapitre 6 : Etude de la transformation d'os fossiles du Cradle of Humankind en Afrique du Sud

Ce chapitre est consacré à l'étude de fossiles d'os de mammifères provenant de la région du « Berceau de l'Humanité » ou Cradle of Humankind (CoH) en anglais, classée au Patrimoine mondial par l'UNESCO. Après une description générale du contexte géologique et de l'intérêt paléontologique du CoH, puis plus précise du site de l'étude (sections 6.1 et 6.2), les résultats concernant la transformation de ces fossiles obtenus à l'aide des techniques utilisées au chapitre précédent sont exposés à travers un manuscrit d'article en préparation. Ceux-ci sont mis en parallèle d'une part avec des fossiles provenant d'autres contextes de fossilisation, notamment de la Vallée du Rift Grégory (collines Tugen, Kenya), afin de dégager le rôle de celui-ci sur la préservation des enregistrements fossiles, et d'autre part avec les résultats des altérations expérimentales du Chapitre 5 afin de discuter des mécanismes de transformations diagénétiques.

6.1. Contexte et intérêt paléontologique du Cradle of Humankind

Le « Berceau de l'Humanité » ou Cradle of Humankind (CoH) en anglais est un ensemble de sites à Hominidés fossiles en Afrique du Sud, classés au Patrimoine mondial par l'UNESCO. Il s'agit en effet d'une zone, située dans la province du Gauteng entre Johannesburg et Pretoria, où ont été découverts de très nombreux fossiles d'hominidés dans plus d'une dizaine de sites couvrant le Plio-Pleistocène (Figure 6.1).



D'un point de vue géologique, les gisements correspondent à des remplissages sédimentaires successifs de réseaux karstiques (grottes) creusés dans un calcaire dolomitique très ancien, de plus de 2 milliards d'années (Gommery et al. 2016). Ces accumulations de sédiments détritiques issus de la surface forment avec le temps des dépôts indurés (brèches) par calcification. Le plafond des grottes est ensuite progressivement érodé, exposant finalement les brèches fossilifères à la surface. Les remplissages à l'intérieur de ces grottes deviennent alors de précieux enregistrements de l'histoire de l'extérieur (Figure 6.2).

Vers la fin du XIX^{ème} siècle, les sites karstiques du CoH furent d'abord un lieu d'extraction de calcite pour l'exploitation aurifère des mines d'or de Kromdraai et Krugersdrop, nécessitant de la chaux. Des carrières furent ouvertes, les mineurs rejetant les blocs de brèches, fossilifères ou non, qui leur étaient inutiles, sur des crassiers proches des remplissages. A partir des années 30, les paléontologues s'y succèdent alors à la recherche de fossiles d'Hominidés pouvant éclairer la complexe histoire de notre lignée. Parmi les grottes les plus connues figurent celles de Sterkfontein, où fut découvert en 1947 par R. Broom un crâne d'*Australopithecus africanus* surnommé par la suite Mrs Ples, venant corroborer la présence d'australopithèques en Afrique australe proposée par R. Dart lors de sa découverte de l'enfant de Taung en 1925. Le site de Swartkrans a quant à lui livré des fossiles d'*Homo ergaster*. Plus récemment, c'est la découverte en 2015 de plus de 1500 fossiles attribués à une nouvelle espèce, *Homo naledi*, dans la grotte de Rising Star (Berger et al., 2015) qui continue à faire du Cradle of Humankind un lieu incontournable de la paléoanthropologie. Si les théories actuelles placent plutôt le véritable berceau de l'Humanité en Afrique de l'Est, les découvertes faites en Afrique australe, notamment celle d'*Australopithecus sediba* dans la grotte de Malapa en 2010 (Berger et al., 2010) qui présente des traits propres aux australopithèques mais aussi au genre Homo, contribuent à relancer le débat sur l'origine du genre humain. L'environnement et le climat étant des acteurs essentiels de l'évolution et de la migration des hominidés, les reconstitutions paléoenvironnementales et paléoclimatiques portant sur le CoH, effectuées notamment à partir des analyses isotopiques, sont donc d'une grande importance.

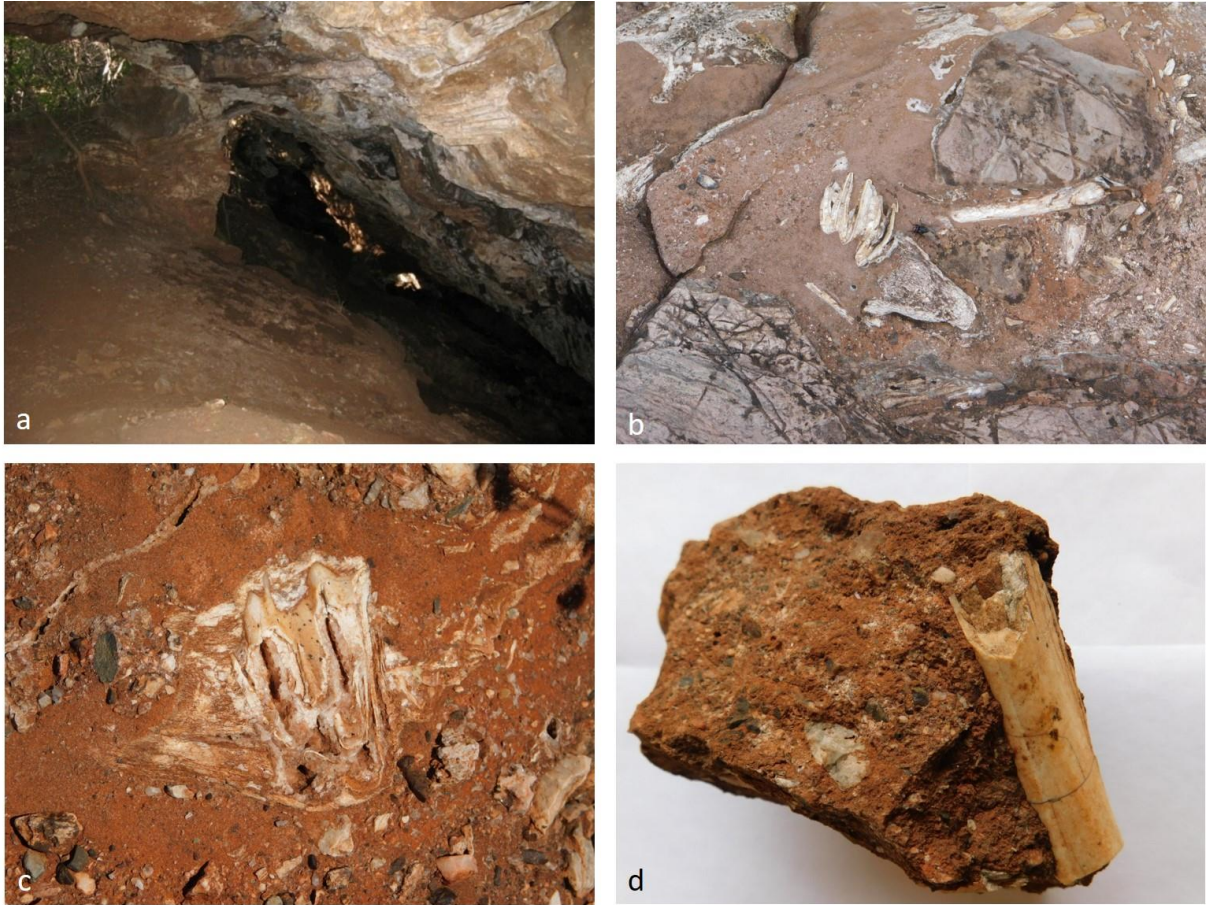


Figure 6.2 - Karst de l'aire fossilifère de Bolt's Farm (a), os et dents fossiles dans la brèche *in situ* de Milo A (b) et Aves cave (c) à Bolt's Farm et fragment d'os fossile dans un bloc de brèche fossilifère d'Aves Cave (d)

6.2 Contexte du site de l'étude : l'aire fossilifère de Bolt's Farm

Parmi les différents sites du CoH, l'aire fossilifère de Bolt's Farm ou Bolt's Farm Cave system (BFCS) se situe au sud-ouest du CoH à 2 km du célèbre site de Sterkfontein (Figure 6.1).



Figure 6.3 - Vue globale de l'aire de Bolt's Farm (Gommery et al. 2016) et crâne de *Dinofelis barlowi* provenant du pit 23 à BFCS (collection du Ditsong National Museum of Natural History, Pretoria, Afrique du Sud).

A la différence de la plupart des sites du CoH, Bolt's Farm ne correspond pas à un site unique caractérisé par un âge unique mais à une aire fossilifère comprenant de nombreux « pits » ou loci (Figure 6.4) dont l'âge des différents dépôts s'échelonne entre 4.5 et 0.9 millions d'années (Sénégal et Avery, 1998 ; Thackeray et al. 2008). Il s'agit de la plus longue séquence chronologique, bien que discontinue, de tout le CoH, ce qui est exceptionnel pour l'Afrique australe, contrairement à l'Afrique de l'Est où il existe des formations géologiques avec des séquences de plusieurs millions d'années (par exemple dans les Tugen Hills où les séries sédimentaires remontent à 15 Ma). Par ailleurs l'un des locus de Bolt's Farm, Waypoint 160, a livré à ce jour les plus anciens restes de primates du CoH, datés par biochronologie entre 4.5 et 4 millions d'années (Sénégal et Avery, 1998 ; Sénégal et al., 2002 ; Gommery et al. 2016). Par ailleurs, Bolt's Farm présente une faune très diverse, depuis les primates non-humains tels que *Parapapio* et *Cercopithecoides* (Gommery et al., 2014a,b) jusqu'aux carnivores tels que les grands chats fossiles comme *Dinofelis* (Figure 6.3). Bien qu'à ce jour l'aire fossilifère de Bolt's

Farm n'ait pas livré de fossiles d'hominidés, toutes ses caractéristiques en font un site d'étude d'intérêt, permettant la reconstitution des paléoenvironnements sur une période de plus de 3 millions d'années, au cours de laquelle évoluaient non seulement les espèces retrouvées à Bolt's Farm mais également les hominidés des autres sites du CoH.

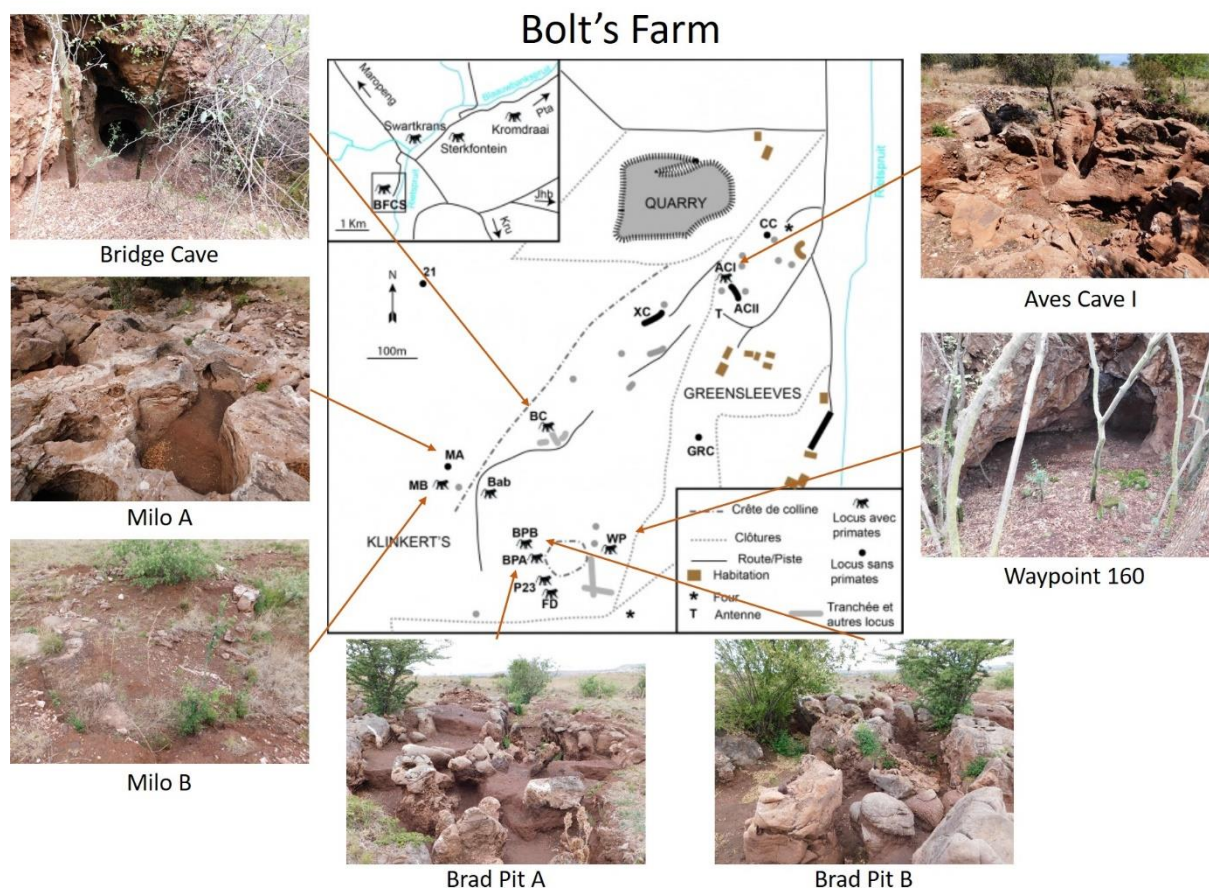


Figure 6.4 - Carte de l'aire fossilifère de Bolt's Farm précisant la situation des différents loci (Gommery et al. 2016) et photos des différents loci prises en octobre 2016 (par J. Aufort)

Concernant l'âge des différents loci, les datations par biochronologie, reposant principalement sur la microfaune (rongeurs), placent le locus de Waypoint 160 entre 4, 5 et 4 millions d'années. Viennent ensuite les loci Brad Pit A et Brad Pit B dont les dépôts ayant livré des primates non-humains seraient postérieurs à Waypoint mais antérieurs à tous les autres, entre 4 et 3,5 millions d'années (Gommery et al., 2012). Des dépôts plus récents y sont toutefois présents, notamment à Brad Pit A où de la brèche a livré des suidés (cochons) indiquant un âge entre 2 et 1,5 Ma. La présence d'une espèce spécifique de suidés sur le locus d'Aves Cave I suggère quant à elle un âge compris entre 3 et 2,5 millions d'années (Gommery et al. 2014). Les éléments de biochronologie préliminaires à Milo A et Milo B, reposant sur des restes de suidés et d'équidés, semblent indiquer un âge plus jeune, compris entre 2 et 1,5 Ma. Enfin les restes de primates présents à Bridge Cave (étude en cours) indiqueraient un âge entre 2 et 1 Ma, allant peut-être jusqu'à 0,5 Ma d'après les restes d'équidés.

Le matériel de l'étude est constitué de fragments d'os fossiles récoltés sur les loci les plus significatifs de Bolt's Farm (Waypoint 160, Brad Pit A et B, Aves Cave, Milo A et B, Bridge Cave) au cours des nombreuses campagnes de fouilles menées à BFCS par Dominique Gommery dans le cadre du Laboratoire International Associé (LIA) CNRS n°1041 HOMEN Hominids and Environments : Evolution of Plio-Pleistocene Biodiversity (Cradle of Humankind, South Africa), dont celle d'octobre 2016 à laquelle j'ai participé. La majeure partie des échantillons proviennent des niveaux de brèche décalcifiée, excavée au cours des campagnes de fouilles. A des fins comparatives, des échantillons ont également été prélevés directement sur des fragments encore incrustés dans des blocs de brèche.

Article V : Secondary apatite formation in fossil bones from late Tertiary deposits of South Africa and Kenya

Julie AUFORT, Dominique GOMMERY, Christel GERVAIS, Loïc SEGALÉN, Nathalie LABOURDETTE, Cristina COELHO-DIOGO, Etienne BALAN

En preparation pour le *Journal of Archaeological Science*

Abstract

Bone reactivity offers a potential way to record local physical-chemical conditions prevailing in fossilisation environments. In the present study, a series of fossil bone samples from the karstic environments of the Bolt's Farm cave system (Cradle of Humankind, South Africa) and from fluvio-lacustrine environments of the Tugen Hills (Gregory Rift, Kenya) is analysed. Transformations of the biogenic apatite are attested from the chemical composition and infrared and NMR spectroscopic properties of fossil samples. They mostly consist in the formation of secondary apatite. Depending on the sample, the secondary apatite corresponds to a carbonate-rich hydroxy- or fluor-apatite. The maximum fraction of secondary apatite is close to 60 %, coinciding with previous observations in experimental alterations and suggesting a potential protective role of the secondary phase. It is suggested that the acetic acid treatment of fossil samples moderately affect their average crystallinity but may affect carbonate-rich domains of secondary apatite.

6.3. Introduction

Vertebrate bones are a major part of archaeological and paleontological records. Although the overall shape inherited from the living animal can be preserved, significant modifications affect the chemical composition as well as the microscopic and mesoscopic structure of bone. The apatitic fraction of fossil bone generally exhibits an overall decrease in carbonate content, enrichment in fluorine and incorporation of trace elements as well as an increase in crystallinity parameters. Accordingly, it differs from the nanocrystalline carbonate-

bearing hydroxylapatite corresponding to the main inorganic component of bone (Pasteris et al. 2008). Overall, fossil bones tend to display a transformation of the original bioapatite towards a carbonated fluorapatite (Kolodny et al. 1996). The organic fraction of bone also experiences in most cases a rapid degradation and is rarely preserved (Bocherens et al. 1997).

Despite its higher sensitivity to diagenetic transformation, the chemical and isotopic composition of fossil bones can complement the analyses performed on more resistant fossil enamel samples. When preserved in the fossil record, the stable isotope composition of biogenic apatite, and particularly the isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$) of structural carbonate groups, provides important information on past climates, past environments, dietary preferences and habitat of vertebrates (Kohn and Cerling 2002). On the other hand, heavily transformed fossil bones may also serve as probes of local diagenetic conditions because the uptake of trace elements depends on the physical-chemical parameters prevailing during the diagenetic recrystallization of apatite (e.g. Kohn and Law 2006, Trueman et al. 2006).

As a matter of fact, the depositional environment plays an important role in the transformation of fossil bones. Nielsen-Marsh and Hedges (2000) reported that site hydrology and characteristics of the burial environment strongly affect diagenetic pathways in bone. Several studies have focused on the diagenesis of fossils from fluvial and marine settings (Pfretzschner 2004, Tütken et al. 2008) and from harsh weathering environments (Tuross et al. 1989b, Trueman et al. 2004) to identify parameters controlling the early diagenesis of bones and teeth. Fossilisation in karstic environment is often considered to lead to better preservation. For example, Michel et al. (1995) reported only minor structural and chemical changes in fossil tooth enamel from the Lazaret prehistoric Cave and most fossil bones from karstic caves in Israel did not show transformation into carbonated fluorapatite (Weiner et al. 2002). Local variations in environmental conditions can also lead to different diagenetic pathways within one site (e.g. Stiner 2001, Bocherens et al. 2008).

The extent of fluoridation is often used as a marker of diagenetic transformation of bone due to the easy formation of secondary fluorapatite. However, the availability of fluorine in the environment is variable in different fossilisation contexts, whereas the formation of secondary hydroxyapatite is less easily detected (Aufort et al., submitted). In this work, we analyse a series of Plio-Pleistocene fossil bones from karstic environments of the Bolt's Farm cave system in the Cradle of Humankind, South Africa and from late Miocene fluvio-lacustrine environments of the Tugen Hills in the Gregory Rift, Kenya. The results further document the links between atomic scale transformation of bone and fossilisation context and suggest that a primary biogenic apatite fraction is preserved even in heavily transformed samples.

6.4. Materials and Methods

6.4.1. Samples and fossilisation context

The fossil material consists of fragments of mammal bones from the Bolt's Farm cave system (BFCS), aka Bolt's Farm, located on the south-western edge of the UNESCO Cradle of Humankind World Heritage Site, South Africa. Bolt's Farm cave system is not a single deposit but actually corresponds to an area of more than 30 fossiliferous cave infill deposits, related to a vast ancient but interconnected karstic system (Gommery et al. 2012). Bone fragments investigated in this study come from selected localities in Bolt's Farm: Weypoint 160 (WP), Brad Pit A and B (BPA, BPB), Aves Cave (AC), Milo A (MA), Milo B (MB) and Bridge Cave (BC). These localities differ in age, e.g. Weypoint 160 was dated between 4.5 and 4 Ma with biochronology and corresponds to the oldest fossiliferous deposit of the Cradle of Humankind (Sénégas and Avery 1998) while Aves Cave I was dated, also with biochronology, between 3 and 2.5 Ma (Pickford and Gommery 2016). Selected fossil bone samples are described in Table 6.1 and either come from indurated calcitic breccia (B) or decalcified breccia (DB).

Two fossil bone samples from the Lukeino formation (6.2-5.7 Ma, Sawada et al. 2002) located along the Tugen Hills in the Gregory Rift Valley, Kenya were added to the series.

A metapodial bone of modern ox, TH1, collected on the shores of the Bogoria Lake (Kenya) and a natural sample of carbonated fluorapatite (C-Fap) originating from the sedimentary deposit of Taiba (Senegal) were used as references (Aufort et al. submitted).

6.4.2 Analytical techniques

A rotary drill equipped with a diamond-tipped burr was used to collect bone powders from cortical bone fragments. Powders were then finely ground with an agate mortar and pestle. Prior to chemical analyses, fossil bone powders were treated with 0.1 M acetic acid for 30 minutes to remove diagenetic calcite and then rinsed 6 times with deionized water and dried at 60°C.

Fluorine content and Ca/P ratios are reported in Table 2. For each analysis, 100 mg of sample was dissolved in a 30% nitric acid solution for 1h at 80°C following the protocol previously used by Maurer et al. (2011). Fluorine content was measured using a fluoride ion selective electrode (Mettler Toledo), Ca was measured by energy dispersive X-ray fluorescence (Niton XL3t Thermo Fischer scientific) and phosphorus by spectrophotometry (Milton Roy Spectronic 301 spectrometer). The estimated analytical error based on the analysis of a certified reference material (bone ash SRM 1400) is about 5%.

ATR-FTIR spectra were recorded using a Quest ATR device and a Nicolet 6700 FTIR spectrometer. Pure powder samples were packed at the surface of the ATR crystal and two different spectra were recorded for each sample, using either a diamond or a Ge ATR crystal,

between 400 and 4000 cm^{-1} by averaging 200 scans with a resolution of 1 cm^{-1} . The use of a diamond ($n = 2.4$) ATR crystal allows the detection of relatively weak bands, such as those related to carbonate impurities. In comparison, Ge ($n = 4$) ATR is less sensitive but provides a better insight into the intrinsic properties of the sample (Aufort et al. 2016). All ATR spectra are reported in absorbance units $A = \log(I_0/I_R)$ where I_0 and I_R are the intensities of the incident and reflected light, respectively.

Single-pulse ^{19}F magic angle spinning (MAS) NMR experiments were performed on an Avance 700 Bruker spectrometer (16.3T) operating at 658.93 MHz using a 4 mm rotor at a 14 kHz spinning frequency.

Table 6.1 - Sample description. For Bolt's Farm fossils, the first initials correspond to the name of the locality (e.g. AC for Aves Cave I), B and DB refer to breccia and decalcified breccia respectively. The asterisk refers to preliminary ages that will be further refined in later studies.

Sample	Description	Origin	Age
TH1	Modern ox bone	Bogoria Lake (Kenya)	Modern
BPA-B	Fossil bone	Brad Pit A (BFCS, South Africa)	4-1.5 Ma*
AC-DB-5	Fossil bone	Aves Cave I (BFCS, South Africa)	3-2.5 Ma
AC-B-Fr	Fossil bone	Aves Cave I (BFCS, South Africa)	3-2.5 Ma
WP-DB	Fossil bone	Waypoint 160 (BFCS, South Africa)	4.5-4 Ma
BC-DB-P	Fossil bone	Bridge Cave (BFCS, South Africa)	2-0.8 Ma*
BPB-DB-25	Fossil bone	Brad Pit B (BFCS, South Africa)	4-3.5 Ma*
MB-DB-10	Fossil bone	Milo B (BFCS, South Africa)	2-1.5 Ma*
BPA-DB-12D	Fossil bone	Brad Pit A (BFCS, South Africa)	4-1.5 Ma*
MA-B	Fossil bone	Milo A (BFCS, South Africa)	2-1.5 Ma*
MA-B-Cal	Fossil bone	Milo A (BFCS, South Africa)	2-1.5 Ma*
AC-DB-Laz	Fossil bone	Aves Cave I (BFCS, South Africa)	3-2.5 Ma
Ma-DB-03N	Fossil bone	Milo A (BFCS, South Africa)	2-1.5 Ma*
TH33	Fossil bone	Tugen Hills (Lukeino formation, Kenya)	6.2-5.7 Ma
TH32	Fossil bone	Tugen Hills (Lukeino formation, Kenya)	6.2-5.7 Ma
C-Fap	Sedimentary Fap	Taiba (Senegal)	

6.5 Results

6.5.1. Chemical composition of fossil bones

Compared to modern bone, all fossil bones are enriched in fluorine. The fluorine content of most Bolt's Farm fossil bones range from 0.5 to 1.4 wt.%, apart from two more fluorinated samples, AC-DB-L and MA-DB-03N, containing 1.8 and 2.4 wt.% F respectively (Table 6.2). In contrast, fossil bones from the Tugen Hills, TH33 and TH32, display higher fluorine content, 2.8 and 2.9 wt.% F respectively.

The Ca/P mass ratios range from 2.11 to 2.44 in all fossil samples, higher than the 2.02 value found for modern bone, as is typically observed in fossil compared to modern bioapatites (e.g. Reiche et al. 2003, Yi et al. 2014b). These values are overall lower than those previously reported between 2.38 and 2.80 in Quaternary archaeological bones from Lazaret Cave by Michel et al. (1996).

Table 6.2 - Fluorine content and Ca/P mass ratio of modern and fossil bones from Bolt's Farm and Tugen Hills. Frequency of ν_1 PO₄ bands and IRSF calculated from the ν_4 PO₄ band (Weiner and Bar-Yosef, 1990) in Ge ATR-FTIR spectra. The asterisk refers to the sample after acetic acid treatment.

Sample	F (%)	Ca/P mass ratio	ν_1 PO ₄ (cm ⁻¹)	ν_4 PO ₄ IRSF (IRSF*)
TH1	0.20	2.02	960.6	3.64
BPA-B	0.5	2.36	962.7	5.35 (6.19)
AC-DB-5	0.6	2.19	962.5	4.81 (5.49)
AC-B-Fr	0.8	2.30	962.9	4.66 (5.41)
WP-DB	0.9	2.44	963.5	5.14 (5.82)
BC-DB-P	0.9	2.14	962.8	4.45 (5.01)
BPB-DB-25	1.0	2.21	962.4	4.48 (5.15)
MB-DB-10	1.1	2.18	963.4	4.69 (5.15)
BPA-DB-12D	1.1	2.11	962.4	5.23 (5.51)
MA-B	1.2	2.21	963.5	4.44 (4.99)
MA-B-Cal	1.4	2.29	964.0	4.82 (5.43)
AC-DB-Laz	1.8	2.16	963.5	4.98 (5.20)
Ma-DB-03N	2.4	2.15	965.3	5.72 (6.12)
TH33	2.8	2.26	965.7	4.24
TH32	2.9	2.21	965.8	4.69

6.5.2. Infrared spectroscopic study of fossil bone samples

6.5.2.1 ATR-FTIR spectra of fossil samples

Both diamond and Ge ATR-FTIR spectra of fossil bones (Figure 6.5) display the characteristic absorption bands ascribed to the internal vibrations of apatite phosphate groups, and to the structural carbonate impurities located at the A and B sites (channel and phosphate sites, respectively).

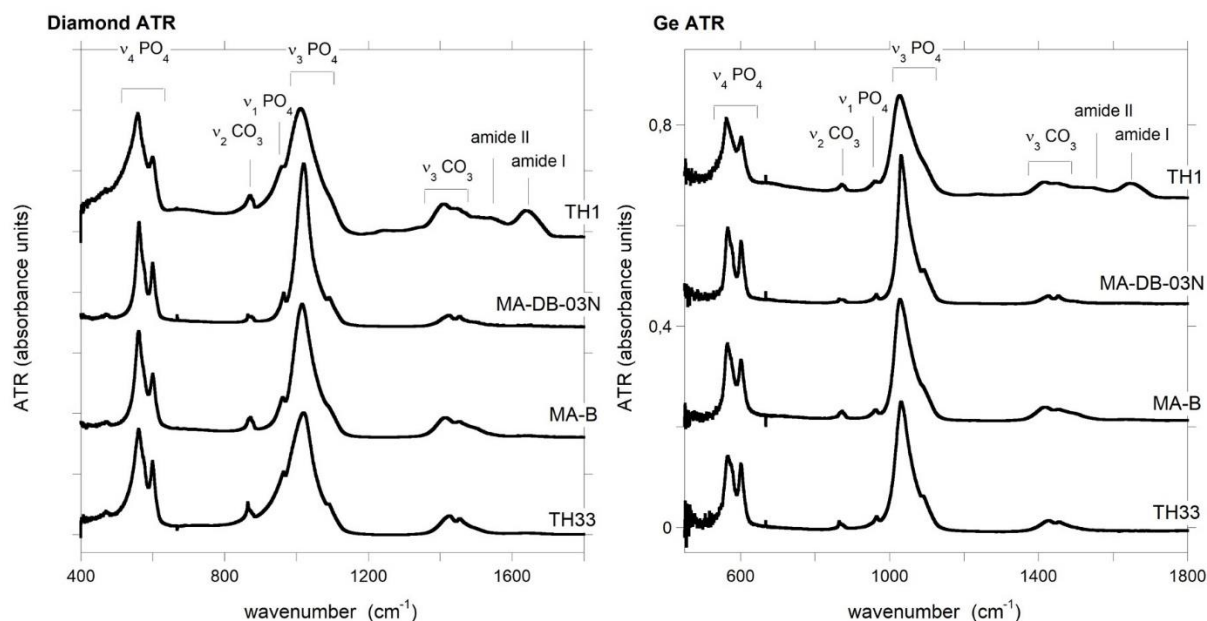


Figure 6.5 - Diamond and germanium ATR-FTIR spectra of modern bone (TH1) and selected fossil bones from Bolt's Farm (MA-DB-03N and MA-B) and from the Tugen Hills (TH33)

Intense bands observed between 550 and 600 cm^{-1} and between 1010 and 1090 cm^{-1} in the ATR-FTIR spectra of recent and fossil bones are related to the $\nu_4 \text{PO}_4$ bending and $\nu_3 \text{PO}_4$ stretching modes of the apatite phosphate groups, respectively. Amide bands related to the collagen matrix are not visible in the ATR-FTIR spectra of fossil bones, attesting to the degradation of the bone organic fraction. Compared to that of modern bone, diamond ATR-FTIR spectra of Bolt's Farm fossil bones containing less than 1.2 wt.% F display two additional bands at 630 and 3572 cm^{-1} related to the OH bending and stretching modes respectively (Figure 6.6). These bands are no longer visible in fossil bones from Bolt's Farm and the Tugen Hills with higher fluorine contents, apart from one sample, AC-DB-L (1.8 wt.% F).

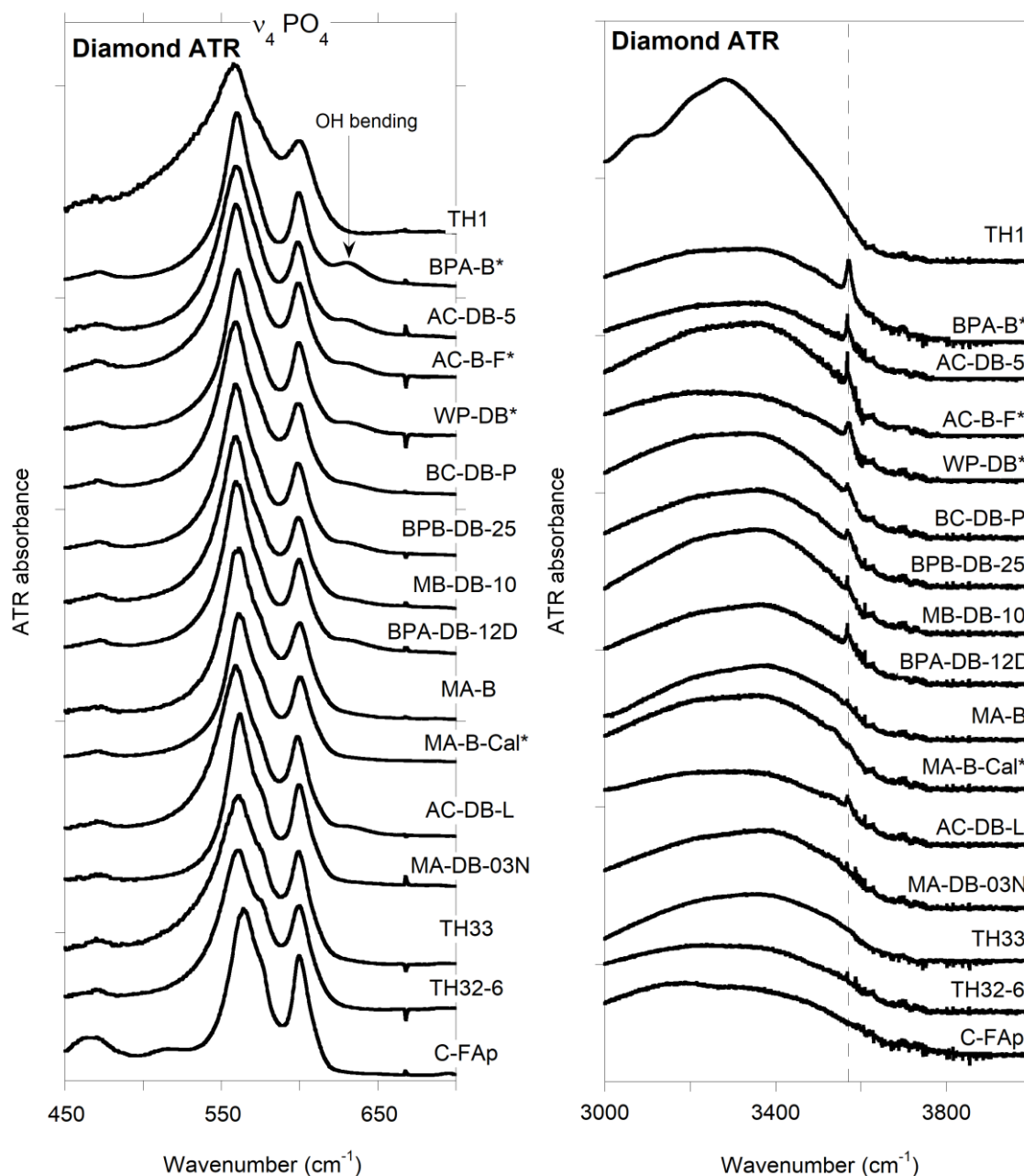


Figure 6.6 - ν_4 PO_4 (a) and OH stretching (b) diamond ATR-FTIR bands of modern bone, fossil bones from Bolt's Farm and the Tugen Hills and carbonated fluorapatite. The position of the OH stretching mode is indicated by a vertical dashed line.

Most Bolt's Farm fossils collected from the indurated breccia contained calcite as attested by the presence of the ν_4 CO_3 band at 713 cm^{-1} (Figure 6.7). Its absence in the spectrum of acetic acid treated samples confirms the removal of diagenetic calcite from these samples (Figure 6.S1). As the ν_2 CO_3 and ν_3 CO_3 bands of calcite overlap with those of structural carbonates in apatite, the acetic acid treatment should facilitate the analysis of the environment of structural carbonates in fossil samples. Although the ATR-FTIR spectra of most fossil bones

from decalcified breccia did not reveal the presence of calcite, selected samples from decalcified breccia were also treated with acetic acid to assess the effect of the treatment on the apatite structure. A systematic reduction of the relative intensity of ν_2 and ν_3 CO_3 bands is observed after acetic acid treatment on diamond ATR-FTIR spectra after normalization based on the ν_4 PO_4 band (Figure 6.8), whether the initial sample contained calcite or not. On calcite-bearing samples, the calcite removal makes the characteristic signals of structural carbonate groups visible on the spectra.

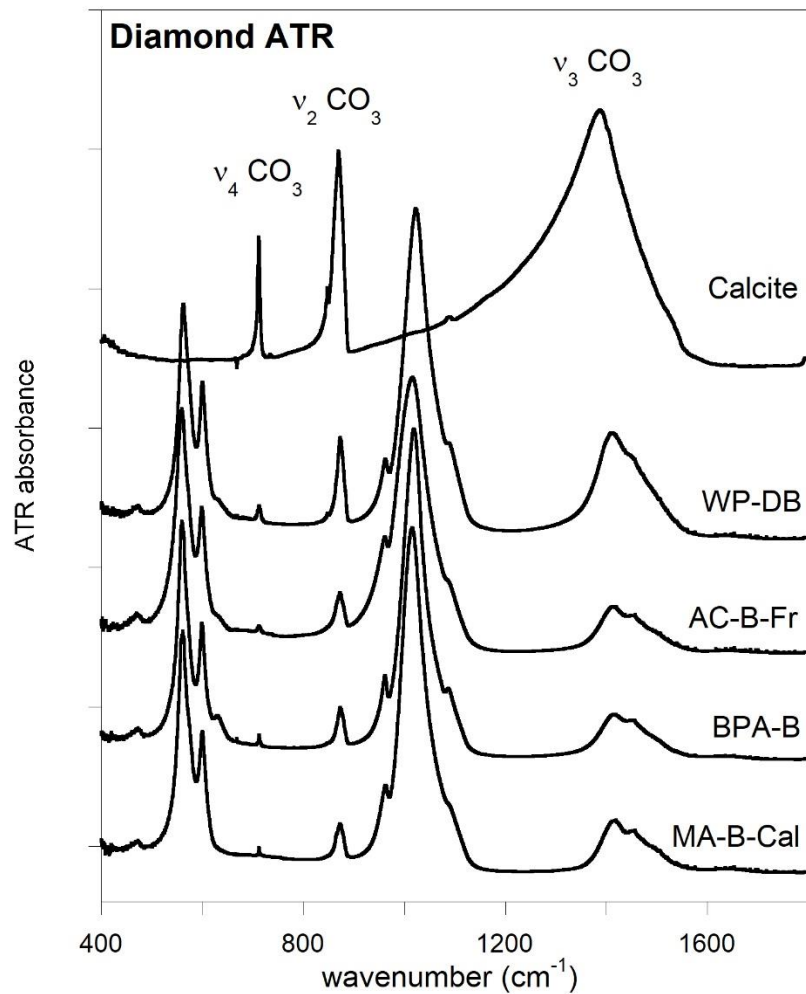


Figure 6.7 - Diamond ATR-FTIR spectra of calcite from Bolt's Farm breccia and calcite-bearing fossil bones from Bolt's Farm.

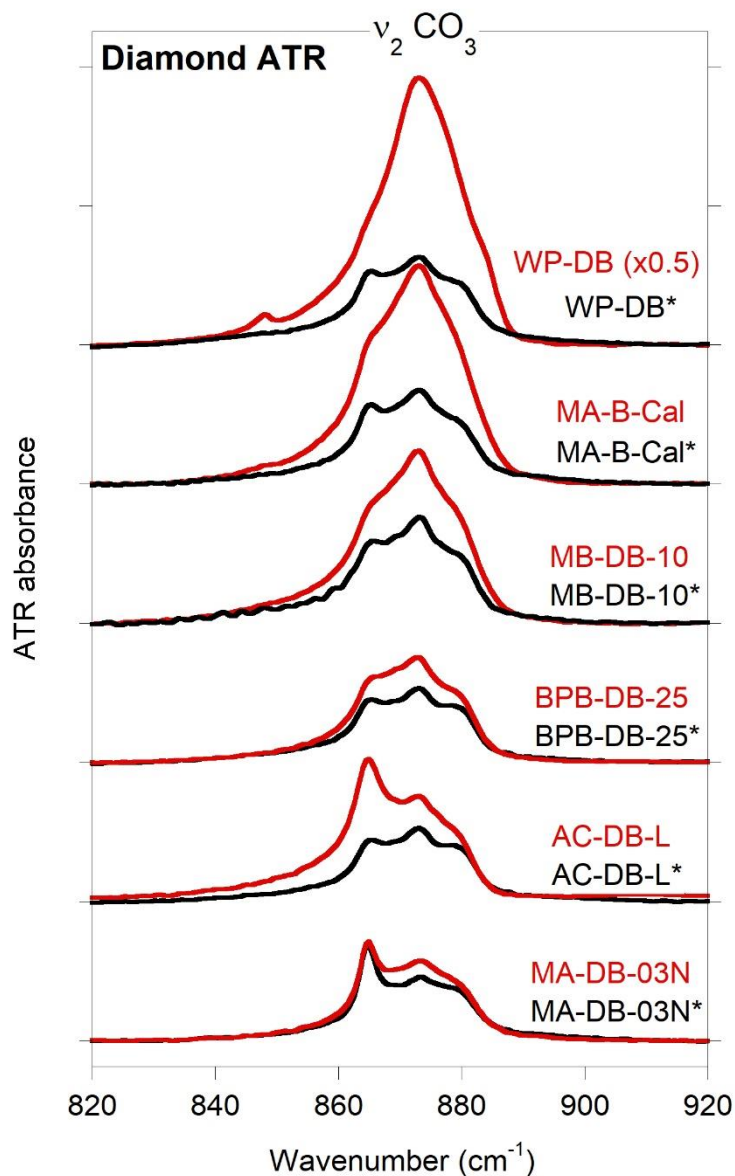


Figure 6.8 - ν_2 CO_3 diamond ATR-FTIR bands of calcite-bearing (WP-DB, MA-B-Cal) and calcite-free (MB-DB-10, BPB-DB-25, AC-DB-L, MA-DB-03N) fossil bones from Bolt's Farm before (red) and after acetic acid treatment (black).

6.5.2.2. Atomic-scale order and sample micro-structure probed by ATR-FTIR phosphate bands

The width of the ν_4 PO_4 bands is commonly used as a probe of structural order through the measurement of the Infrared Splitting Factor (IRSF; Weiner and Bar-Yosef 1990). IRSF values measured on Ge ATR-FTIR spectra of Bolt's Farm fossils range from 3.93 to 5.72 and are overall higher than the 3.64 value found for modern bone (Table 6.2). IRSF values for fossil bones from the Tugen Hills, 4.24 and 4.69, fall in the range of values found in Bolt's Farm fossils. The width of the ν_4 PO_4 bands is reduced after acetic acid treatment (Figure 6.9), which leads to a systematic increase in IRSF in all fossil bones treated, whether the sample originally contained calcite or not (Table 6.2, Figure 6.10).

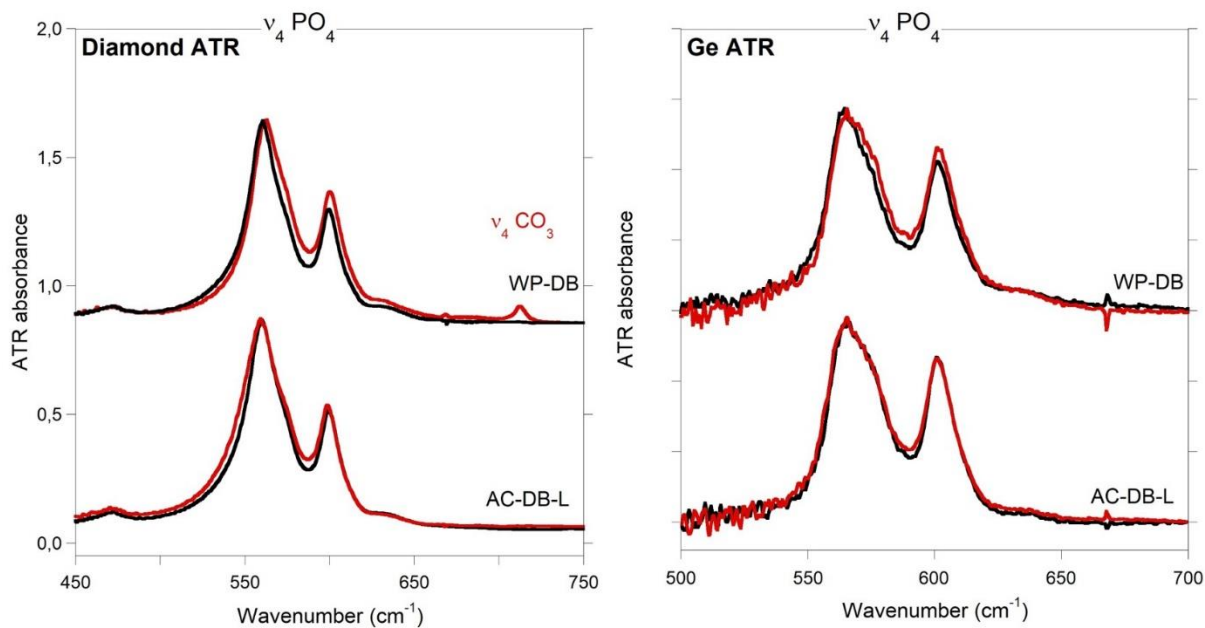


Figure 6.9 - ν_4 PO_4 diamond and germanium ATR-FTIR bands of a calcite-containing (WP-DB) and calcite-free (AC-DB-L) fossil bone samples before (red) and after acetic acid (black) treatment. Note the consistent variations observed in both diamond and Ge spectra, indicating a modification of the sample intrinsic properties.

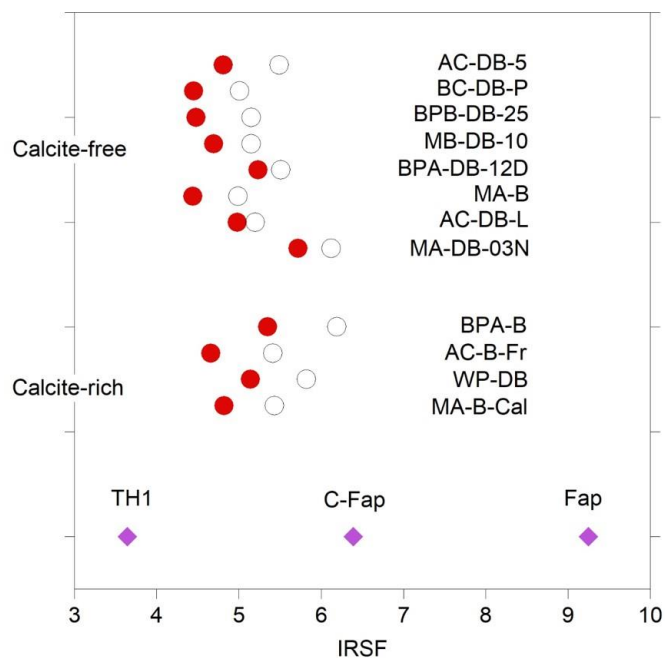


Figure 6.10 - IRSF values calculated for modern bone and sedimentary carbonated fluorapatite (diamonds) and for Bolt's Farm fossil bones before (red circles) and after (open black circles) acetic acid treatment.

The line shape and width of strong bands in infrared spectra are not only related to the atomic-scale structure of the samples but also depend on parameters such as porosity, grain size and shape of particles due to long-range electrostatic interactions within and between particles (Aufort et al., 2016). In contrast the position and line shape of weaker bands, such as the band at $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ related to the $\nu_1\text{ PO}_4$ stretching mode, are less affected by these effects. Compared with the $\nu_4\text{ PO}_4$ band, the weaker $\nu_1\text{ PO}_4$ band is thus expected to provide a complementary meaningful insight into the atomic-scale properties of the sample (Balan et al. 2011, Aufort et al. 2016, 2018). Its position has been shown to be well correlated to apatite crystallinity in archaeological heated bones (Lebon et al. 2014).

The $\nu_1\text{ PO}_4\text{ Ge}$ ATR-FTIR band is located at $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ in modern ox bone TH1 and at $\sim 966\text{ cm}^{-1}$ in the carbonated fluorapatite (C-Fap) sample. It corresponds to a large Gaussian signal in TH1 while it displays a pronounced Lorentzian shape in C-Fap. Compared to modern bone, the $\nu_1\text{ PO}_4\text{ Ge}$ ATR-FTIR band of fossil bones is asymmetric and systematically shifted towards higher frequencies (Table 6.2, Figure 6.11), which is consistent with the incorporation of fluorine in the apatite structure. Its position correlates with the sample fluoride content (Figure 6.12) and is unaffected by the acetic acid treatment. Following the results obtained on experimental alteration of modern bone (Aufort et al. submitted), the $\nu_1\text{ PO}_4\text{ Ge}$ ATR-FTIR band of fossil samples has been analyzed by using a two-component model to fit the band shape (Table 6.3). The first component is a Gaussian function, whose position and width were kept fixed to that of the unaltered bone sample (TH1). Accordingly, it is expected to correspond to remnants of the biogenic material in the fossil samples. The second component, which is expected to correspond to secondary apatite, is described by a Lorentzian function whose position and width are free parameters (Table 6.3). The fraction of secondary apatite varies between 24 and 60 % in Bolt's Farm fossils, while it reaches 64 % in fossil bones from the Tugen Hills (Table 6.3). The position of the peak is mainly centred on $962.5\text{-}963.5\text{ cm}^{-1}$ in Bolt's Farm fossils apart from the two F-rich samples for which the position is higher and closer to that of sedimentary carbonated fluorapatite (966.1 cm^{-1}). Regarding fossils from the Tugen Hills, a high proportion of secondary carbonated fluorapatite is consistent with their higher fluorine content. It is noteworthy that even in highly transformed bone samples, i.e. TH33 and TH32, the proportion of secondary apatite is limited to about 64%.

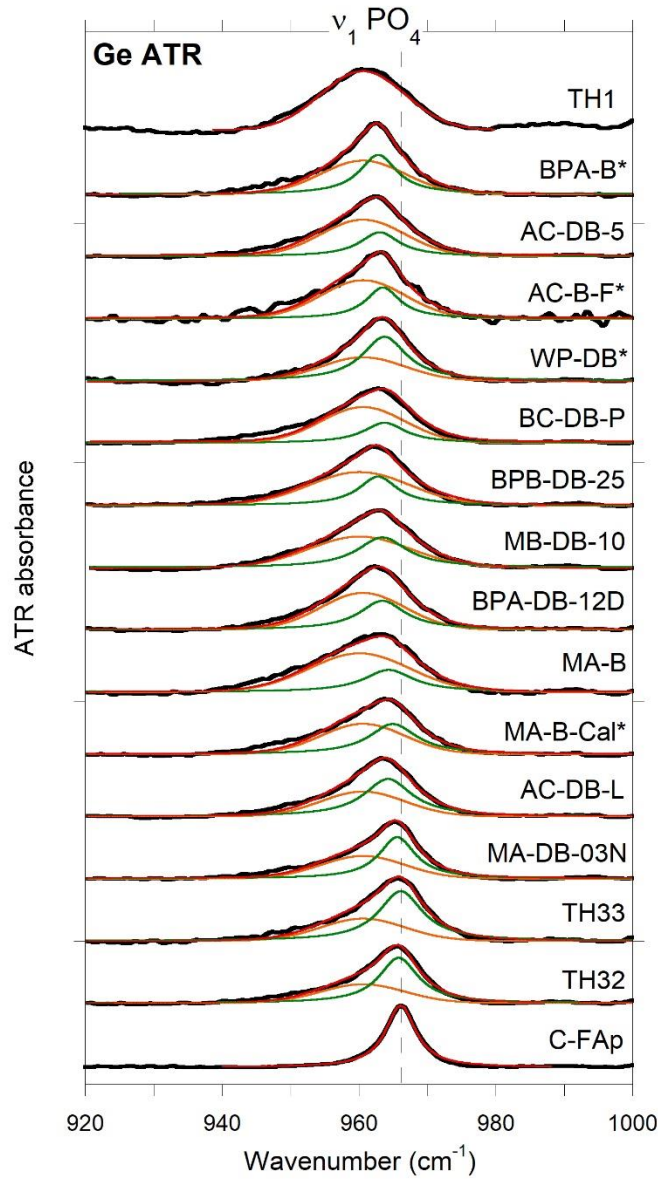


Figure 6.11 $\nu_1 \text{PO}_4$ Ge ATR-FTIR band in modern bone, fossil bones from Bolt's farm and the Tugen Hills and in carbonated fluorapatite. The asterisk refers to the sample after acetic acid treatment.

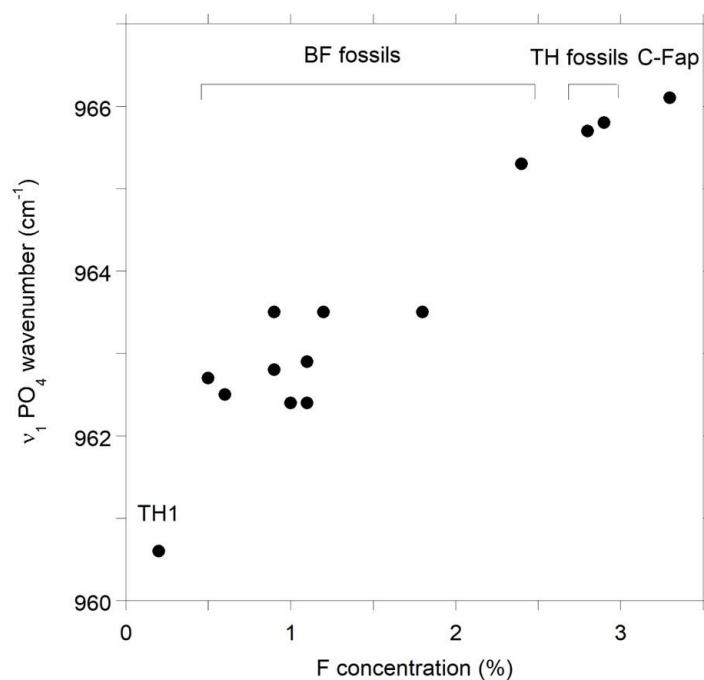


Figure 6.12 - Position of the ν_1 PO₄ Ge ATR-FTIR band as a function of fluorine content

Table 6.3 - Parameters of the fit of the ν_1 PO₄ Ge ATR-FTIR bands

Sample	“TH1-like” Gaussian signal			Secondary Lorentzian contribution		
	ω (cm ⁻¹)	FWHM	Area (%)	ω (cm ⁻¹)	FWHM	Area (%)
TH1	960.6	14.578	100	-	-	-
BPA-B*	960.6	14.578	55.9 ± 9.3	962.8	6.66	44.1 ± 7.4
AC-DB-5	960.6	14.578	68.2 ± 12.4	963.0	7.02	31.8 ± 5.8
AC-B-Fr	960.6	14.578	66.5 ± 13.9	963.5	6.11	33.5 ± 7.0
WP-DB*	960.6	14.578	39.9 ± 4.2	963.8	7.93	60.1 ± 6.3
BC-DB-P	960.6	14.578	70.0 ± 14.8	963.8	7.50	30.0 ± 6.3
BPB-DB-25	960.6	14.578	60.9 ± 13.4	963.4	6.57	23.7 ± 5.2
MB-DB-10	960.6	14.578	57.8 ± 14.0	963.4	8.88	44.2 ± 10.7
BPA-DB-12D	960.6	14.578	61.4 ± 8.0	963.5	8.21	39.6 ± 5.2
MA-B	960.6	14.578	70.0 ± 9.6	964.4	8.87	30.0 ± 4.1
MA-B-Cal*	960.6	14.578	53.9 ± 6.8	965.0	8.47	46.1 ± 5.8
AC-DB-Laz	960.6	14.578	43.2 ± 4.6	964.3	8.58	56.8 ± 6.1
Ma-DB-03N	960.6	14.578	45.4 ± 3.3	965.6	6.48	54.6 ± 4.0
TH33	960.6	14.578	36.0 ± 2.8	966.1	7.86	64.0 ± 4.9
TH32	960.6	14.578	37.0 ± 2.8	965.8	6.98	63.0 ± 4.7
C-Fap	-	-	-	966.1	5.357	100

6.5.2.3. Environment of structural carbonate groups inferred from the ν_2 CO_3 band

The ν_2 CO_3 component of modern bone displays the usual A- and B-type components at $\sim 880\text{ cm}^{-1}$ and $\sim 872\text{ cm}^{-1}$ respectively, as well as an asymmetric tail on the low-frequency side, which corresponds to the broad band centred at $860\text{--}865\text{ cm}^{-1}$ attributed to “labile” carbonate groups in bone (Rey et al. 1989) (Figure 6.13).

All fossil bones display an additional signal at 865 cm^{-1} that matches with that observed in the reference sedimentary carbonated fluorapatite. This signal is diagnostic of a clumped (CO_3^{2-} , F^-) defect substituting for the phosphate group in the apatite structure and has been observed in fossil teeth from Rift Gregory in Kenya (Yi et al. 2013, 2014b).

Regarding calcite-free fossils, the apparent proportions of clumped (CO_3^{2-} , F^-) defect, A-type and B-type carbonate signals are modified in the most fluorinated samples (AC-DB-L and MA-DB-03N) after acetic acid treatment (Figure 6.8). Together with the overall decrease in the relative intensity of the structural carbonate signals in normalized spectra, this suggests that the acetic acid treatment could have removed a fraction of carbonate-bearing secondary phases.

6.5.3. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

The ^{19}F MAS NMR spectra of fossil bones display a main signal at $\sim -102\text{ ppm}$ ascribed to F^- ions incorporated in the channel sites of the apatite structure (Figure 6.14). This signal is broader in Bolt’s Farm fossil bone samples (FWHM of $2.12\text{--}3.69\text{ ppm}$) than in the reference sedimentary carbonated fluorapatite (1.8 ppm). The less intense signal observed in sedimentary carbonated fluorapatite at -88 ppm corresponds to the clumped (CO_3^{2-} , F^-) defect substituting for the phosphate group in the structure of carbonated fluorapatite (Yi et al. 2013). ^{19}F MAS NMR thus confirms that fluoride is incorporated in the apatite structure, both in the channel sites and in the clumped defect to a lesser extent. The clumped defect signal is more intense in samples with higher fluorine content, i.e. MA-DB-03N and TH33 (with an area about 3% that of the total area of the ^{19}F NMR spectrum), than in BPB-DB-25 (with an area about 1% that of the total area of the ^{19}F NMR spectrum). The larger bandwidth (4.12 ppm) observed in TH33 compared to the other fossil samples ($2.12\text{--}3.69\text{ ppm}$) is consistent with the corresponding relatively broad clumped (CO_3^{2-} , F^-) defect signal observed in the infrared spectra, even though the potential occurrence of paramagnetic centres or impurities (e.g. Fe, Mn ions) in fossil bones can also affect the NMR width.

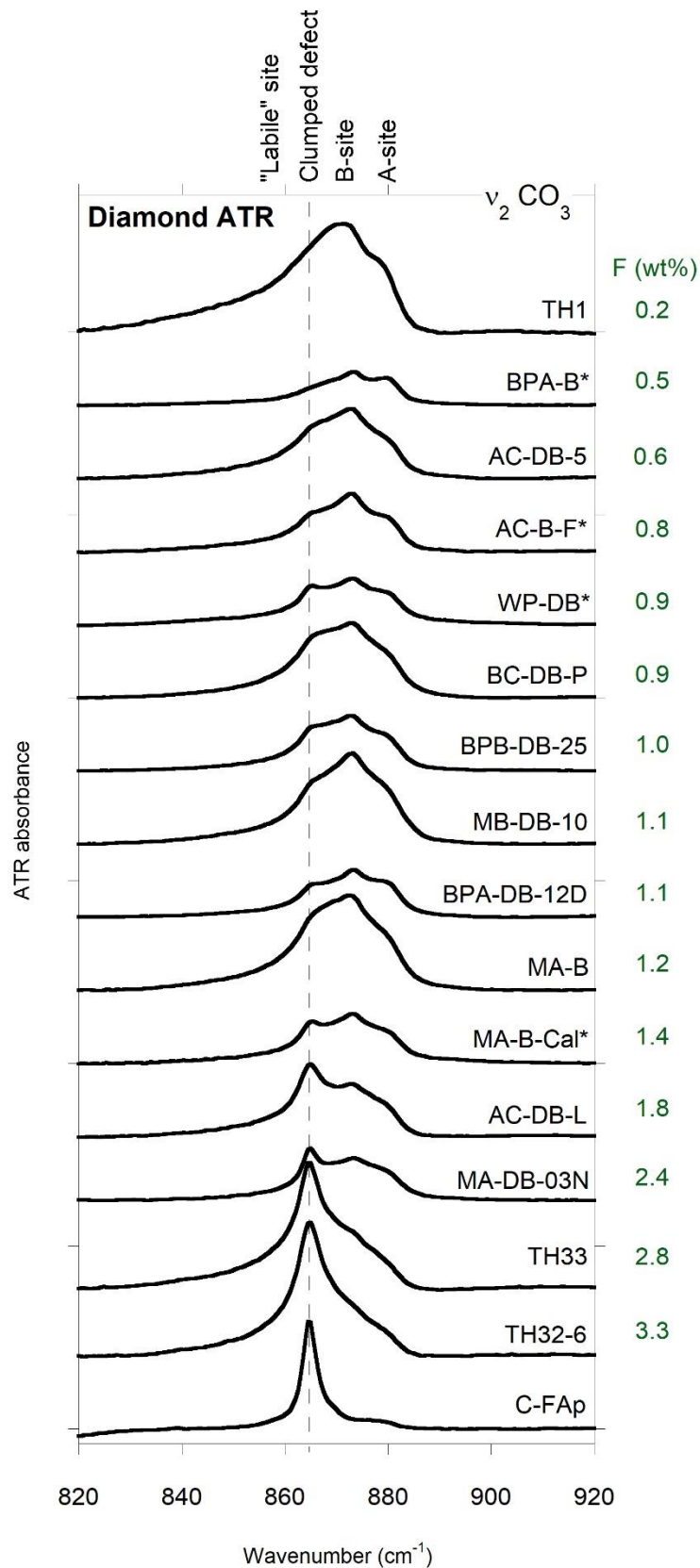


Figure 6.13 - ν_2 CO_3 diamond ATR-FTIR bands of modern bone, fossil bones from Bolt's Farm and the Tugen Hills and carbonated fluorapatite. All spectra are normalised based on the ν_4 PO_4 band intensity. The position of the clumped (F^- , CO_3^{2-}) defect is indicated by a vertical dashed line. The asterisk refers to the sample after acetic acid treatment.

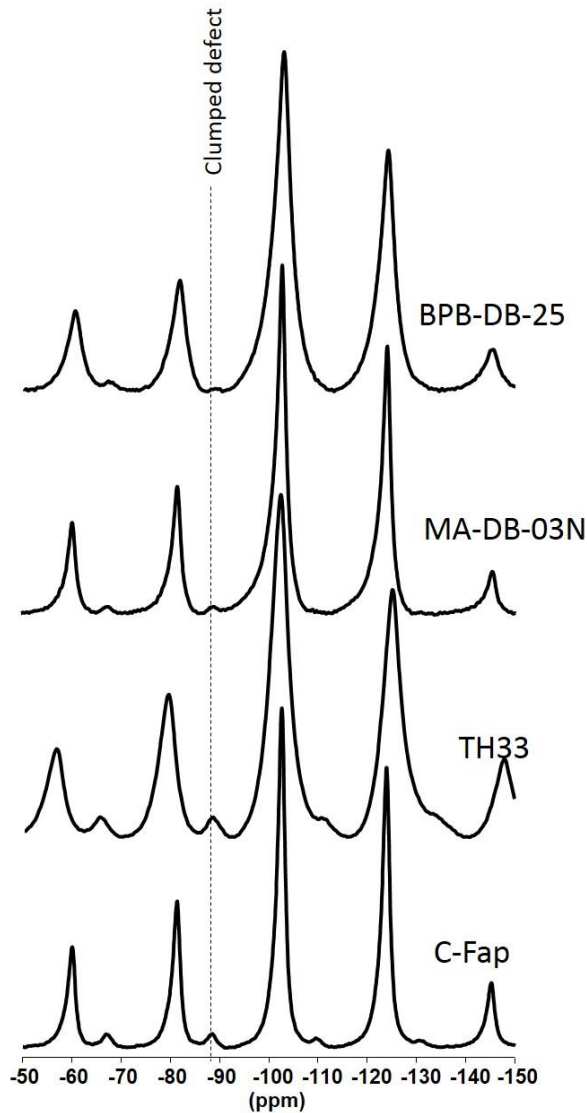


Figure 6.14 ^{19}F MAS NMR spectra of BPB-DB-25 and MA-D-03N fossil bone samples from Bolt's Farm and TH33 from the Tugen Hills compared to that of sedimentary carbonated fluorapatite. The ^{19}F position of the clumped defect is indicated by a vertical dashed line.

6.6 Discussion

6.6.1 Evidence of secondary carbonated apatite formation

The structural differences observed between fossil and modern bones, i.e. increase in crystallinity, formation of the clumped (CO_3^{2-} , F^-) defect, incorporation of fluoride and hydroxyl groups suggest that dissolution of the original biogenic material and formation of secondary apatite occurred. These observations comfort the use of a two-phase model to interpret the properties of the $\nu_1 \text{PO}_4$ band, leading to a proportion of secondary apatite reaching 64 % in the most transformed samples. Variations in the position of the $\nu_1 \text{PO}_4$ band related to secondary apatite also suggest that its composition may differ from one sample to the other. In F-rich fossils, i.e. TH32, TH33, MA-DB-03N, the presence of the clumped defect and the

absence of structural OH signals in their ATR-FTIR spectra are in favour of secondary fluorapatite. In fossil bones with lower F content, the frequency of the second component is closer to that of hydroxyapatite ($\sim 963\text{ cm}^{-1}$). The presence of bending and stretching bands related to structural OH groups also supports the formation of secondary hydroxyapatite. This is consistent with the results of alteration experiments (Aufort et al., submitted) indicating that formation of secondary hydroxyapatite and fluorapatite always occur and only depending on the presence or absence of fluoride, respectively. In experimental alterations, two well-defined trends are thus observed in a diagram reporting the F concentration as a function of the proportion of secondary phase. In the fossil samples, intermediate situations occur (Figure 6.15), suggesting the formation of both secondary fluorapatite and hydroxyapatite in a single sample. The potential formation of a solid solution with a mixed fluor- and hydroxyl-composition cannot be fully excluded. However, the observation of the OH vibrational bands at 3572 and 630 cm^{-1} attests to the occurrence of extended domains of hydroxyapatite (Rodriguez-Lorenzo et al. 2003). Furthermore, even in low fluoride fossil bones, formation of carbonated fluorapatite occurred as indicated by the presence of the clumped (CO_3^{2-} , F^-) defect in all fossils, even those with intense OH bending signals. Both observations are suggestive of the formation of individual domains of hydroxyapatite or fluorapatite, which is also consistent with the conclusions of the fluoridation experiments of dentin and enamel by Pasteris and Ding (2009).

As previously observed in alteration experiments (Aufort et al. submitted), carbonates are incorporated in the secondary apatite but, in the absence of fluoride, their signal is hardly distinguished from that of primary carbonates. The formation of carbonated fluorapatite is more easily detected because the clumped (CO_3^{2-} , F^-) defect displays a specific spectroscopic signature, both in infrared spectroscopy and ^{19}F NMR. It is most likely that the secondary hydroxyapatite also contains a fraction of structural carbonates.

It is noteworthy that the highest fraction of secondary apatite observed is about $\sim 60\%$. This limited degree of transformation does not depend on the F enrichment of the sample and is also observed in hydroxylated samples as, e.g., sample WP-DB*, which displays about 60 % of secondary apatite. The highest fraction observed coincides with the maximum $\sim 60\%$ fraction of secondary apatite determined in modern bones altered under controlled conditions (Aufort et al. submitted). Accordingly, it supports the idea that the formation of secondary apatite could have a protecting role against further transformation of the original bioapatite. No correlation is observed between the extent of alteration and age and even in older (e.g. TH33, TH32, WP-DB) and F-rich (MA-DB-03N, TH33, TH32) samples, the transformation seems limited at about 60 percent.

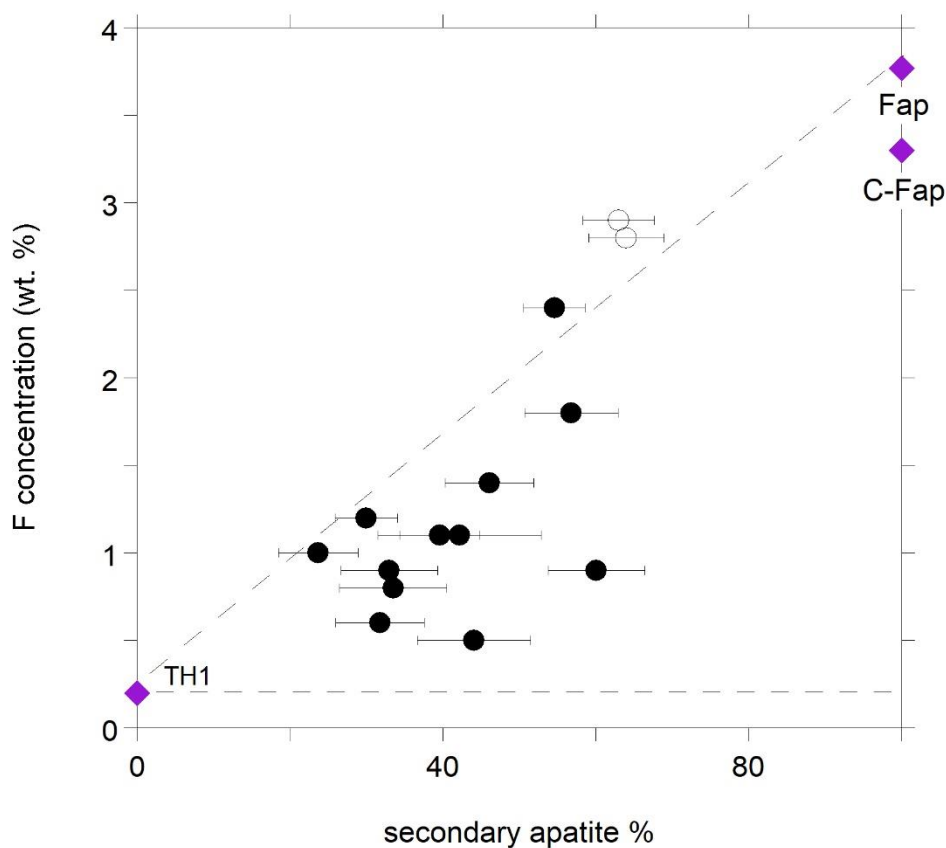


Figure 6.15 - Evolution of fluoride content as a function of the percentage of secondary apatite in Bolt's Farm (full black circles) and Tugen Hills (open circles) fossils. Dashed lines are guide for the eye. Note the maximum degree of transformation at ~60 % and the samples plotting below the linear mixing trend between biogenic and fluorapatite, attesting to the formation of secondary hydroxyapatite.

6.6.2 Effect of the acetic acid treatment on fossil samples

Acetic acid is the most commonly used reagent to remove exogenous carbonate from bioapatite prior to stable isotope analyses of structural carbonate and chemical analyses (Snoeck and Pellegrini 2015). It also plays a major role in fossil preparation. Indeed, extracting bones from the breccia matrix is difficult and two methods are usually used: mechanical and/or chemical preparation. The latter is more adapted to recover the microfauna and fragile fossils and, unlike mechanical preparation, does not risk leaving marks that could be misinterpreted as taphonomic or anthropic marks. For instance, the Plio-Pleistocene Palaeontology Section of the Ditsong National Museum of Natural History (Pretoria, South Africa) has developed an acid preparation lab dedicated to the extraction of fossil bones from blocks of breccia (Gommery et al. 2016). In this case fossils are exposed to acetic acid for longer periods of time (~24h) but protected using a glue coating. Effects of acetic acid on the structure and stable isotope composition of bioapatites are thus of importance to palaeoenvironmental reconstructions and have been widely discussed along with other pre-treatments (e.g. Lee-Thorp and van der Merwe, 1991; Garvie-Lok et al. 2004; Yoder and Bartelink 2010; Snoeck and Pellegrini 2015). Overall these studies show that acetic acid treatment leads to an increase in crystallinity (IRSF)

and a decrease in carbonate content and partially dissolves the mineral fraction of modern and archaeological bioapatites (Snoeck and Pellegrini 2015). The present results confirm that the acetic acid treatment, even at low concentration (0.1 M) and reaction time (30 min), beside removing the secondary calcite, affects the apatitic fraction of the samples. It leads to a moderate increase in the IRSF and overall decrease in the relative intensity of the signal of structural carbonates. Its effect on the ν_1 PO₄ band is however not detected, possibly due to the smaller intensity of this band. Based on these observations, it is suggested that the acetic acid treatment removes more soluble carbonate-rich apatitic domains, in addition to diagenetic calcite. A preferential use of acetate buffered acetic acid solutions has been recommended (e.g. Garvie-Lok et al. 2004) and leads to a smaller increase in IRSF values than unbuffered acetic acid (Snoeck and Pellegrini 2015) but does not completely exclude possible dissolution-recrystallisation of bone apatite (Aufort et al. submitted).

6.6.3 Implications for palaeoenvironmental reconstructions

Regardless of the fossilisation conditions, dissolution-recrystallization of bone is systematically observed. Conditions prevailing in the environment, i.e. chemical composition of percolating fluids and possibly of the breccia in Bolt's Farm, are the main factor in driving the transformation of fossil bones. A certain homogeneity is observed within each site at Bolt's Farm, with similar ν_2 CO₃ signatures for fossil bones belonging to one locality (Figure 6.S2), apart from Milo A and Aves Cave I where there might be local concentration spots of fluorine, leading to further formation of secondary fluorapatite. Overall, fossil bones from the karstic environment at Bolt's Farm are less transformed in terms of percentage of secondary apatite than fossils from the fluvio-lacustrine environment (Pickford 1974) of the Tugen Hills. In karstic environments, dissolution-recrystallization also occurs but the lower F concentration of percolating solutions leads to the preferential formation of secondary hydroxyapatite. The higher solubility of hydroxyapatite compared to fluorapatite (Elliott 2002, Rakovan 2002) may explain why an overall smaller percentage of transformation is observed in Bolt's Farm fossils than in the more fluorinated fossils from the Tugen Hills. These observations confirm the sensitivity of bone to the nature of percolating solutions, making fossil bone a potential record of local physical-chemical conditions. Further works on older and different contexts are however required to confirm this suggestion. Another avenue to explore pertains to the development of a chemical treatment able to remove secondary apatite in fossils via selective dissolution of the secondary phase.

Acknowledgments

This work was supported by French state funds within the framework of the Cluster of Excellence MATISSE led by Sorbonne Universités. We We would like to thank C. Klinkert and J. Gaylord for their authorizations to conduct fieldwork on their property, R. Redelstorff and P. Hine (APM Unit, SAHRA), L. Smith (COH WHS Authority, Gauteng Provincial

Government) and the French Embassy in South Africa for their continuous support. The Ditsong National Museum of Natural History, the CNRS and NRF (LIA N° 1041 HOMEN) and the French Ministry of Europe and Foreign Affairs (Sous-direction de l'Enseignement supérieur et de la Recherche - Pôle Sciences Humaines et Sociales, Archéologie et Patrimoine) (MPFSA – Mission Paléanthropologique Franco-Sud-Africaine) funded the fieldwork. The Kenyan samples were collected on the field by the Kenya Palaeontology Expedition funded by the CNRS (GDRI 193, UMR 7207 CR2P), the Pierre-and-Marie-Curie University (UMR 7193 ISTEP), the Muséum National d'Histoire Naturelle, the Collège French Ministry of Europe and Foreign Affairs (Commission of Archaeological Excavations). Authorizations for excavation and export were provided by the Government of Kenya (Ministry of Education, Science & Technology). The French Région Ile de France-SESAME program is acknowledged for financial support (700 MHz).

Supplementary Information

Figure 6.S1 Diamond ATR-FTIR spectra of calcite-bearing fossil bones before (red) and after (black) acetic acid treatment.

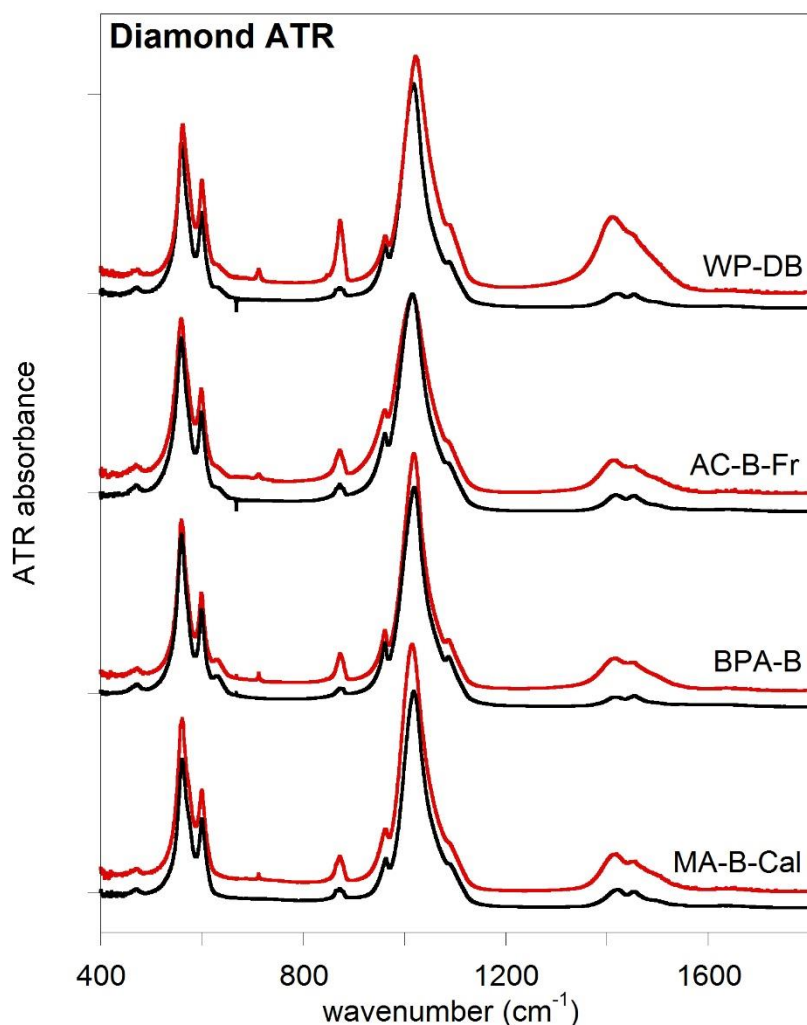
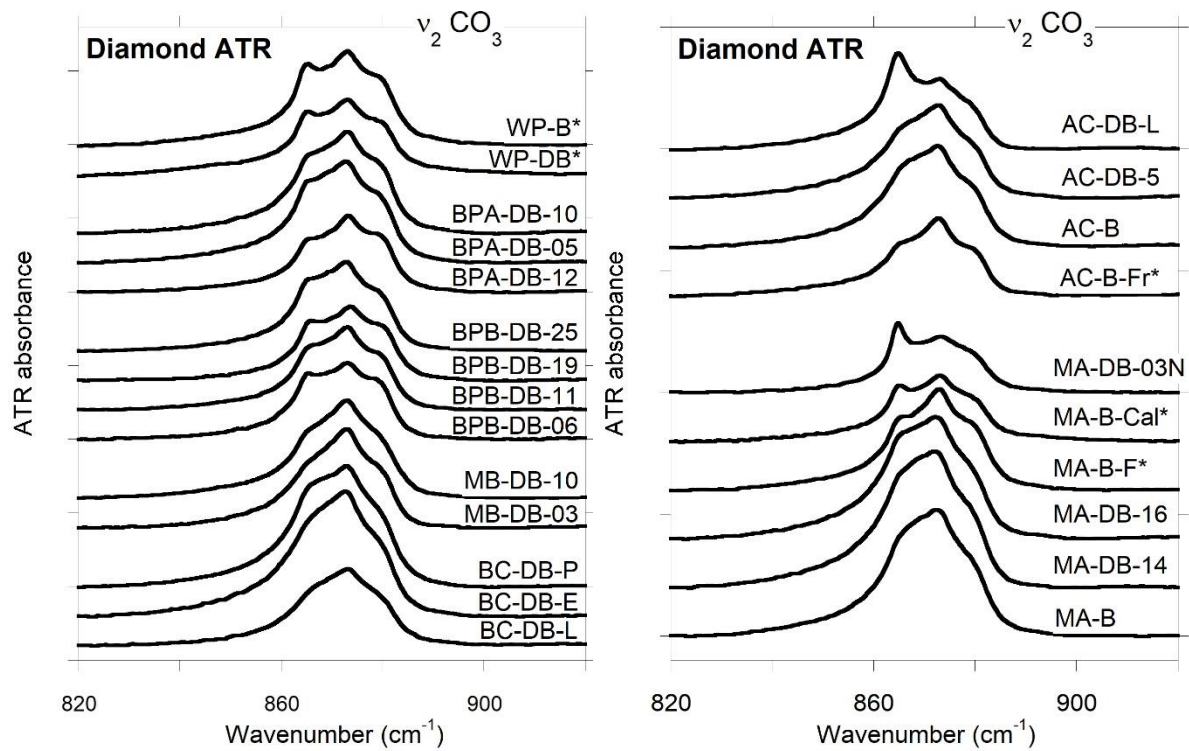


Figure 6.S2 ν_2 CO_3 diamond ATR-FTIR bands of fossil bones grouped by localities at Bolt's Farm.



Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse avait pour objectif de préciser les mécanismes d'altération de l'os impliqués par la fossilisation. Il s'agissait de comprendre d'une part comment s'effectue l'acquisition de l'information géochimique à travers le fractionnement isotopique et l'incorporation d'éléments trace tels que le fluor et d'autre part comment s'effectue la préservation de l'enregistrement géochimique au cours du processus de fossilisation en déterminant les mécanismes de transformations à l'échelle atomique.

Ces questions ont été abordées en combinant des approches expérimentales et théoriques. Les résultats obtenus au cours de cette thèse constituent une avancée dans la compréhension des propriétés de fractionnement isotopique des apatites et dans les mécanismes de transformation des os de vertébrés au cours de la fossilisation.

Concernant les modalités d'acquisition du signal isotopique, les lois de fractionnement et les paramètres contrôlant les compositions isotopiques des apatites biologiques restent encore mal contraintes. Le calcul *ab initio*, reposant sur des méthodes DFT, des propriétés de fractionnement isotopique de l'apatite a permis d'une part de fournir un référentiel théorique concernant le fractionnement isotopique à l'équilibre entre apatite et eau et d'autre part d'évaluer le fractionnement isotopique induit par l'incorporation des carbonates dans différents sites cristallographiques de la structure de l'apatite. Cette étude a ainsi permis de souligner l'importance de combiner l'étude du fractionnement isotopique entre les différents sites cristallographiques de l'apatite (e.g. PO_4 , CO_3 en site A et B, défaut mixte (CO_3^{2-} , F), ...) aux études spectroscopiques pour déchiffrer les mécanismes de transformations impliqués par la fossilisation. Sur le plan plus général, cette approche théorique a pu être étendue à des thématiques plus larges telles que le cycle biogéochimique du calcium et d'aborder des fractionnements spécifiques entre sites cristallographiques dont la mesure n'est pas à l'heure actuelle faisable, (e.g. fractionnement entre calcium en site I et en site II), mais dont le calcul permet d'expliquer certaines variabilités observées expérimentalement.

La spectroscopie infrarouge étant un outil incontournable dans l'étude des processus taphonomiques pour sonder la matière à l'échelle atomique, ce travail a fait l'objet d'un développement méthodologique important en ce qui concerne la modélisation des spectres ATR-FTIR comme appui à l'interprétation des observations expérimentales. Cette approche repose sur la construction d'une fonction diélectrique effective qui reproduit la réponse électrostatique de l'échantillon en poudre à partir des propriétés diélectriques des constituants individuels (apatite, collagène) et en fonction de paramètres caractéristiques de l'échantillon (forme et taille des particules, porosité). Elle propose donc de considérer l'échantillon comme un matériau composite, ce qui est particulièrement adapté pour décrire les effets liés à

l'interaction entre les fractions organiques et minérales du matériau biologique. La confrontation systématique entre spectres théoriques et expérimentaux permet de renforcer la fiabilité accordée à cette approche et au modèle de milieu effectif utilisé. Cette approche fondamentale a permis de construire une base solide pour l'interprétation des signatures spectroscopiques des apatites et apatites biologiques. Elle aura donc été mise à profit dans le reste de ce travail pour appuyer l'étude des transformations cristallographiques des os fossiles et actuels altérés en conditions contrôlées. De façon plus générale ce développement méthodologique pourra également être appliqué à d'autres biominéraux majeurs tels que la calcite pour laquelle les effets analysés et modélisés dans les spectres des bioapatites sont également observés (cf annexe II).

L'étude des transformations à l'échelle atomique d'échantillons d'os actuel altérés en conditions contrôlées a permis d'identifier les mécanismes d'incorporation du fluor ainsi que les modalités de dissolution-recristallisation de la bioapatite. Comme suggéré par les résultats de l'étude théorique des propriétés de fractionnement isotopique de l'apatite, la combinaison de l'approche spectroscopique aux mesures isotopiques des différents sites cristallographiques de l'apatite a permis ici d'élucider la nature des transformations résultant de l'interaction entre le biominéral et la solution d'altération. Celles-ci impliquent une dissolution partielle de l'apatite biogénique et la formation d'une couche d'apatite carbonatée secondaire à la surface des cristallites. La nature fluorée ou hydroxylée de cette apatite carbonatée secondaire dépend de la présence ou non de fluor dans la solution d'altération. Celle-ci pourrait avoir un rôle protecteur contre la dissolution totale de l'apatite biogénique, la fraction maximale d'apatite secondaire étant, dans les conditions de l'expérience, limitée à environ 60 %. De façon plus générale, cette étude souligne la complexité du lien entre transformations minéralogiques et préservation des compositions isotopiques, notamment du fait de la difficulté à distinguer les carbonates secondaires des carbonates primaires, en particulier en l'absence de fluor et donc de défaut mixte (CO_3^{2-} , F^-). Ces résultats s'inscrivent également dans la problématique bien plus large des interactions eau-minéral et une combinaison similaire d'approches spectroscopiques et isotopiques pourrait être appliquée à d'autres systèmes biogéochimiques impliquant des processus d'altération ou de pseudomorphisation afin d'élucider leurs mécanismes à l'échelle atomique.

La comparaison des transformations à l'échelle atomique d'os fossiles provenant de l'environnement karstique de Bolt's Farm dans le Cradle of Humankind, Afrique du Sud à celles d'os fossiles provenant du contexte volcano-sédimentaire des collines Tugen dans la vallée du rift Gregory au Kenya, a permis de mettre en évidence le rôle de l'environnement sur la nature des transformations diagénétiques subies par l'os. Celles-ci correspondent à la formation d'apatite secondaire comme observé dans le cas des altérations expérimentales. Le fait que la transformation soit limitée à environ 60 % quelle que soit la nature, hydroxylée ou fluorée, de l'apatite secondaire semble confirmer son rôle protecteur suggéré par l'études des

échantillons d'os actuels altérés. Ces résultats soulignent ainsi le potentiel des ossements fossiles à révéler les conditions précoces de fossilisation et montrent que l'étude de leurs transformations diagénétiques peut venir appuyer les reconstitutions paléoenvironnementales basées sur l'analyse de la composition isotopique d'émail dentaire.

Ce travail ouvre plusieurs pistes à explorer. D'une part, les avancées réalisées sur le plan méthodologique et sur les mécanismes de transformation des bioapatites, associées ici à des faunes continentales, pourront être étendues à d'autres contextes de fossilisation et d'autres paléoenvironnements, tels que la fossilisation en milieu océanique ou encore la formation des phosphorites. Ces approches pourront également être appliquées à la problématique de la préservation des échantillons archéologiques et permettre de mieux contraindre les scénarii utilisés pour la datation d'os fossiles. D'autre part, les résultats obtenus sur les échantillons d'os altérés et fossiles quant à la nature partielle du processus de dissolution-recristallisation, à la préservation d'une fraction d'apatite biogénique initiale et ainsi à un potentiel rôle protecteur de l'apatite secondaire, nécessitent d'être étudiés davantage. Ceci notamment dans l'optique de proposer un traitement chimique permettant de dissoudre sélectivement l'apatite secondaire et ainsi espérer accéder à la composition isotopique de l'apatite primaire, mais également dans le cadre de perspectives biomédicales en relation avec l'étude de la réactivité et des propriétés de la couche désordonnée à la surface des cristallites dans l'os frais ou *in vivo*.

Bibliographie

Adams DM, Gardner IR (1974) Single-crystal vibrational spectra of apatite, vanadinite and mimetite. *J Chem Soc Dalton* 14:1505-1509

Allen W.D., Yamaguchi Y., Csaszar A.G., Allen Clabo JR D, Remington R.B., Schaefer H.F. (1990) A systematic study of molecular vibrational anharmonicity and vibration-rotation interaction by self consistent-field higher-derivatives methods. Linear polyatomic molecules. *Chemical Physics* 145 427-466.

Altschuler Z.S., Cisney E.A., Barlow I.H. (1952) X-ray evidence of the nature of carbonate apatite. *Geological Society of America Bulletin* 63, 1230-1231

Ambrose S., Norr L. (1993) Experimental evidence for the relationship of the carbon isotope ratios of whole diet and dietary protein to those of bone collagen and carbonate. In: *Prehistoric human bone archeology at the molecular level*. Eds. Lambert J.B., Grupe G. Springer-verlag, Berlin, 1-37

Amiot, R., Lécuyer, C., Buffetaut, E., Fluteau, F., Legendre, S., Martineau, F. (2004) Latitudinal temperature gradient during the Cretaceous Upper Campanian – Middle Maastrichtian: $\delta^{18}\text{O}$ record of continental vertebrates. *Earth and Planetary Science Letters* 226, 255–272.

Andrew, E. R.; Bradbury, A.; Eades, R. G. (1959) Removal of dipolar broadening of Nuclear Magnetic Resonance spectra of solids by specimen rotation. *Nature* 183, 1802-1803

Antonakos A, Liarokapis E, Leventouri T (2007) Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials* 28:3043-3054

Apfelbaum, F., Diab, H., Mayer, I., Featherstone, J.D.B. (1992) A FTIR study of carbonate in synthetic apatites. *Journal of inorganic biochemistry* 45, 277-282.

Arends, J. and Davidson, C.L. (1974) HPO_4^{2-} content in enamel and artificial carious lesions. *Calcified Tissue Research* 18 65-79.

Arning E., Lückge A., Breuer C., Gussone N., Birgel D., Peckmann J. (2009) Genesis of phosphorite crusts off Peru. *Marine Geology* 262 68-81

Aufort J., Ségalen L., Gervais C., Brouder C., Balan E. (2016) Modeling the attenuated total reflectance infrared (ATR-FTIR) spectrum of apatite. *Physics and Chemistry of Minerals*, 43, 615-626.

Aufort, J., Lebon, M., Gallet, X., Ségalen, L., Gervais, C., Brouder, C., Balan, E. (2018) Macroscopic electrostatic effects in ATR-FTIR spectra of modern and archaeological bones. *American Mineralogist* 103, 326-329

Aufort J., Gervais C., Ségalen L., Labourdette N., Coelho Diogo C., Baptiste B., Beyssac O., Amiot R., Lécuyer C., Balan E. Atomic scale transformation of bone in controlled aqueous alteration experiments. Submitted to *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*

- Ayliffe, L.K., Chivas, A.R., Leakey, M.G., (1994) The retention of primary oxygen isotope compositions of fossil elephant skeletal phosphate. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58, 5291–5298.
- Balan E, Mauri F, Lemaire C, Brouder C, Guyot F, Saitta AM, Devouard B (2002) Multiple ionic plasmon resonances in naturally-occurring multiwall nanotubes: infrared spectra of chrysotile asbestos. *Phys Rev Lett* 89:177401
- Balan E., Lazzeri M., Delattre S., Méheut M., Refson K. and Winkler B. (2007) Anharmonicity of inner OH-stretching modes in hydrous phyllosilicates: assessment from first-principles frozen phonon calculations. *Physics and Chemistry of Minerals* 34 621-625
- Balan E, Delattre S, Guillaumet M, Salje EKH (2010) Low-temperature infrared spectroscopic study of OH stretching modes in kaolinite and dickite. *Am Mineral* 95:1257-1266
- Balan E, Delattre S, Roche D, Segalen L, Morin G, Guillaumet M, Blanchard M, Lazzeri M, Brouder C, Salje EKH (2011) Line-broadening effects in the powder infrared spectrum of apatite. *Phys Chem Miner* 38:111-122
- Bamford M.K., Albert R.M., Cabanes D. (2006) Plio-pleistocene macroplant fossil remains and phytoliths from Lowermost Bed II in the eastern Palaeolake margin of Olduvai Gorge, Tanzania. *Quaternary International* 148, 95-112
- Baroni S., Giannozzi P., Testa A. (1987) Green's function approach to linear response in solids. *Phys Rev Lett* 58 1861
- Baroni S., de Gironcoli S., Dal Corso A., Giannozzi P. (2001) Phonons and related crystal properties from density-functional perturbation theory. *Rev Mod Phys* 73 515-562
- Beasley MM, Bartelink EJ, Taylor L, Miller RM (2014) Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: implications for assessment of bone bioapatite diagenesis. *J Archaeol Sci* 46:16-22
- Becke A.D. (1988) Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior *Phys Rev A* 38 3098-3100
- Berger L.R., de Ruiter D.J., Churchill S.E., Schmid P., Carlson K.J., Dirks P.H.G.M., Kinbbii J.M. (2010) *Australopithecus sediba*: A new species of Homo-like Australopith from South Africa, *Science*, 328, 195-204
- Berger L.R., (2015) *Homo naledi* a new species of the genus *Homo* from the Dinaledi Chamber South Africa. *eLife* 09561
- Berna F., Matthews A., Weiner S. (2004) Solubilities of bone mineral from archaeological site: the recrystallization window. *Journal of Archaeological sites* 31, 867-882
- Bigeleisen J. and Mayer M.G. (1947) Calculation of equilibrium constants for isotopic exchange reactions. *The journal of Chemical Physics*, 15, 261-267
- Bisal F, Hinman WC (1972) A method of estimating the apparent density of soil aggregates. *Can J Soil Sci* 52:513-514

- Bish D.L. and Post J.E. (1989) Modern powder diffraction. Reviews in mineralogy 20, Mineralogical Society of America.
- Blake R.E., O'Neil J.R., Garcia G.A. (1997) Oxygen isotope systematics of biologically mediated reactions of phosphate: I. Microbial degradation of organophosphorous compounds. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61, 4411-4422
- Blake R.E., O'Neil J.R., Surkov A.V. (2005) Biogeochemical cycling of phosphorus: Insights from oxygen isotope effects of phosphoenzymes. *American Journal of Science* 305 596-620
- Blanchard M., Balan E., Schauble E. (2017) Equilibrium fractionation of non-traditional isotopes; a molecular modelling perspective. *Rev Mineral Geochem* 82 27-63
- Bocherens H., Fizet M., Mariotti A., Gangloff R.A., Burns J.A. (1994) Contribution of isotopic biogeochemistry (^{13}C , ^{15}N , ^{18}O) to the palaeoecology of mammoths (*Mammuthus Primigenius*) *Historical Biology* 7, 187-202
- Bocherens H., Billiou D., Patou-Mathis M., Bonjean D., Otte M., Mariotti A. (1997) Paleobiological implications of the isotopic signatures, ^{13}C , ^{15}N , of fossil mammal collagen in Scladina Cave (Sclayn, Belgium). *Quaternary Research* 48, 370-380
- Bocherens H., Drucker D.G., Biliou D., Geneste J.-M., Kezavo B. (2008) Grotte Chauvet (Ardèche, France): A natural experiment for bone diagenesis in karstic context *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 266, 220-226
- Bonel G, Labarthe JC, Vignoles C (1973) Contribution à l'étude structural des apatites carbonates de type B. *Colloq Intern CNRS* 230, 117-125
- Born M. and Huang K. (1954) Dynamical theory of crystal lattices. Oxford University Press, Oxford, UK
- Born M., Wolf E. (1980) Principles of Optics (6th edition). Pergamon Press, New York.
- Boskey A.L. (2007) Mineralization of bones and teeth. *Elements* 3, 387-393
- Bottinga Y. (1967) Calculations of fractionation factors for carbon and oxygen isotopic exchange in the system calcite-carbon dioxide-water. *Journal of Physical Chemistry* 72 800-808
- Bottinga Y. and Craig H. (1969) Oxygen isotope fractionation between CO_2 and water, and the isotopic composition of marine atmospheric CO_2 *Earth Planet Sci Lett* 5 285-295
- Boulet-Audet M., Buffeteau T., Boudreault S., Daugey N., Pézolet M. (2010) Quantitative determination of band distortions in diamond attenuated total reflectance infrared spectra. *Journal of Physical Chemistry B*, 114, 8255-8261.
- Bowen G.J. et Wilkinson B. (2002) Spatial distribution of $\delta^{18}\text{O}$ in meteoric precipitation. *Geology* 30, 315-318
- Brenan, J., 1994. Kinetics of fluorine, chlorine and hydroxyl exchange in fluorapatite (1994) *Chemical geology* 110, 195-210.
- Bruesch P (1986) Phonons : Theory and Experiments II – Infrared Spectroscopy. Springer 65 p8-64

- Bruggeman DAG (1935) Berechnung verschiedener physikalischer Konstanten von heterogenen Substanzen. I. Dielektrizitätskonstanten und Leitfähigkeiten der Mischkörper aus isotropen Substanzen. *Annalen der Physik* 416, 665-679
- Bryant J.D., Koch P.L., Froelich P.N., Showers W.J., Genna B.J. (1996) Oxygen isotope partitioning between phosphate and carbonate in mammalian apatite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 60 5145-5148
- Carlson S.J. (1990) Vertebrate dental structures. In: *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes, and Evolutionary Trends*. Ed Carter J.G. American Geophysical Union 235-260
- Cazalbou S, Combes C, Eichert D, Rey C (2004) Adaptive physico-chemistry of bio-related calcium phosphates. *Journal of Materials Chemistry* 14, 2148-2153
- Cerling T.E. and Quade J. (1993) Stable carbon and oxygen isotopes in soil carbonates. In: *Climate change in continental isotopic records*. Swart P.K., Lohmann K.C., McKenzie J., Savin S. Eds. American Geophysical Union 217-231
- Cerling T.E. et Harris J.M. (1999) Carbon isotope fractionation between diet and bioapatite in ungulate mammals and implications for ecological and palaeoecological studies. *Oecologia* 120, 346-363
- Cerling, T.E., Harris, J.M., Leakey, M.G., (1999) Browsing and grazing in elephants: the isotope record of modern and fossil proboscideans. *Oecologia* 120, 364–374.
- Chacko T., Mayeda T.K., Clayton R.N., Goldsmith J.R. (1991) Oxygen and carbon isotope fractionations between CO₂ and calcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 55 2867-2882
- Chacko T., Cole D.R., Horita J. (2001) Equilibrium oxygen, hydrogen and carbon isotope fractionation factors applicable to geologic systems. In Valley JW, Cole DR, Eds., *Stable isotope geochemistry*, vol 43, p. 1-62. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Mineralogical Society of America, Chantilly, Virginia
- Chadefaux, C., Le Hô, A.-S., Bellot-Gurlet, L., Reiche, I., 2009. Curve-fitting micro-ATR-FTIR studies of the amide I and II bands of type I collagen in archaeological bone materials. *E-Preservation Science* 6, 129–137.
- Chadi D.J. and Cohen M.L. (1973) Special points in the Brillouin Zone. *Physical Review B* 8 5747-5753
- Chang S.J. and Blake R.E. (2015) Precise calibration of equilibrium oxygen isotope fractionations between dissolved phosphate and water from 3 to 37°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 150 314-329
- Cherkaeva E., Golden K.M. (1998) Inverse bounds for microstructural parameters of composite media derived from complex permittivity measurements. *Wave Random Media* 8(4):437–450
- Chevrinais M, Balan E, Cloutier R (2016) New insights in the ontogeny and taphonomy of the devonian acanthodian *Triazeugacanthus affinis* from the Miguasha Fossil-Lagerstätte, Eastern Canada. *Minerals* 6, 1-17
- Cho, G., Wu, Y., Ackerman, J.L., 2003. Detection of hydroxyl ions in bone mineral by solid-state NMR spectroscopy. *Science* 300, 1123-1127

- Chu N.-C., Henderson G.M., Belshaw N.S. et al. (2006) Establishing the potential of Ca isotopes as proxy for consumption of dairy products. *Applied Geochemistry* 21, 1656-1667
- Colla C.A., Wipenny J., Yin Q.-Z., Rustad J.R., Casey W.H. (2013) Calcium isotope fractionation between solution and solids with six, seven or eight oxygens bound to Ca(II). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 121 363-373
- Collins M.J., Riley M.S., Child A.M., Turner-Walker G. (1995) A basic mathematical simulation of the chemical degradation of ancient collagen. *Journal of Archaeological Science* 22, 175-183
- Coplen T.B., Kendall C., Hopple J. (1983) Comparison of stable isotope reference samples. *Nature* 302, 236-238
- Crowson, R.A., Showers, W.J., Wright, E.K., Hoering, T.C., 1991. Preparation of phosphate samples for oxygen isotope analysis. *Anal Chem* 63, 2397–2400
- Currey J.D. (2004) Tensile yield in compact bone is determined by strain, post-yield behaviour by mineral content. *Journal of Biomechanics* 37: 549-556
- Dal Sasso G., Lebon M., Angelini I., Maritan L., Usai D., Artioli G. (2016) Bone diagenesis variability among multiple burial phases at Al Khiday (Sudan) investigated by ATR-FTIR spectroscopy. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 463 168-179
- Dansgaard W. (1964) Stable isotopes in precipitation. *Tellus* 16, 435-468
- Dauphin Y. et Williams C.T. (2007) The chemical compositions of dentine and enamel from recent reptile and mammal teeth – variability in the diagenetic changes of fossil teeth. *Cryst Eng Comm* 9, 1252-1261
- De Groot P.A. (2004) *Handbook of stable isotope analytical techniques Volume I*. Elsevier Science pp. 1258
- De La Rocha C.L. and DePaolo D.J. (2000) Isotopic evidence for variations in the marine calcium cycle over the Cenozoic. *Science* 289 1176-1178
- DeNiro, M.J., Epstein, S. (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42, 495–506.
- Driessens F.C.M., Verbeeck R.M.H., Heijligers H.J.M. (1983) Some physical properties of Na and CO₃ containing apatites synthesized at high temperatures. *Inorganica Chimica Acta* 80, 19-23
- Drouet C., Aufray M., Rollin-Martinet S., Vandecandelaère N., Grossin D., Rossignol F., Champion E., Navrotsky A., Rey c. (2018) Nanocrystalline apatites: the fundamental role of water. *American Mineralogist* 103, 550-564
- Dupuis R., Benior M., Nardin E., Méheut M. (2015) Fractionation of silicon isotopes in liquids: The importance of configurational disorder. *Chemical Geology* 396 239-254
- Ehleringer J.R., Sage R.F., Flanagan L.B., Pearcy R.W. (1991) Climate change and the evolution of C4 photosynthesis. *Trends in Ecology and Evolution* 6, 95-99

Ehleringer J.R., Cerling T.E., Helliker B.R. (1997) C4 photosynthesis, atmospheric CO₂ and climate. *Oecologia* 112, 285-299

Elliott J.C. (1964) The crystallographic structure of dental enamel, related apatites. PhD thesis, University of London

Elliott J.C. (2002) Calcium phosphate biominerals. In MJ Kohn, J Rakovan, and JM Hughes, Eds., *Phosphates-Geochemical, geobiological and materials importance*, vol 48, p. 427-453. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Mineralogical Society of America and Geochemical society, Chantilly, Virginia

Eppell S.J., Tong W., Katz J.L., Kuhn L., Glimcher M.J. (2001) Shape and size of isolated bone mineralites measured using atomic force microscopy. *Journal of Orthopaedic Research* 19, 1027-1034

Fantle M.S. and DePaolo D.J. (2007) Ca isotopes in carbonate sediment and pore fluids from ODP Site 807A: the Ca²⁺(aq)-calcite equilibrium fractionation factor and calcite recrystallization rates in Pleistocene sediments. *Geochem Cosmochem Acta* 71 2524-2546

Fantle M.S. and Tipper E.T. (2014) Calcium isotopes in the global biogeochemical Ca cycle: implications for the development of a Ca isotope proxy. *Earth-Science reviews* 129 148-177

Farkas J., Böhm F., Wallmann K., Blenkinsop J., Eisenhauer A., van Geldern R., Munnecke A., Voigt S., Veizer J. (2007) *Geochem Cosmochem Acta* 71 5117-5134

Farmer V.C. (1974) *The infrared spectra of minerals*. Mineralogical Society Monograph 4 , London

Favot F. and Dal Corso A. (1999) Phonon dispersions: performance of the generalized gradient approximation. *Phys Rev B* 60(16) 427-431

Feynman R.P. (1939) Forces in Molecules. *Phys Rev* 56 340-343

Filippelli G.M. (2002) The global phosphorus cycle. In MJ Kohn, J Rakovan, and JM Hughes, Eds., *Phosphates-Geochemical, geobiological and materials importance*, vol 48, p. 391-426. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Mineralogical Society of America and Geochemical society, Chantilly, Virginia

Fleet M.E., Liu X. (2007) Coupled substitution of type A and B carbonate in sodium-bearing apatite. *Biomaterials* 28, 917–926

Fleet M.E., Liu X. (2008) Accommodation of the carbonate ion in fluorapatite synthesized at high pressure. *Am Mineral* 93:1460-1469

Fleet M.E. (2009) Infrared spectra of carbonate apatites: ν_2 -region bands. *Biomaterials* 30:1473-1481

Fleger S.L., Heckman J.W., Klomparens K.L. (1993) *Scanning and transmission electron microscopy: An introduction*, First Edition, Oxford University Press, USA

Fortier SM and Lüttge A (1995) An experimental calibration of the temperature dependence of oxygen isotope fractionation between apatite and calcite at high temperatures (350-800°C). *Chemical Geology* 125 281-290

- Fricke, H.C., Clyde, W.C., O'Neil, J.R. (1998) Intra-tooth variations in $\delta_{18}\text{O}$ (PO_4) of mammalian tooth enamel as a record of seasonal variations in continental climate variables. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62, 1839-1850.
- Fricke, H.C., O'Neil, J.R. (1999) The correlation between $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios of meteoritic water and surface temperature: its use in investigating terrestrial climate change over geological time. *Earth and Planetary Science Letters* 170, 181-196
- Frydman, L., Harwood, J. S. (1995) Isotropic Spectra of Half-Integer Quadrupolar Spins from Bidimensional Magic-Angle-Spinning NMR. *Journal of the American Chemical Society* 117, 5367-5368.
- Gadenne M, Lafait J, Gadenne P. (1989) Infrared absorption of Au-Al₂O₃ thin cermet films: experiment, Bruggeman model, far and near the percolation threshold. *Physica A* 157:400-406
- Garnett JCM (1904) Colours in metal glasses and metallic films. *Philos Trans R Soc A* 203:385-420
- Garvie-Lok S.J., Varney T.L., Katzenberg M.A. (2004) Preparation of bone carbonate for stable isotope analysis: the effects of treatment time and acid concentration. *Journal of Archaeological Science* 31, 763-776
- Gat J.R. (1996) Oxygen and hydrogen isotopes in the hydrologic cycle. *Annual Revue of Earth and Planetary Science* 24, 225-262
- Gehler A., Tütken T., Pack A. (2011) Triple oxygen isotope analysis of bioapatite as tracer for diagenetic alteration of bones and teeth. *Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology* 210 84-91
- Geisler, T., Perdikouri, C., Kasiotas, A., Dietzel, M. (2012) Real-time monitoring of the overall exchange of oxygen isotopes between aqueous CO_3^{2-} and H_2O by Raman spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 90, 1-11
- Giannozzi P. et al. (2009) Quantum ESPRESSO: a modular and open-source software project for quantum simulations of materials. *J Phys Condens Matter* 21:395502
- Glimcher MJ (2006) Bone: Nature of the calcium phosphate crystals and cellular, structural, and physical chemical mechanisms in their formation. In: Sahai N, Schoonen MAA (eds) *Medical Mineralogy and Geochemistry. Reviews in Mineralogy & Geochemistry* 64, pp 223-282
- Gommery D., Badenhorst S., Potze S., Sénégas F., Kgasi L., Thackeray J.F. (2012) Preliminary results concerning the discovery of new fossiliferous sites at Bolt's farm (Cradle of Humankind, South Africa). *Annals of the Ditsong National Museum of Natural History* 2, 33-45
- Gommery D, Sénégas F, Potze S., Kgasi L. (2014a) Les primates non-humains fossiles de Bolt's Farm (Afrique du Sud). Contexte, recherches actuelles et perspectives. *Bull Mém Soc Anthropol Paris* 26, 184-189
- Gommery D, Sénégas F, Potze S, Kgasi L., Thackeray JF. (2014b). Cercopithecoidea material from the Middle Pliocene site, Waypoint 160, Bolt's Farm, South Africa. *Ann Dits Natl Mus Nat Hist* 4:1-8

- Gommery D., Thackeray F., Sénégas F., Potze S., Kgasi L. (2008) The earliest primate (*Parapapio* sp.) from the Cradle of Humankind World Heritage Site (Waypoint 160, Bolt's Farm, South Africa). *South African Journal of Science*, AOSIS, 104 (9/10), pp.405-408.
- Gommery D., Sénégas F., Kgasi L., Vilakazi N., Kuhn B., Brink J., Pickford M., Herries A.I.R., Hancox J., Saos T., Ségalen L., Aufort J., Thackeray J.F. (2016) Bolt's Farm Cave System dans le Cradle of Humankind (Afrique du Sud) : un exemple d'approche multidisciplinaire dans l'étude des sites à primates fossils. *Revue de primatologie* 7, 2725
- Gonze X (1995) Adiabatic density-functional perturbation theory. *Phys Rev A* 52 1096
- Gonze X. and Lee C. (1997) Dynamical matrices, Born effective charges, dielectric permittivity tensors, and interatomic force constants from density functional perturbation theory. *Phys Rev B* 55 10355-10368
- Graf D.L. (1961) Crystallographic tables for the rhombohedral carbonates. *American Mineralogist* 46 1283-1316
- Griffith E.M., Schauble E.A., Bullen T.D., Paytan A. (2008) Characterization of calcium isotopes in natural and synthetic barite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72 5641-5658
- Gussone N., Böhm F., Eisenhauer A., Dietzel M., Heuser A., Teichert B.M.A., Reitner J., Wörheide G., Dullo W.-C. (2005) Calcium isotope fractionation in calcite and aragonite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69 4485-4494
- Gussone N., Schmitt A.-D., Heuser A., Wombacher F., Dietzel M., Tipper E., Schiller M. (2016) *Calcium Stable Isotope Geochemistry* Springer Berlin Heidelberg pp. 260
- Hackett C.J. (1981) Microscopical focal destruction (tunnels) in exhumed human bones. *Medicine, Science and the Law* 21, 243-265
- Hamann D.R. (2013) Optimized norm-conserving Vanderbilt pseudopotentials. *Phys Rev B* 88 085117
- Hankermeyer C.R., Ohashi K.L., Delaney D.C., Ross J., Constantz B.R. (2002) Dissolution rates of carbonated hydroxyapatite in hydrochloric acid. *Biomaterials* 23, 743-750.
- Harries J.E., Hasnain S.S., Shah J.S. (1987) EXAFS study of structural disorder in carbonate-containing hydroxyapatites. *Calcified Tissue International* 41, 346-350
- Harrison R.G. et Katzenberg M.A. (2003) Paleodiet studies using stable carbon isotopes from bone apatite and collagen: examples from Southern Ontario and San Nicolas Island, California. *Journal of Anthropological Archaeology*, 22 227-244
- Heaton T.H.E. (1999) Spatial, species and temporal variations in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of C3 plants: implications for palaeodiet studies. *Journal of Archaeological Science* 26, 637-649
- Hedges R. E. M. and Law I. A. (1989) The radiocarbon dating of bone. *Applied Geochemistry* 4, 249-53
- Hedges R. E. M., Lee-Thorp J.A., Tuross N.C. (1995a) Is tooth enamel carbonate a suitable material for radiocarbon dating? *Radiocarbon* 37, 285-290

- Hedges R. E. M., Millard A. R., Pike A. W. G. (1995b) Measurements and relationships of diagenetic alteration of bone from three archaeological sites. *Journal of Archaeological Science* 22, 201-209
- Hedges R.E.M. (2002) Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry*, 44, 319–28
- Hedges R.E.M., Clement J.G., Thomas C.D., O’Connell T.C. (2007) Collagen turnover in the adult femoral mid-shaft: modelled from anthropogenic radiocarbon tracer measurements. *American Journal of Physical Anthropology* 133, 808-816
- Hellmann H. (1937) Einführung in die Quantenchemie. Deuticke, Leipzig p. 285
- Hellwege K.H., Lesch W., Plihal M., Schaack G. (1970) Zwei-Phononen-Absorptionsspektrum und Dispersion der Schwingungszweige in Kristallen der Kalkspatstruktur. *Z Physik* 232 61-86
- Heuser A., Eisenhauer A., Böhm F., Wallmann K., Gussone N., Pearson P.N., Nägler T.F., Dullo W.;-C. (2005) Calcium isotope ($\delta^{44}/^{40}\text{Ca}$) variations of Neogene planktonic foraminifera. *Paleoceanography* 20 PA2013 doi:10.1029/2004PA001048
- Heuser A., Tütken T. and Galer S.J.G. (2009) Calcium isotope systematics of dinosaur teeth. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73(Suppl. 1) A528
- Heuser A., Tütken T., Gussone N. and Galer S.J.G. (2011) Calcium isotopes in fossil bones and teeth - Diagenetic versus biogenic origin *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75 3419-3433
- Hohenberg R. and Kohn W. (1964) Inhomogeneous electron gas. *Phys Rev*, 136 B864-B871
- Horita J. and Wesolowski D.J. (1994) Liquid-vapor fractionation of oxygen and hydrogen isotopes of water from the freezing to the critical temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58: 3425-3437.
- Horita J, Cole DR, Polyakov VB, Driesner T (2002) Experimental and theoretical study of pressure effects on hydrogen isotope fractionation in the system brucite-water at elevated temperatures. *Geochim Cosmochim Acta* 66:3769–3788
- Huang S.-J., Tsai Y.-L., Lee Y.-L., Lin C.-P., Chan J.C.C. (2009) Structural model of rat dentin revisited. *Chem Mater* 21, 2583-2585
- Hubert J.F., Panish P.T., Chure D.J., Probst K.S. (1996) Chemistry, microstructure, petrology and diagenetic model of Jurassic dinosaur bones, dinosaur national monument, Utah. *Journal of Sedimentary Research* 66, 531-547
- Hughes J.M., Cameron M., Crowley K.D. (1989) Structural variations in natural F, OH and Cl apatites. *American Mineralogist* 74, 870-876
- Hughes J.M., Cameron M., Crowley K.D. (1990) Crystal structures of natural ternary apatites: solid solution in the $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$ (X=F, OH, Cl) system. *American Mineralogist* 75 295-304
- Hut, G. (1987) Consultants’ group meeting on stable isotope reference samples for geochemical and hydrological investigations. Accessible at : http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/18/075/18075746.pdf.

- Iacumin P., Bocherens H., Mariotti A. and Longinelli A. (1996) Oxygen isotope analyses of co-existing carbonate and phosphate in biogenic apatite: A way to monitor diagenetic alteration of bone phosphate? *Earth Planet. Sci. Lett.* 142 1-6
- Iglesias, J.E., Ocana, M., Serna, C.J. (1990) Aggregation and matrix effects on the infrared spectrum of microcrystalline powders. *Applied Spectroscopy* 44, 418-426
- Ito A, Maekawa K, Tsutsumi S, Ikazaki F, Tateishi T (1997) Solubility product of OH-carbonated hydroxylapatite. *Journal of Biomedical Materials Research* 36, 522-528
- Ivanova TI, Frank-Kamenetskaya OV, Kol'tsov V, Ugolkov L (2001) Crystal structure of calcium-deficient carbonated hydroxyapatite. Thermal decomposition. *Journal of Solid state Chemistry* 160, 340-349
- Jancso G, Rebelo LPN, Van Hook WA (1993) Isotope effects in solution thermodynamics: Excess properties in solutions of isotopomers. *Chem Rev* 93:2645–2666
- Jim S., Ambrose S., Evershed R.P. (2004) Stable carbon isotopic evidence for differences in the dietary origin of bone cholesterol, collagen and apatite: implications for their use in palaeodietary reconstructions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, 61-72
- Kaflak, A., and Kolodziejcki, W. (2008) Kinetics H-1 -> P-31 NMR cross-polarization in bone apatite and its mineral standards. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 46, 335-341
- Katzenberg M.A., McKenzie H.G., Losey R.J., Goriunova O.I., Weber A. (2012) Prehistoric dietary adaptations among hunter-fisher-gatherers from the Little Sea of Lake Baikal, Siberia, Russian Federation. *Journal of Archaeological Science* 39, 2612-2626
- Keenan, S.W., Engel, A.S., Roy, A., Bovenkamp-Langlois, G.L. (2015) evaluating the consequences of diagenesis and fossilization on bioapatite lattice structure and composition. *Chemical geology* 413, 18-27
- Keenan S.W. et Engel A.S. (2017) Early diagenesis and recrystallization of bone. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 196, 209-223
- Kellner C.M. et Schoeninger M.J. (2007) A simple carbon isotope model for reconstructing prehistoric human diet. *American Journal of Physical Anthropology* 133, 1112-1127
- Kendrick J., Burnett A.D. (2016) PDielec: the calculation of infrared and terahertz absorption for powdered crystals. *J Comput Chem* 37:1491–1504
- Khachkuruzov G.A. (1959) *Gos. Inst. Prikl. Khim.* 42 51-131
- Kim S.-T. and O'Neil J.R. (1997) Equilibrium and nonequilibrium oxygen isotope effects in synthetic carbonates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61 3461-3475
- Kim, S.-T., Mucci, A., Taylor, B.E. (2007) Phosphoric acid fractionation factors for calcite and aragonite between 25 and 75°C: Revisited. *Chemical Geology* 246, 135-146
- Kingston, J.D., Harrison, T. (2007) Isotopic dietary reconstructions of Pliocene herbivores at Laetoli: implications for early hominin Paleoeology. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 243, 272–306.

- Klee WE (1970) The vibrational spectra of the phosphate ions in fluorapatite. *Z Kristallogr* 131:95-102
- Knudsen A.C. and Gunter M.E. (2002) Sedimentary phosphorites – An example: Phosphoria formation, Southeastern Idaho USA. In Kohn MJ, Rakovan J, and Hughes JM, Eds., *Phosphates - Geochemical, geobiological and materials importance*, vol 48, p. 363-390. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Mineralogical Society of America and Geochemical Society, Chantilly, Virginia
- Koch P.L. (1998) Isotopic reconstruction of past continental environments. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 26, 573-613
- Kohn M.J., Schoeninger M.J., Valley J.W. (1996) Herbivore tooth oxygen compositions: effects of diet and physiology *Geochim. Cosmochim. Acta* 60 3889–3896
- Kohn M.J., Schoeninger M.J., Barker W.W. (1999) Altered states: Effects of diagenesis on fossil tooth chemistry. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63, 2737-2747
- Kohn M.J. and Cerling T.E. (2002) Stable isotope compositions of biological apatite. In Kohn MJ, Rakovan J, and Hughes JM, Eds., *Phosphates - Geochemical, geobiological and materials importance*, vol 48, p. 455-488. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Mineralogical Society of America and Geochemical Society, Chantilly, Virginia
- Kohn M.J., Law J.M. (2006) Stable isotope chemistry of fossil bone as a new paleoclimate indicator. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 931-946
- Kohn M.J. (2008) Models of diffusion-limited uptake of trace elements in fossils and rates of fossilization. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 3758-3770
- Kohn M.J. (2010) Carbon isotope compositions of terrestrial C3 plants as indicators of (paleo)ecology and (paleo)climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 19691-19695.
- Kohn M.J. and Moses R.J. (2013) Trace element diffusivities in bone rule out simple diffusive uptake during fossilization but explain in vivo uptake and release. *Proc Natl Acad Sci* 110 419-424
- Kohn W. and Sham L. (1965) Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Phys Rev* 385 A1133-A1138
- Kolodny Y., Luz B. and Navon O. (1983) Oxygen isotope variations in phosphate of biogenic apatites: I. Fish bone apatite - rechecking the rules of the game. *Earth Planet Sci Lett* 64 398-404
- Kolodny Y., Luz B., Sander M., Clemens W.A. (1996) Dinosaur bones: fossils or pseudomorphs? The pitfalls of physiology reconstruction from apatitic fossils. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 126 161-171
- Kourkoumelis, N., Balatsoukas, I., Tzaphlidou, M. (2012) Ca/P concentration ratio at different sites of normal and osteoporotic rabbit bones evaluated by auger and energy dispersive X-ray spectroscopy. *Journal of Biological Physics* 38, 279-291

- Kroopnick P. and Craig H. (1972) Atmospheric oxygen: Isotopic composition and solubility fractionation. *Science* 175, 54-55.
- Krueger, H.W., Sullivan, C.H. (1984) Models for carbon isotope fractionation between diet and bone. In: Turnlund, J.F., Johnson, P.E. (Eds.), *Stable Isotopes in Nutrition*. ACS Symposium Series 258, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 205–222.
- Landauer R (1978) Electrical conductivity in inhomogeneous media. *AIP Conf Proc* 40:2-45
- Lang L, Kirsimäe K, Vahur S (2016) Diagenetic fate of bioapatite in linguliform brachiopods: multiple apatite phases in shells of Cambrian lingulate brachiopod *Ungula ingraca* (Eichwald). *Lethaia* 49:13-27
- Lazarev (1974) The dynamics of crystal lattices. In: V.C. Framer (Ed.) *The infrared spectra of minerals*. Mineralogical Society, London, pp. 51-67
- Lazzeri M., Mauri F. (2003) First-principles calculation of vibrational Raman spectra in large systems: signature of small rungs in crystalline SiO₂. *Physical Review Letters* 90, 036401
- Lebon M, Zazzo A, Reiche I (2014) Screening in situ bone and teeth preservation by ATR-FTIR mapping. *Palaeogeogr, Palaeoclimatol* 416:110–119
- Lebon M., Reiche I., Gallet X., Bellot-Gurlet., Zazzo. A. (2016) Rapid quantification of bone collagen content by ATR-FTIR spectroscopy. *Radiocarbon*, 58, 131-145
- Lécuyer, C., Grandjean, P., O'Neil, J.R., Cappetta, H., Martineau, F. (1993) Thermal excursions in the ocean at the Cretaceous—Tertiary boundary (northern Morocco): $\delta^{18}\text{O}$ record of phosphatic fish debris. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 105, 235-243
- Lécuyer C., Grandjean P., Sheppard S.M.F. (1999) Oxygen isotope exchange between dissolved phosphate and water at temperatures $\leq 135^\circ\text{C}$: Inorganic versus biological fractionations. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63 855-862
- Lécuyer C., Balter V., Martineau F., Fourel F., Bernard A., Amiot R., Gardien V., Otero O., Legendre S., Panczer G., Simon L., Martini R. (2010) Oxygen isotope fractionation between apatite-bound carbonate and water determined from controlled experiments with synthetic apatites precipitated at 10-37°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74: 2072-2081
- Lee C., Yang W., Parr R.G. (1988) Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B* 37 785-789
- Lee-Thorp J.A. and van der Merwe N.J. (1987) Carbon isotope analysis of fossil bone apatite. *South Afr J Sci* 83 712-715
- Lee-Thorp, J.A., Sealy, J.C., van der Merwe, N.J. (1989) Stable carbon isotope ratio differences between bone collagen and bone apatite, and their relationship to diet. *Journal of Archaeological Science* 16, 585–599.
- Lee-Thorp J.A. and van der Merwe N.J. (1991) Aspects of the chemistry of modern and fossil biological apatites. *Journal of Archaeological Science* 18, 343-354
- Lee-Thorp, J.A., Sponheimer, M. (2003) Three case studies used to reassess the reliability of fossil bone and enamel isotope signals for paleodietary studies. *J. Anthropol. Archaeol.* 22, 208–216.

- Lee-Thorp, J.A. (2008) On isotopes and old bones. *Archaeometry* 50, 925-950
- LeGeros R.Z., Trautz O.R., Klein E., LeGeros J.P. (1969) Two types of carbonate substitution in the apatite structure. *Experientia* 25, 5-7
- LeGeros R.Z., LeGeros J.P. (1984) Phosphate minerals in human tissue. In: Nriagu J.O., Moore P.B. (eds) *Phosphate Minerals*. Springer-Verlag, New York, pp 351-395
- LeGeros, R.Z. (1991) *Calcium phosphates in oral biology and medicine*, Karger, Paris
- Lemarchand D., Wasserburg G.J., Papanastassiou D.A. (2004) Rate-controlled calcium isotope fractionation in synthetic calcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68 4665-4678
- Leroy G, Leroy N, Penel G, Rey C, Laforgue P, Bres E (2000) Polarized micro-Raman study of fluorapatite single crystals. *Appl Spectrosc* 54(10):1521-1527
- Leventouri T., Chakoumakos B.C., Moghaddam H.Y., Perdikatsis V. (2000) Powder neutron diffraction studies of a carbonate fluorapatite. *J Mater Res* 15:511-517
- Leventouri T. (2006) Synthetic and biological hydroxyapatites: Crystal structure questions. *Biomaterials* 27, 3339-3342
- Levin, N.E., Cerling, T.E., Passey, B.H., Harris, J.M., Ehleringer, J.R. (2006) A stable isotope aridity index for terrestrial environments. *Proceedings of the National Academy of Science* 103, 11201–11205.
- Levy O., Stroud D. (1997) Maxwell Garnett theory for mixtures of anisotropic inclusions: Application to conducting polymers. *Phys Rev B* 56:8035-8046
- Lowe, I. J. (1959) *Phys. Rev. Lett.*, 2, 285
- Li Z., Pasteris J. D. (2014). Chemistry of bone mineral, based on the hypermineralized rostrum of the beaked whale *Mesoplodon densirostris*. *American Mineralogist*, 99, 645–653
- Liang Y. and Blake R.E. (2007) Oxygen isotope fractionation between apatite and aqueous-phase phosphate: 20-45°C *Chemical Geology* 238 121-133
- Lide D.R. (1998) *CRC Handbook 79th edition* CRC Press, London, pp 9-76
- Longinelli A. (1965) Oxygen isotopic composition of orthophosphate from shells of living marine organisms. *Nature* 207 716-719
- Longinelli A. (1984) Oxygen isotopes in mammal bone phosphate: a new tool for paleohydrological and paleoclimatological research? *Geochim. Cosmochim. Acta* 48 385–390
- Loong, C.-K., Rey, C., Kuhn, T., Combes, C., Wu, Y., Chen, S.-H., Glimcher, M.J. (2000) Evidence of hydroxyl ion deficiency in bone apatites: an inelastic neutron scattering study. *Bone* 26, 599-602
- Lucas J., Prevot L., Benalioulhaj N., El-Faleh E. (1987) Relation between sodium and apatite in sedimentary phosphorites of Morocco. *Terra Cognita* 1, 19-41
- Marriott C.S., Henderson G.M., Belshaw N.S., Tudhope A.W. (2004) Temperature dependence of $\delta^{7}\text{Li}$, $\delta^{44}\text{Ca}$, and Li/Ca during growth of calcium carbonate. *Earth Planet Sci Lett* 222 615-624

- Martin C., Bentaleb I., Kaandorp, Iacumin P., Chatri K. (2008) Intra-tooth study of modern rhinoceros enamel $\delta^{18}\text{O}$: Is the difference between phosphate and carbonate $\delta^{18}\text{O}$ a sound diagenetic test? *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 266 183-189
- Mason HE, Kozlowski A, Phillips BL (2008) Solid-state NMR study of the role of H and Na in AB-type carbonate apatite. *Chem Mat* 20, 294–302
- Mason HE, McCubbin FM, Smirnov A, Phillips BL (2009) Solid-State NMR and IR spectroscopic investigation of the role of structural water and F in carbonate-rich fluorapatite. *American Mineralogist* 94, 507–516
- Maurer, A.F., Gerard, M., Person, A., Barrientos, I., del Carmen Ruiz, P., Darras, V., Durllet, C., Zeitoun, V., Renard, M., Faugère, B. (2011) Intra-skeletal variability in trace elemental content of Precolumbian Chupicuaro human bones: the record of post-mortem alteration and a tool for palaeodietary reconstruction. *Journal of Archaeological Science* 38, 1784-1797
- Maurer A.-F., Person A., Zazzo A., Sébilo M., Balter V., Le Cornec F., Zeitoun V., Dufour E., Schmidt A., de Raféls M., Ségalen L., Bedaux R. (2017) Geochemical identity of pre-Dogon and Dogon populations at Bandiagara (Mali 11th-20th cent. AD). *Journal of Archaeological Science: Reports* 14, 289-301
- McClellan G.H. and Lehr J.R. (1969) Crystal-chemical investigation of natural apatites. *American Mineralogist*, 54, 1374-1391
- McConnell D. (1973) Apatite: Its crystal chemistry, mineralogy, utilization and geologic and biologic occurrences. Springer Verlag, New York pp 111
- McMillan P.F. and Hofmeister A. (1988) Infrared and Raman spectroscopy. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 18, 99-159
- Méheut M., Lazzeri M., Balan E., Mauri F. (2007) Equilibrium isotopic fractionation in the kaolinite, quartz, water system: Prediction from first principles density-functional theory. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71 3170-3181.
- Méheut M., Lazzeri M., Balan E., Mauri F. (2009) Structural control over equilibrium silicon and oxygen isotopic fractionation: A first-principles density-functional theory study. *Chemical Geology* 258 28-37
- Messenger E., Lordkipanidze D., Kvavadze E., Ferring C.R., Voichet P. (2010) Palaeoenvironmental reconstruction of Dmanisi site (Georgia) based on palaeobotanical data. *Quaternary International* 223-224, 20-27
- Meyer H-W, Carpenter MA, Becerro AI, Seifert F (2002) Hard-mode infrared spectroscopy of perovskites across the CaTiO_3 - SrTiO_3 solid solution. *Am Mineral* 87:1291-1296
- Michel V., Ildefonse P., Morin G. (1995) Chemical and structural changes in Cervus Elaphus tooth enamels during fossilisation (Lazaret Cave): a combined IR and XRD Rietveld analysis. *Applied Geochemistry* 10, 145-159
- Michel V., Ildefonse P., Morin G. (1996) Assessment of archaeological bone and dentine preservation from Lazaret Cave (Middle Pleistocene) in France. *Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology* 126, 109-119

- Millard A.R. et Hedges R.E.M. (1995) The role of the environment in uranium uptake by buried bone. *Journal of Archaeological Science* 22, 239-250
- Millard, A.R., Hedges, R.E.M. (1996) A diffusion-adsorption model of uranium uptake by archaeological bone. *Geochim Cosmochim Acta* 60, 2139–2152.
- Monkhorst H.J. and Pack J.D. (1976) Special points for Brillouin-zone integrations. *Phys Rev B* 13 5188-5192
- Montel G. (1971) Sur les structures de quelques apatites d'intérêt biologique et leurs imperfections. *Bulletin de la Société Française de Minéralogie et Cristallographie* 94, 300-313
- Morin G, Allard T, Balan E, Ildefonse P, Calas, G (2002) Native Cd⁺ in sedimentary fluorapatite. *Eur J Mineral* 14:1087-1094
- Moynier F. and Fujii T. (2017) Calcium isotope fractionation between aqueous compounds relevant to low-temperature geochemistry, biology and medicine. *Scientific Reports* 7 44255
- Nakano, T., Tokumura, A., Umahoshi, Y. (2002) Variation in crystallinity of hydroxyapatite and the related calcium phosphates by mechanical grinding and subsequent heat treatment. *Metallurgical and Materials transactions A* 33, 521-528.
- Nasdala L. Smith D., Kaindl R., Ziemann M. (2004) Raman spectroscopy: analytical perspectives in mineralogical research. In *Spectroscopic Methods in Mineralogy*, A. Beran and E. Libowitzky, eds EMU Notes in Mineralogy, 6, 281-343
- Nielsen-Marsh, C. M. & Hedges, R. E. M. (1997). Dissolution experiments on modern and diagenetically altered bone and their effect on the infrared splitting factor. *Bulletin de la Société Géologique Française* 168, 485–490
- Nielsen-Marsh C.M. et Hedges R.E.M. (2000) Patterns of diagenesis in bone I: The effect of site environments. *Journal of Archaeological Science* 27, 1139-1150
- Nokhrin SM, Pan Y, Nilges MJ (2006) Electron paramagnetic resonance spectroscopic study of carbonate-bearing fluorapatite: new defect centers and constraints on the incorporation of carbonate ions in apatites. *American Mineralogist* 91, 1425–1431
- Nounah A, Lacout JL (1993) Thermal behavior of cadmium containing apatites. *J Solid State Chem* 107:444-451
- Nyman, J.S., Ni, Q., Nicolella, D.P., and Wang, X. (2008) Measurements of mobile and bound water by nuclear magnetic resonance correlate with mechanical properties of bone. *Bone*, 42, 193-199
- O'Leary M.H. (1981) Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* 20, 553-567
- Pack A., Gehler A., Süssenberger A. (2013) Exploring the usability of isotopically anomalous oxygen in bones and teeth as paleo-CO₂-barometer. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 102 306-317
- Pan Y. and Fleet M.E. (2002) Compositions of the apatite-group minerals: Substitution mechanisms and controlling factors. In MJ Kohn, J Rakovan, and JM Hughes, Eds., *Phosphates-Geochemical, geobiological and materials importance*, vol 48, p. 13-49. Reviews

in Mineralogy and Geochemistry, Mineralogical Society of America and Geochemical society, Chantilly, Virginia

Passey, B.H., Robinson, T.F., Ayliffe, L.K., Cerling, T.E., Sponheimer, M., Dearing, M.D., Roeder, B.L., Ehleringer, J.M. (2005) Carbon isotope fractionation between diet, breath CO₂, and bioapatite in different mammals. *Journal of Archaeological Science* 32, 1459–1470.

Passey B.H., Hu H., Ji H., Montanari S., Li S., Henkes G.A., Levin N.E. (2014) Triple oxygen isotopes in biogenic and sedimentary carbonates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 141 1-25

Pasteris, J.D., Wopenka, B., Freeman, J.J., Rogers, K., Valsami-Jones, E., van der Houwen, J.A.M., Silva, M.J. (2004) Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. *Biomaterials* 25, 229-238.

Pasteris, J.D., Wopenka, B., Valsami-Jones, E. (2008) Bone and tooth mineralization: why apatite? *Elements* 4, 97–104

Pasteris J.D. and Ying D.Y. (2009) Experimental fluoridation of nanocrystalline apatite. *American Mineralogist* 94, 53-63

Pasteris J.D., Yoder C.H., Sternlieb M.P., Liu S. (2012) Effect of carbonate incorporation on the hydroxyl content of hydroxylapatite. *Mineralogical magazine* 76, 2741-2759

Pasteris, J.D., Yoder, C.H., and Wopenka, B. (2014) Molecular water in nominally unhydrated carbonated hydroxylapatite: The key to a better understanding of bone mineral. *American Mineralogist*, 99, 16-27

Pate F.D. et Hutton J.T (1988) The use of soil chemistry data to address post-mortem diagenesis in bone mineral. *Journal of Archaeological Science* 15, 729-739

Pellegrini M., Lee-thorp J.A., Donahue RE.. (2011) Exploring the variation of the $\delta^{18}O_p$ and $\delta^{18}O_c$ relations in enamel increments. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 310 71-83

Perdew J.P., Burke K., Ernzerhof M. (1996) Generalized gradient approximation made simple. *Phys Rev Lett* 77 3865-3868

Person, A., Bocherens, H., Saliège, J.-F., Paris, F., Zeitoun, V. and Gérard, M. (1995) Early diagenetic evolution of bone phosphates: a X-ray diffractometry analysis. *Journal of Archaeological Science* 22, 211-221.

Person A., Bocherens H., Mariotti A., Renard M. (1996) Diagenetic evolution and experimental heating of bone phosphate. *Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology* 126, 135-149

Piccoli P.M. and Candela P.A. (2002) Apatite in igneous systems. In MJ Kohn, J Rakovan, and JM Hughes, Eds., *Phosphates-Geochemical, geobiological and materials importance*, vol 48, p. 255-292. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Mineralogical Society of America and Geochemical society, Chantilly, Virginia

Pickford M. (1974) Stratigraphy and paleoecology of five late Cenozoic formations in the Kenya Rift Valley, vol1 PhD Dissertation, London University, 219p.

- Pickford M., Gommery D. (2016) Fossil Suidae (Artiodactyla, Mammalia) from Aves Cave I and nearby sites in Bolt's Farm Palaeokarst System, South Africa. *Estudios Geológicos* 72, e059:1-24. Doi : <http://dx.doi.org/10.3989/egeol.42389.404>.
- Pinilla C., Blanchard M., Balan E., Ferlat G., Vuilleumier R., Mauri F. (2014) Equilibrium fractionation of H and O isotopes in water from path integral molecular dynamics. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 135 203-216
- Pfretzschner, H.-U. (2004) Fossilization of Haversian bone in aquatic environments. *C. R. Palevol.* 3, 605–616.
- Price T. D., Schoeninger M. J. and Armelagos G. J. (1985) Bone chemistry and past behaviour: an overview. *Journal of Human Evolution* 14, 419–47
- Pucéat E, Reynard B, Lécuyer C (2004) Can crystallinity be used to determine the degree of chemical alteration of biogenic apatites? *Chem Geol* 205:83-97
- Pucéat E., Joachimski M.M., Bouilloux A., Monna F., Bonin A., Motreuil S., Morinière P., Hénard S., Mourin J., Dera G., Quesne D. (2010) Revised phosphate-water fractionation equation reassessing paleotemperatures derived from biogenic apatite. *Earth and Planetary Science Letters* 298 135-142
- Putnis A. (2009) Mineral replacement reactions. *Reviews in mineralogy and geochemistry* 70 87-124
- Quade J., Cerling T.E.; Barry J.C., Morgan M.E., Pilbeam D.R., Chivas A.R., Lee-Thorp J.A., van der Merwe N.J. (1992) A 16-Ma record of paleodiet using carbon and oxygen isotopes in fossils teeth from Pakistan. *Chemical Geology* 94 183-192.
- Rakovan J. (2002) Growth and surface properties of apatite. In MJ Kohn, J Rakovan, and JM Hughes, Eds., *Phosphates-Geochemical, geobiological and materials importance*, vol 48, p. 51-86. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Mineralogical Society of America and Geochemical society, Chantilly, Virginia
- Rakovan J.F. and Pasteris J.D. (2015) A technological gem: materials, medical, and environmental mineralogy of apatite. *Elements* 11 195-200
- Redlich (1935) *Z. Physical Chem B* 28 371
- Regnier P., Lasaga A.C., Berner R.A., Han O.H., Zilm K.W. (1994) Mechanism of CO₃²⁻ substitution in carbonate-fluorapatite: Evidence from FTIR spectroscopy, ¹³C NMR, and quantum mechanical calculation. *American Mineralogist* 79, 809-818
- Rehman I. and Bonfield W., Characterisation of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 8, 1997, 1-4
- Reiche, I., Vignaud, C., Menu, M. (2002) The crystallinity of ancient bone and dentin: new insights by transmission electron microscopy. *Archaeometry* 44, 447-459
- Reiche I., Favre-Quattropani L., Vignaud C., Bocherens H., Charlet L., Menu M. (2003) A multi-analytical study of bone diagenesis: the Neolithic site of Bercy (Paris, France). *Meas Sci Technol* 14, 1608-1619

- Rey C., Lian J., Grynopas M., Shapiro F., Zylberberg L., Glimcher M.J. (1989) Non-apatitic environments in bone mineral: FT-IR detection, biological properties and changes in several disease states. *Conn Tissue Research* 21, 267-273
- Rey C., Combes C., Drouet C., Sfihi H., Barroug A. (2007) Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. *Materials Science and Engineering C* 27, 198-205
- Reynard L.M., Henderson G.M., Hedges R.E.M. (2010) Calcium isotope ratios in animal and human bone. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74 3735-3750
- Reynard B., Balter V. (2014) Trace elements and their isotopes in bones and teeth: diet, environments, diagenesis and dating of archeological and paleontological samples. *Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology* 416, 4-16
- Richet P., Bottinga Y., Javoy M. (1977) A review of hydrogen, carbon, nitrogen, oxygen, sulphur, and chlorine stable isotope fractionation among gaseous molecules. *Ann Rev Earth Planet Sci* 5 65-110
- Roche D., Ségalen L., Balan E., Delattre S. (2010) Preservation assessment of Miocene-Pliocene tooth enamel from Tugen Hills (Kenyan Rift Valley) through FTIR, chemical and stable-isotope analyses. *Journal of Archaeological Science* 37 1690-1699.
- Roche D., Ségalen L., Senut B., Pickford M. (2013) Stable isotope analyses of tooth enamel carbonate of large herbivores from the Tugen Hills deposits: environmental context of the earliest Kenyan hominids. *Earth Planetary Science Letters* 381 39-51
- Rodriguez-Carvajal J. (1993) Recent advances in magnetic structure determination by neutron powder diffraction. *Physica B: Condensed Matter* 192, 55-69
- Rodriguez-Lorenzo L.M., Hart J.N., Gross K.A. (2003) Influence of fluorine in the synthesis of apatites. Synthesis of solid solutions of hydroxy-fluorapatite. *Biomaterials* 24, 3777-3785
- Rogers K.D., Zioupos P. (1999) The bone tissue of the rostrum of a *Mesoplodon densirostris* whale: A mammalian biomineral demonstrating extreme texture. *Journal of Materials Science Letters* 18: 651-654
- Rogers, K.D. and Daniels, P. (2002) X-ray diffraction of the effects of heat treatment on bone mineral microstructure. *Biomaterials* 23, 2577-2585
- Romanek C.S., Grossman E.L. and Morse J.W. (1991) Carbon isotopic fractionation in synthetic aragonite and calcite: effects of temperature and precipitation rate *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56 419-430
- Roseberry, H. H., Hastings, A.B.; Morse, J.K. (1931) X-ray analysis of bones and teeth. *Journal of Biological Chemistry*, 90, 395-407
- Rosenbaum J.M. (1997) Gaseous, liquid and supercritical fluid H₂O and CO₂: oxygen isotope fractionation behaviour. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61 4993-5003
- Rustad J.R. and Zarzycki P. (2008) Calculation of site-specific carbon-isotope fractionation in pedogenic oxide minerals *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 10297-10301

- Rustad J.R., Casey W.H., Yin Q.-Z., Bylaska E.J., Felmy A.R., Bogatko S.A., Jackson VE, Dixon DA (2010) Isotopic fractionation of $Mg^{2+}(aq)$, $Ca^{2+}(aq)$, and $Fe^{2+}(aq)$ with carbonate minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74 6301-6323
- Sage R.F. (1999) Why C4 photosynthesis? In C4 plant biology. Sage R.F. & Monson R.K. eds. New York, Academic Press, 3-16.
- Salje E, Güttler B (1984) Anderson transition and intermediate polaron formation in WO_{3-x} Transport properties and optical absorption *Philos Mag B* 50:607-620
- Salje EKH, Carpenter MA, Malcherek T, Boffa Balaran T (2000) Autocorrelation analysis of infrared spectra from minerals. *Eur J Mineral* 12:503-519
- Salje EKH, Bismayer U (1997) Hard mode spectroscopy: the concept and applications. *Phase Transit* 63:1-75
- Salje EKH, Yagil Y (1996) Hard mode spectroscopy for the investigation of structural and superconducting phase transitions. *J Phys Chem Solids* 57:1413-1424
- Sawada Y., Pickford M., Senut B., Itaya T., Hyodo M., Miura T., Kashine C., Chujo T., Fujii H. (2002) The age of *Orrorin tugenensis*, an early hominid from the Tugen Hills, Kenya. *Comptes Rendus Palevol* 1, 293-303
- Schauble E.A. (2004) Applying stable isotope fractionation theory to new systems. In Johnson CM, Beard BL, Albarède F (eds) *Geochemistry of non-traditional stable isotopes. Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 65. Mineralogical society of America, Washington, p 65
- Schauble E.A., Ghosh P. and Eiler J.M. (2006) Preferential formation of ^{13}C - ^{18}O bonds in carbonate minerals, estimated using first-principles lattice dynamics. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70 2510-2529
- Scheuer L. et Black S. (2000) *Developmental Juvenile Osteology*. Elsevier Amsterdam
- Schmitt A.-D., Stille P., Vennemann T. (2003) Variations of the $^{44}Ca/^{40}Ca$ ratio in seawater during the past 24 million years: evidence from $\delta^{44}Ca$ and $\delta^{18}O$ values of Miocene phosphates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67 2607-2614
- Schoeninger M.J., Moore K.M., Murray M.L., Kingston J.D. (1989) Detection of bone preservation in archaeological and fossil samples. *Applied Geochemistry* 4, 281-292
- Scott L. (1995) Pollen evidence from vegetational and climatic change in southern Africa during the Neogene and Quaternary. In E.S. Vrba, G.H. Denton, T.C. Partidge, L.H. Buckle Eds. *Paleoclimate and evolution with emphasis on human origins*. Yale University Press pp 65-76
- Ségalen L., Lee-thorp J. A., Cerling T. (2007) Timing of C4 grass expansion across sub-Saharan Africa. *Journal of Human Evolution*, 53, 549-559.
- Ségalen L., de Rafélis M., Lee-Thorp J.A., Maurer A.F., Renard M. (2008) Cathodoluminescence tools provide clues to depositional history in Iocene and Pliocene mammalian teeth. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 266, 246-253
- Sénégal F, Avery M (1998). New evidence for the murine origins of the *Otomyinae* (Mammalia, Rodentia) and the age of Bolt's Farm (South Africa). *S Afr J Sci* 94, 503-507.

- Sénégal F., Thackeray J.F., Gommery D., Braga J. (2002). Palaeontological sites on 'Bolt's Farm', Sterkfontein Valley, South Africa. *Ann Trans Mus* 39, 65-67.
- Senut B., Pickford M., Gommery D., Mein P., K. Cheboi et Y. Coppens (2001) First hominid from the Miocene (Lukeino Formation, Kenya). *Comptes Rendus de l'Académie de Sciences* 332, 137-144
- Sharp Z.D., Atudorei V., Furrer H. (2000) The effect of diagenesis on oxygen isotope ratios of biogenic phosphates. *Am J Sci* 300, 222
- Shemesh A. (1990) Crystallinity and diagenesis of sedimentary apatites. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54, 2433–2438
- Shusko M.Y. (2009) Effective permittivity of mixtures of anisotropic particles. *J Phys D Appl Phys* 42(15):155410
- Sihvola A.H., Kong J.A. (1988) Effective permittivity of dielectric mixtures. *IEEE T Geosci Remote* 26:420–429
- Sillen, A., and LeGeros, R. (1991) Solubility profiles of synthetic apatites and of modern and fossil bones. *Journal of Archaeological Science*, 18, 385-397
- Sillen, A., and Morris A. (1996) Diagenesis of bone from Border Cave: implications for the age of the Border Cave hominids. *Journal of Human evolution*, 31, 499-506
- Silverman R., Fuyat R.K., Weister J.D. (1952) Quantitative determination of calcite associated with carbonate-bearing apatites. *American Mineralogist* 37, 211-222
- Skinner H.C.W. (2005) Biominerals. *Mineralogical Magazine* 69: 621-641
- Skulan J., DePaolo D.J., Owens T.L. (1997) Biological control of calcium isotopic abundances in the global calcium cycle. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61 2505-2510
- Skulan J., DePaolo D.J. (1999) Calcium isotope fractionation between soft and mineralized tissues as a monitor of calcium use in vertebrates. *Proc Nat Acad Sci* 96 13709-13713
- Smith C.I., Nielsen-Marsh C.M., Jans M.M.E., Collins M.J. (2007) Bone diagenesis in European Holocene I: patterns and mechanisms. *Journal of Archaeological Science* 34, 1485-1493
- Snoeck C. et Pellegrini M. (2015) Comparing bioapatite carbonate pre-treatments for isotopic measurements: Part 1 – Impact on structure and chemical composition. *Chemical Geology* 417, 394-403
- Soudry D., Segal I., Nathan Y., Glenn C.R., Halicz L., Lewy Z., VonderHaar D.L. (2004) $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$ and $^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$ isotope variations in Cretaceous-Eocene Tethyan francolites and their bearing on phosphogenesis in the southern Tethys. *Geology* 32 389-392
- Soudry D., Glenn C.R., Nathan Y., Segal I., VonderHaar D.L. (2006) Evolution of Tethyan phosphogenesis along the northern edges of the Arabian-African shield during the Cretaceous-Eocene as deduced from temporal variations of Ca and Nd isotopes and rates of P accumulation. *Earth Sci Rev* 78 27-57

- Spanier J.E., Herman I.P. (2000) Use of hybrid phenomenological and statistical effective-medium theories of dielectric functions to model the infrared reflectance of porous SiC films. *Phys Rev B* 61:10437-10450
- Spear F.S. et Pyle J.M. (2002) Apatite, monazite and xenotime in metamorphic rocks. In MJ Kohn, J Rakovan, and JM Hughes, Eds., *Phosphates-Geochemical, geobiological and materials importance*, vol 48, p. 293-336. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Mineralogical Society of America and Geochemical society, Chantilly, Virginia
- Stathopoulou E.T., Psycharis V., Chryssikos G.D., Gionis V., Theodorou G. (2008) Bone diagenesis: New data from infrared spectroscopy and X-ray diffraction. *Palaeogeogr, Palaeoclimatol, Palaeoecol* 266:168–174
- Stiner, M.C., Kuhn, S.L., Surovell, T.A., Goldberg, P., Meignen, L., Weiner, S., Bar-Yosef, O., (2001). Bone preservation in Hayonim Cave (Israel): a macroscopic and mineralogical study. *Journal of Archaeological Science* 28, 643–659.
- Stolper D.A. and Eiler J.M. (2015) The kinetics of solid-state isotope exchange reactions for clumped isotopes: A study of inorganic calcites and apatites from natural and experimental samples. *American Journal of Science* 315 363-411
- Sponheimer, M., and Lee-Thorp, J., 1999. Alteration of enamel carbonate environments during fossilization. *Journal of Archaeological Science*, 26, 143-150
- Suetsugu Y., Shimoya I., Tanaka J. (1998) Configuration of carbonate ions in apatite structure determined by polarized infrared spectroscopy. *Journal of the American Ceramic Society* 81, 746-748
- Suga S. (1982) Progressive mineralization pattern of developing enamel during the maturation stage. *Journal of Dental Research* 61, 1532-1542
- Sullivan, C.H., Krueger, H.W. (1981) Carbon isotope analysis of separate chemical phases in modern and fossil bone. *Nature* 292, 333–335
- Surmik D., Boczarowski A., Balin K., Dulski M., Szade J., Kremer B., Pawlicki R. (2016) Spectroscopic studies on organic matter from Triassic reptile bones, Upper Silesia, Poland. *PLoS ONE* 11(3): e0151143
- Surovell T.A., Stiner M.C. (2001) Standardizing infra-red measures of bone mineral crystallinity: an experimental approach. *Journal of Archaeological Science* 28, 633-642
- Tacail T., Albalat E., Télouk P., Balter V. (2014) A simplified protocol for measurement of Ca isotopes in biological samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 529-535
- Tacail T., Télouk P., Balter V. (2016) Precise analysis of calcium stable isotope variations in biological apatites using laser ablation MC-ICPMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 31 152-162
- Tacker R.C. (2008) Carbonate igneous and metamorphic fluorapatite: Two type A and two type B substitutions. *American Mineralogist* 93, 168-176
- Tandon L., Iyengar G.V., Parr R.M. (1998) A review of radiologically important trace elements in human bones. *Applied Radiation and Isotopes* 49, 903-910

Thackeray JF, Gommery D, Sénégas F, et al (2008). A survey of past and present work on Plio-Pleistocene deposits on Bolt's Farm, Cradle of Humankind, South Africa. *Ann Transv Mus* 45:83–9

Thompson, T.J.U., Gauthier, M., Islam, M. (2009) The application of a new method of Fourier Transform Infrared spectroscopy to the analysis of burned bone. *Journal of Archaeological Science* 36, 910-914

Toppets V., Pastoret V., Behr V.D., Antoine N., Dessy C., Gabriel A. (2004) Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Annales de Médecine Vétérinaire* 148, 1-13

Trueman C.N. et Tuross N. (2002) Trace elements in recent and fossil bone apatite. In MJ Kohn, J Rakovan, and JM Hughes, Eds., *Phosphates-Geochemical, geobiological and materials importance*, vol 48, p. 489-521. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Mineralogical Society of America and Geochemical Society, Chantilly, Virginia

Trueman, C.N.G., Behrensmeyer, A.K., Tuross, N., Weiner, S. (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, 721–39.

Trueman, C.N.G., Behrensmeyer, A.K., Potts R., Tuross, N. (2006) High-resolution records of location and stratigraphic provenance from the rare earth element composition of fossil bones. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 4343-4355

Trueman, C.N., Privat, K., Field, J. (2008) Why do crystallinity values fail to predict the extent of diagenetic alteration of bone mineral? *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 266, 160-167.

Tuross N., Behrensmeyer A.K., Eanes E.D. (1989a) Strontium increases and crystallinity changes in taphonomic and archaeological bone. *Journal of Archaeological Science* 16, 661-672

Tuross N., Behrensmeyer A.K., Eanes E.D., Fisher L.W., and P.E. (1989b) Molecular preservation and crystallographic alterations in a weathering sequence of wildebeest bones. *Applied Geochemistry* 4, 261-270

Tütken T., Vennemann T.W., Pfretzschner H.-U. (2008) Early diagenesis of bone and tooth apatite in fluvial and marine settings: Constraints from combined oxygen isotope, nitrogen and REE analysis. *Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology* 266, 254-268

Tutken T. (2014) Isotope compositions (C, O, Sr, Nd) of vertebrate fossils from the Middle Eocene oil shale of Messel, Germany: implications for their taphonomy and palaeoenvironment. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 416 92-109

Ulian G., Valdrè G., Corno M., Ugliento P. (2014) DFT investigations of structural and vibrational properties of type B and mixed A-B carbonated hydroxylapatite. *American Mineralogist* 99 117-127

Ulian, G., Valdrè, G. (2018) Effect of mechanical stress on the Raman and infrared bands of hydroxylapatite: A quantum mechanical first principle study. *Journal of the Mechanical Behaviour of Biomedical Materials* 77, 683-692

- Uno K.T., Cerling T.E., Harris J.M., Kunimatsu Y., Leakey M.G., Nakatsukasa M., Nakaya H. (2011) Late Miocene to Pliocene carbon isotope record of differential diet change among East African herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 6509-6514
- Vignoles M., Bonel G., Bacquet G. (1982) Physicochemical study of phosphocalcium carbonated apatites similar to francolite. *Bulletin de Minéralogie* 105, 307-311
- Wacker U., Rutz T., Löffler N., Conrad A.C., Tütken T., Böttcher M.E., Fiebig J. (2016) Clumped isotope thermometry of carbonate-bearing apatite: Revised sample pre-treatment, acid digestion, and temperature calibration. *Chemical Geology* 443 97-110
- Walker D, Scharnberg K (1990) Electromagnetic response of high-Tc superconductors. *Phys Rev B* 42:2211-2221
- Wang W., Qin T., Zhou C., Huang S., Wu Z., Huang F. (2017) Concentration effect on equilibrium fractionation of Mg-Ca isotopes in carbonate minerals: Insights from first-principles calculations. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 208 185-197
- Wang X.J., Milner T.E., Chang M.C., Nelson J.S. (1996) Group refractive index measurement of dry and hydrated type I collagen films using optical low-coherence reflectometry. *Journal of Biomedical Optics*, 1, 212-216
- Wang, Y., Cerling, T.E. (1994) A model for fossil tooth and bone diagenesis: implications for paleodiet reconstruction from stable isotopes. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 107, 596–606.
- Wang, Y., Von Euw, S., Fernandes, F.M., Cassaignon, S., Selmane, M., Laurent, G., Pehau-Arnaudet, G., Coelho, C., Bonhomme-Coury, L., Giraud-Guille, M.-M., Babonneau, F., Azais, T., and Nassif, N. (2013) Water-mediated structuring of bone apatite. *Nature Materials*, 12, 1144-1153
- Waychunas GA, Zhang H (2008) Structure, chemistry and properties of mineral nanoparticles *Elements* 4:381-387
- Weiner S, Bar-Yosef O (1990) States of preservation of bones from prehistoric sites in the Near East: A survey. *J Archaeol Sci* 17:187–196
- Weiner, S., Goldberg, P., Bar-Yosef, O. (1993) Bone preservation in Kebara Cave, Israel using on-site Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Archaeological Science* 20, 613–627.
- Weiner, S., Goldberg, P., Bar-Yosef, O. (2002) Three dimensional distribution of minerals in the sediments of Hayonim Cave, Israel: diagenetic processes and archaeological implications, *Journal of Archaeological Science* 29, 1289–1308.
- Wilson E.E., Awonusi A., Morris M.D., Kohn D.H., Tecklenburg M.M.J., Beck L.W. (2006) Three structural roles for water in bone observed by solid-state NMR. *Biophysical Journal* 90, 3722-3731
- Wopenka, B., and Pasteris, J.D., 2005. A mineralogical perspective on the apatite in bone *Materials Science and Engineering C* 25, 131-143

- Wright, L., Schwarcz, H.P. (1996) Infrared evidence for diagenesis of bone apatite at Dos Pilas: paleodietary implications. *Journal of Archaeological Science* 23, 933–944.
- Wu Y., et al (2002) Nuclear magnetic resonance spin-spin relaxation of the crystals of bone, dental enamel and synthetic hydroxyapatites. *J. Bone Miner Res* 17, 472-480
- Yagil Y, Baudenbacher F, Zhang M, Birch JR, Kinder H, Salje EKH (1995) Optical properties of YBa₂Cu₃O_{7-d} thin films. *Phys Rev B* 52:15582-15591
- Yi H, Balan E, Gervais C, Segalen L, Fayon F, Roche D, Person A, Morin G, Guillaumet M, Blanchard M, Lazzeri M, Babonneau F (2013) A carbonate-fluoride defect model for carbonate-rich fluorapatite. *Am Mineral* 98:1066-1069
- Yi H., Balan E., Gervais C., Ségalen L., Blanchard M., Lazzeri M. (2014a) Theoretical study of the local charge compensation and spectroscopic properties of B-type carbonate defects in apatite. *Physic and chemistry of minerals* 41, 347-359
- Yi H., Balan E., Gervais C., Ségalen L., Roche D., Person A., Fayon F., Morin G., Babonneau F. (2014b) Probing atomic scale transformation of fossil dental enamel using Fourier transform infrared and nuclear resonance magnetic spectroscopy: A case study from the Tugen Hills (Rift Gregory, Kenya). *Acta Biomaterialia* 10, 3952-3958
- Yoder C.J. and Bartelink E.J. (2010) Effects of different sample preparation methods on stable carbon and oxygen isotope values of bone apatite: a comparison of two treatment protocols. *Archaeometry* 52, 115-130
- Yoder, C. H., Pasteris, J. D., Worcester, K. N., and Schermerhorn, D. V. (2012a) Structural water in carbonated hydroxylapatite and fluorapatite: confirmation by solid state (2)H NMR. *Calcified Tissue International*, 90, 60-67
- Young, R.A., and Holcomb, D.W. (1984) Role of acid phosphate in hydroxyapatite lattice expansion. *Calcified tissue international*, 36, 60-63.
- Young E.D., Galy A., Nagahara H. (2002) Kinetic and equilibrium mass-dependent isotope fractionation laws in nature and their geochemical and cosmochemical significance. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66 1691-1698
- Zazzo A. (2001) Validation méthodologique de l'utilisation des compositions isotopiques (¹³C, ¹⁸O) des bioapatites fossiles pour la reconstruction des paléoenvironnements continentaux. Thèse de doctorat, Université Paris VI, 252p.
- Zazzo A., Lécuyer C., Mariotti A. (2004a) Experimentally-controlled carbon and oxygen isotope exchange between bioapatites and water under organic and microbially-mediated conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, 1-12
- Zazzo A., Lécuyer C., Sheppard SMF., Grandjean P., Mariotti A. (2004b) Diagenesis and the reconstruction of paleoenvironments A method to restore original δ¹⁸O values of carbonate and phosphate from fossil tooth enamel. *Geochimica et Ccosmochimica Acta* 68, 2245-2258
- Zazzo A., Saliege J.F., Person A., Boucher H. (2009) Radiocarbon dating of calcined bones: Where does the carbon come from? *Radiocarbon* 51, 601-611

Zazzo A. (2014) Bone and enamel carbonate diagenesis: A radiocarbon prospective. *Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology* 416, 168-178

Zhang M, Wruck B, Graeme Barber A, Salje EKH, Carpenter MA (1996) Phonon spectroscopy on alkali-feldspars: Phase transitions and solid solutions. *Am Mineral* 81:92-104

Zheng Y.-F. (2016) Oxygen isotope fractionation in phosphates: the role of dissolved complex anions in isotope exchange. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 52 47-60

Annexe I. Bolt's Farm Cave System dans le Cradle of Humankind (Afrique du Sud) : un exemple d'approche multidisciplinaire dans l'étude des sites à primates fossiles

Dominique GOMMERY, Frank SENEGAS, Lazarus KGASI, Nonhlanhla VILAKASI, Brian KUHN, James BRINK, Martin PICKFORD, Andy IR HERRIES, John Hancox, Thibaud SAOS, Loïc SEGALÉN, Julie AUFORT, John Francis THACKERAY

Publié dans la *Revue de Primatologie* (2016) 7

DOI : 10.4000/primatologie.2725

1. Introduction

Depuis presque un siècle, des restes de primates sont découverts dans différents sites en Afrique du Sud, en particulier dans ceux plio-pléistocènes du Cradle of Humankind (région proche de Prétoria et de Johannesburg qui a été classée Patrimoine mondial de l'humanité en 1999 par l'UNESCO du fait de sa richesse en restes d'hominidés et de faunes associées). C'est le cas notamment du Bolt's Farm Cave System (BFCS), anciennement ou couramment appelé Bolt's Farm. BFCS correspond à un réseau karstique qui a été érodé au cours du temps. Il ne reste donc que des témoins correspondant à des cavités dispersées sur une surface d'environ 0,5 km² (Figure 1). A la différence de la plupart des sites du Cradle of Humankind, BFCS correspond à une aire fossilifère et n'est donc pas un unique site comme on l'entend habituellement. Les différentes zones fossilifères sont ici dénommées loci (locus au singulier).



Figure 1 Vue générale de Bolt's Farm Cave System

BFCS livre des fossiles depuis 1936 (Broom, 1937, 1939, 1950 ; Cooke, 1991 ; Gommery *et al.*, 2014a ; Thackeray *et al.*, 2008), dont des primates. Le premier à en découvrir est R. Broom (Freedman, 1957) mais contrairement à d'autres sites dans le Cradle of Humankind, Broom n'a pas laissé d'informations sur le lieu exact de ses découvertes à BFCS. Il a fallu attendre les recherches de l'University of California Expedition dirigée par C. M. Camp entre 1947 et 1948 (Camp, 1948) pour avoir le premier plan de BFCS avec les différentes localités fossilifères et une collecte conséquente de matériel, dont de nombreux restes de primates. Ces derniers ont été étudiés principalement par Freedman (1957, 1965, 1976) mais également par Delson (1984).

Malgré les recherches des membres du HRU (HOPE (Human Origins and Past Environments) Research Unit) depuis 2006, certains chercheurs perçoivent toujours BFCS comme un seul site voire au mieux deux ou trois. En réalité, la prospection réalisée par l'University of California Expedition ainsi que nos recherches ont montré que BFCS comprend plus d'une 30aine de localités fossilifères (ou loci) bien que toutes n'aient pas livré de restes de primates. Ces localités ne se présentent pas toutes sous le même aspect (localités très érodées présentant des dépôts plus ou moins affleurants ou d'autres moins érodées avec des dépôts plus profonds) ; elles présentent aussi des dépôts géologiques de différents âges. On peut considérer que BFCS présente, bien que discontinue, la plus longue séquence chronologique pour le Cradle of Humankind, probablement comprise entre 4,5 et 0,9 million d'années environ. Ceci est exceptionnel pour cette région de l'Afrique alors que cela l'est moins en Afrique de l'Est où il existe des formations géologiques avec des séquences chronologiques entre 2 et 4 millions d'années pour la plupart. La particularité de BFCS nécessite une approche multidisciplinaire pour son étude.

2. Présentation de BFCS et contexte des activités sur le terrain

BFCS se trouve à environ 2 km du célèbre site de Sterkfontein qui a livré des restes d'*Australopithecus africanus*, dont la fameuse Mrs Ples. Les différents loci répertoriés par l'University of California Expedition entre 1947 et 1948 se trouvent actuellement sur trois propriétés. L'une d'elle correspond à une grande carrière qui a été ouverte dans les années 80 et les loci ont été détruits. Les deux autres sont des propriétés privées, Klinkert's et Greensleeves (Figure 2), sur lesquelles les activités du HRU se focalisent.

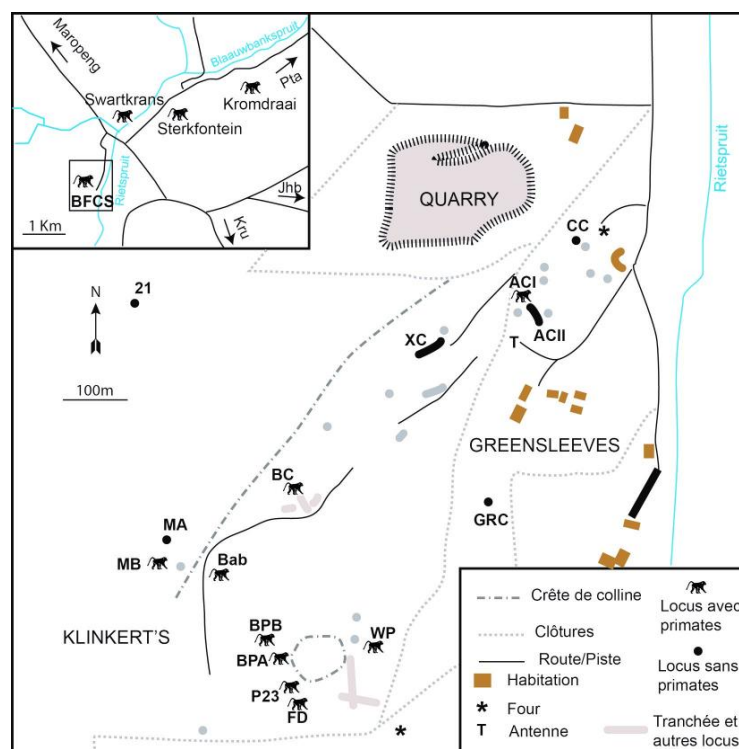


Figure 2 Carte avec les différents loci de Bolt's Farm Cave System. Carte générale : BFCS, Bolt's Farm Cave System ; Jhb, Johannesburg ; Kru, Krugersdorp ; Pta, Prétoria. Greensleeves : ACI, Aves Cave I ; ACII, Aves Cave II ; CC, Cobra Cave ; GRC, Garage Ravine Cave. Klinkert's : Bab, Baboon Cave ; BC, Bridge Cave ; BPA, Brad Pit A ; BPB, Brad Pit B ; FD, Femur Dump ; MA, Milo A ; MB, Milo B ; P23, Pit 23 ; XC, X Cave ; WP, Waypoint 160.

Si les recherches à BFCS ont commencé en 1936 avec R. Broom, elles resteront très ponctuelles même lors du début de la collaboration franco-sud-africaine (signature de l'accord de collaboration entre le Transvaal Museum de Prétoria (actuellement Ditsong National Museum of Natural History), l'Ambassade de France en Afrique du Sud et le Collège de France le 29 novembre 1995) (Senut, 2016). Toutefois, 1996 est une date importante car elle correspond à la découverte de Waypoint 160 à BFCS (Figure 2). Ce locus est daté du Pliocène inférieur (provisoirement entre 4,5 et 4 millions d'années) et il est pour l'instant le plus ancien dépôt fossilifère du Cradle of Humankind (Sénégal et Avery, 1998 ; Sénégal et Michaux, 2000 ; Sénégal *et al.*, 2002).

A partir de 2006, avec la création du HRU, les activités du terrain vont devenir régulières. Elles seront, jusqu'à fin 2010, restreintes à une prospection du BFCS pour localiser les différents loci répertoriés par l'University of California Expedition mais également permettre la découverte de nouveaux loci (Gommery *et al.*, 2012 ; Thackeray *et al.*, 2008). Ceci pourrait sembler anodin mais il n'est pas si facile de retrouver les loci identifiés il y a environ 60 ans. Il faut préciser que, comme pour toute cette région du Cradle of Humankind, BFCS a été exploité par des mineurs qui recherchaient de la calcite assez pure. Cette dernière, une fois transformée, donne de la chaux. Elle était utilisée pour extraire le minerai d'or des mines de Kromdraai et de Krugersdorp. L'activité des mineurs s'est donc poursuivie après la visite de l'University of California Expedition à BFCS et a modifié l'aspect de la zone. Puis quand les mineurs ont quitté la zone, la nature a repris ses droits et des arbustes ainsi que des arbres ont poussé dans les cavités. A l'heure actuelle, plus d'une trentaine de loci sont ainsi répertoriés et sont différenciés par une appellation propre (Figure 2). Il faut pouvoir distinguer dans les collections le matériel pour chaque locus.

Les mineurs ont donc excavé les remplissages karstiques pour extraire cette calcite présente sous forme de spéléothèmes (stalactites, stalagmites, planchers stalagmitiques,...). Ils ont rejeté le reste sur les crassiers que l'on peut voir autour de tous les sites du Cradle of Humankind. Ces crassiers sont constitués de fragments de spéléothèmes non exploitables, de dolomie (roche encaissante qui s'est formée il y a 2,5 milliards d'années), d'autres fragments de roche mais également de brèches fossilifères ou non. La brèche correspond au sédiment, comprenant ou non des graviers, qui se retrouve cimenté par le dépôt de calcite laissé par l'eau d'infiltration. Cette brèche peut contenir ou non des restes de faune de différentes tailles avec des concentrations variables. Les membres du HRU ont donc aussi exploité ces crassiers jusqu'à fin 2010 pour rechercher des blocs de brèche contenant des fossiles (Figure 3).



Figure 3 Un exemple de crassier laissé par les mineurs à Bolt's Farm Cave System (Waypoint 160).

A partir de 2011, l'activité de terrain ne comprend plus que des fouilles de certains loci (Figure 4). La toute première étape est un désherbage et nettoyage du locus mais aussi d'une partie de la zone avoisinante. Des remblais laissés par les mineurs mais aussi des sédiments sont apportés par des facteurs naturels (pluie, vent, activité d'animaux, décomposition de plantes...) sont venus combler les cavités et recouvrir les dépôts de brèches. Il est souvent difficile de définir l'étendue du locus lors des premières fouilles. Très vite, il est indispensable de fixer un point de référence stable pour prendre les coordonnées en 3 dimensions aussi bien des fossiles que des différentes structures géologiques. La fouille ne consiste pas à « vider » un site mais à faire apparaître toutes les structures géologiques *in situ*, en particulier des brèches et des spéléothèmes. Il faut donc enlever la partie plus ou moins meuble du locus. La partie du sédiment meuble qui livre des fossiles est ce que l'on appelle la brèche décalcifiée. Avec le temps, les loci sont principalement érodés par l'action de l'eau. Cette dernière dissout la dolomie encaissante. Le plafond des grottes s'effondre et disparaît. Les brèches vont s'éroder elles-aussi sous l'action de l'eau qui transporte des acides naturels dus à la décomposition des plantes et contenus dans le sol (Cf. attaque acide naturelle). Les restes fossiles vont donc se retrouver libres dans un sédiment meuble. On ne peut plus les considérer comme *in situ* puisqu'ils peuvent bouger dans ce sédiment. La dissolution a entraîné un tassement (vide laissé par la calcite dissoute disparaît). Il peut y avoir aussi des déplacements naturels de sédiment ou liés à l'activité biologique (racines, animaux fouisseurs). Il ne faut pas oublier aussi les perturbations liées à l'activité anthropique (mineurs). Il arrive parfois aussi que ce sédiment meuble se recalcifie avec des fossiles. C'est pourquoi il est important d'indiquer dans les catalogues la provenance des fossiles (brèche *in situ*, brèche décalcifiée). Quoi qu'il en soit, l'ensemble du sédiment meuble est tamisé pour récolter le maximum de fossiles.



Figure 4 Fouille à Aves Cave I (Bolt's Farm Cave System) (photographie : D. Gommery).

3. Préparation et étude des fossiles

Après la lecture du texte précédent, il est facile de comprendre que les fossiles peuvent provenir de trois types différents de contexte : de la brèche *in situ* (c'est pour ces fossiles que l'on peut avoir le maximum de données fiables), des blocs de brèches isolées, ou *ex-situ*, comme ceux dans les crassiers (le contexte sera le bloc et il pourra y avoir une association de fossiles ; les données seront un peu moins fiables), et enfin la brèche décalcifiée (le fossile est isolé ; les interprétations seront plus délicates et dépendront de la nature du fossile (macrofaune ou microfaune, espèce éteinte ou toujours existante)). Seuls quelques exemples sont présentés pour illustrer les différents points abordés, il est impossible de détailler l'ensemble des groupes ou des disciplines du fait de leur grande diversité.

3.1. Les méthodes de préparation du matériel dans les brèches

Il existe deux méthodes pour extraire les fossiles des brèches et chacune a des caractéristiques propres :

- préparation mécanique : On utilise un micrograveur soit à air comprimé soit électrique, pour enlever la brèche. Cette méthode est la plus rapide et fonctionne très bien pour les restes de macrofaune assez bien conservés. Elle est par contre à proscrire pour la microfaune et les pièces fragiles. Les vibrations engendrées par le micrograveur peuvent ouvrir les fissures existantes et détruire les petits restes. De plus, il y a toujours un risque de créer des marques qui peuvent être confondues avec différentes marques taphonomiques (traces naturelles de grains sables lors de charriage par l'eau, de carnivores) ou anthropiques (traces de découpe).

- préparation chimique : Il s'agit de plonger les blocs de brèche dans des solutions d'acide dilué (acide acétique, acide formique) pendant quelques heures. Il faut au préalable protéger les fossiles avec une couche de consolidant. La phase la plus importante est le rinçage pendant une à deux journées, de préférence avec un courant d'eau continu. Cette phase empêche

la formation de cristaux issus de l'acide et stoppe l'action de l'acide. Il faut répéter toutes ces phases jusqu'au dégagement complet des fossiles. Cette technique est très longue mais permet d'obtenir tous les éléments fossiles, dont les plus petits et les plus fragiles.

Il est possible de coupler les deux méthodes suivant le type de fossiles. Dans tous les cas, il y a toujours une phase d'encollage ou de consolidation. On emploie du consolidant depuis plusieurs décennies et il existe maintenant des réflexions sur le rôle des consolidants dans la conservation des fossiles. Les plus anciens sont faits à base de poissons (introduction d'éléments organiques qui peuvent contrarier les études génétiques pour les restes du Pléistocène supérieur voire moyen, mais aussi les analyses isotopiques ou géochimiques). Certains consolidants sont, avec le temps, devenus opaques et forment des plaquages sur les fossiles. Il existe peu de précisions dans les archives des collections et dans les articles concernant les procédures de préparation et de consolidation. La connaissance du type de consolidant utilisé permettrait de savoir quel type de diluant (alcool ou acétone par exemple) il faut utiliser pour tenter de l'enlever. Les membres du HRU ont eu une réflexion depuis quelques années sur le sujet et tentent de laisser le maximum d'informations sur les techniques utilisées tout en améliorant les procédures.



Figure 5 Laboratoire de préparation au Ditsong National Museum of Natural History à Prétoria (photographie : D. Gommery).

Pour pouvoir préparer à l'acide une plus grande quantité de brèches, et ceci dans des conditions optimales pour la sécurité des préparateurs, un nouveau laboratoire de préparation (Figure 5) a été mis en place dans un bâtiment dédié au sein du Ditsong National Museum of Natural History à Prétoria. Ce nouveau laboratoire qui a pu voir le jour en grande partie grâce aux membres du HRU a été inauguré le 29 octobre 2012.

3.2. Les primates

Plusieurs loci ont livré et livrent des restes de primates non-humains à BFCS. Plusieurs de ces fossiles sont incontournables tant du point de vue historique que de l'étude des fossiles

de Cercopithecoidea de l'Afrique du Sud mais aussi de l'Afrique de l'Est (Gommery et Bento Da Costa, 2016).

R. Broom a découvert quelques restes de primates dont un crâne (Figure 6) de *Parapapio* (une sorte de petit babouin) (Freedman, 1957), mais également un museau d'un babouin fossile (*Papio hamadryas robinsoni*) complètement entouré de calcite. Malheureusement, Broom n'a pas laissé d'informations sur la provenance exacte de ces fossiles. Ces derniers ont donc une valeur historique mais il est impossible d'aller plus loin dans l'interprétation car on y ignore le contexte de la découverte.



Figure 6 Crâne de *Parapapio* découvert par R. Broom à Bolt's Farm Cave System (Collection du Ditsong National Museum of Natural History, photographie : D. Gommery).

L'University of California Expedition a récolté une grande collection de restes de primates qui sont aujourd'hui en partie à l'Université de Witwatersrand à Johannesburg en Afrique du Sud et en partie au California University Museum of Palaeontology à Berkeley aux Etats-Unis. Les deux plus beaux spécimens proviennent du locus Pit 23 ou Tit Hill Pit et sont un crâne complet rapporté à *Parapapio broomi* (BF43) (Figure 7), un cercopithéciné, ainsi qu'un crâne quasi complet et une partie de la mandibule de *Cercopithecoides williamsi* (BF42) (Figure 8) qui lui appartient aux colobinés (Freedman, 1965, 1970, 1976). BF43 est de grande taille et il a d'abord été considéré comme appartenant à une autre espèce, *Pp. whitei*. Il présente un caractère inhabituel chez les spécimens de *Pp. broomi* sud-africains, la présence d'un léger diastème (espace) entre la canine et l'incisive latérale (Frost, 2001). Ce diastème est présent chez les spécimens éthiopiens, chez l'holotype sud-africain de *Pp. jonesi* ainsi que chez les spécimens de *Pp. whitei* de Makapansgat Limeworks situé dans le Nord-Est de l'Afrique du Sud. Un spécimen découvert par les membres du HRU à Femur Dump (qui pourrait correspondre au crassier du Pit 23) présente également ce diastème. Pour ce dernier spécimen ainsi que pour BF43, la structure du maxillaire est bien celle attendue pour *Pp. broomi*. L'histoire et la compréhension du genre *Parapapio* en Afrique du Sud restent compliquées.



Figure 7 BF43, *Parapio broomi* provenant du Pit 23 et découvert par l'University of California Expedition (Collection de l'Université de Witwatersrand, photographie : D. Gommery).

Le spécimen de *Cercopithecoides williamsi*, BF42 (Figure 8), sert de référence pour cette espèce dans la plupart des articles ou synthèses concernant le genre (Jablonski et Frost, 2010). L'exceptionnelle bonne préservation du crâne a permis une étude des structures internes du museau avec la mise en évidence d'un sinus maxillaire de chaque côté de la face (Kuykendall et Rae, 2008). Cette structure est présente chez la plupart des hominoïdes et des singes d'Amérique du Sud, mais absente chez les colobinés actuels et chez certains fossiles comme le *Mesopithecus* du Miocène supérieur et du Pliocène en Europe et au Moyen-Orient ou le genre *Dolichopithecus* du Pliocène en Europe. Elle a été découverte chez *Libypithecus* du Miocène supérieur en Egypte (Rae *et al.*, 2007) et chez *Kanagawapithecus* du Pliocène terminal au Japon (Nishimura *et al.*, 2012). *Cercopithecoides* et ces deux derniers genres pourraient présenter des relations plus proches entre eux qu'avec les autres formes de colobinés.



Figure 8 BF42, *Cercopithecoides williamsi* provenant du Pit 23 et découvert par l'University of California Expedition (Collection de l'Université de Witwatersrand, photographie : D. Gommery)

Les membres du HRU ont découvert eux-aussi des restes de primates dans différents loci du BFCS comme par exemple Femur Dump (Gommery *et al.*, 2008a) ou Aves Cave I (Gommery *et al.*, 2014a). Les découvertes les plus intéressantes ont été effectuées à Waypoint 160 (Gommery *et al.*, 2008 b, 2008c, 2009, 2014a, 2014 b). Il s'agit des plus anciens restes de primate du Cradle of Humankind (datés par biochronologie entre 4,5 et 4 millions d'années). Ces restes sont provisoirement rapportés au genre *Parapapio* (Figure 9). Les plus anciens restes de Cercopithecoidea sud-africains ont été découverts à Langebaanweg, situé au Nord de la ville du Cap et daté d'environ 5,1 millions d'années (Grine et Hendeby, 1981). Ces derniers sont considérés aussi appartenir au même genre. Les découvertes récentes de nouveaux taxons de Cercopithecoidea en Afrique de l'Est montrent qu'il y a une plus grande diversité de ces primates durant le Pliocène. L'obtention d'une collection plus importante de restes de primates à Waypoint 160 permettra de trancher sur l'attribution exacte. La plus grande des difficultés pour Waypoint 160 restait la localisation exacte de provenance de la brèche fossilifère. Jusqu'à présent, les fossiles découverts provenaient de blocs de brèches récoltés sur le crassier laissé par les mineurs. La découverte, lors de la mission de terrain d'avril-mai 2016, d'un fragment de molaire de primate *in situ* qui se recolle avec un autre provenant d'un bloc récolté en 2007 vient enfin résoudre cette question. Il est désormais potentiellement possible d'échantillonner pour effectuer des datations physiques du niveau fossilifère et donc peut-être de préciser l'âge.



Figure 9 Premiers restes de primate de Waypoint 160 (Collection du Ditsong National Museum of Natural History, photographie : D. Gommery)

3.3 Paléobiodiversité non-primate et paléoenvironnements

L'ensemble des études menées ne sont pas présentées ici mais seulement certaines pour mettre en valeur la diversité des taxons et des problématiques étudiées.

3.3.1 Les reptiles

L'Afrique australe présente une herpétofaune actuelle (correspond aux reptiles) très diversifiée avec 498 espèces réparties en 116 genres et 23 familles (Branch, 2005). Les lézards composent la plus grande partie avec 299 espèces. Le reste de cette diversité est représenté principalement par les serpents avec 146 espèces réparties en peu de genres, puis par les tortues

avec 28 espèces, les amphibènes avec 18 et les crocodiles avec une seule. Il existe peu de données concernant les fossiles de reptiles découverts dans les sites plio-pléistocènes en Afrique du Sud. Les publications les mentionnant sont rares et les données sont très incomplètes. Pourtant, certaines espèces de reptiles sont considérées comme des espèces indicatrices clés car elles peuvent être très sensibles à des conditions environnementales précises (Hager, 1998). Leur étude peut potentiellement aider à élaborer des reconstitutions du paléoenvironnement. Toutefois, il est important de préciser qu'il n'existe pas de travaux de référence sur l'ostéologie des reptiles actuels et/ou fossiles pour l'Afrique du Sud ; tout est à faire. Les collections de références dans les musées sud-africains sont composées principalement par des squelettes non désarticulés et sur lesquels il reste des tissus desséchés. Il faut donc créer les collections ostéologiques de référence. Deux exemples d'étude sont présentés ici.

Récemment, la première étude spécifique sur les reptiles fossiles a été entreprise pour les sites de BFCS et de Cooper's, ce dernier étant aussi situé dans le Cradle of Humankind. Cooper's a livré des mandibules de lézard en abondance alors qu'il y en a peu, pour l'instant, à BFCS. La plus grande partie de ces mandibules de lézard appartient au même genre qui vit actuellement en Afrique australe (à l'Est et au Sud), *Pseudocordylus*. Ce genre regroupe 8 espèces actuelles (Alexander et Marais, 2007). Les mandibules apparaissent plus petites en taille à BFCS qu'à Cooper's. Si les causes qui ont produit cette différence de taille restent inconnues, il ne semble pas irrationnel de penser qu'elles pourraient être liées à l'environnement et à l'alimentation de ces lézards. Le genre *Pseudocordylus* présente des espèces qui nécessitent certains types de roches avec des crevasses pour se réfugier (Alexander et Marais, 2007). Ils vivent aussi bien en basse qu'en haute altitude mais ils ne supportent pas des températures corporelles inférieures à -5 °C. La présence de restes pouvant être rapportés à ce genre suggère que le paysage de l'époque à laquelle ont vécu ces lézards devait aussi présenter des affleurements rocheux.

La préparation à l'acide permet d'obtenir des restes fossiles de petite taille et bien conservés. C'est ainsi qu'un fragment de maxillaire gauche de quelques millimètres portant un crochet a été découvert à X Cave, un des loci de BFCS. Ce crochet est très important car il est le premier spécimen de sa catégorie anatomique découvert dans le Cradle of Humankind. Habituellement, le matériel utilisé pour déterminer l'appartenance taxonomique des serpents en paléontologie et en archéozoologie est représenté par les vertèbres qui sont habituellement mieux conservées que les autres parties du squelette. L'étude de ce crochet a permis d'affirmer qu'il appartient au genre *Hemachatus*, ou Ringhal en français. Il est parfois appelé, à tort, cobra cracheur car il ressemble à ce dernier et présente le même comportement. Il en est un cousin éloigné. Même s'il s'agit d'un seul spécimen, sa présence confirme les données pour le paléoenvironnement obtenues grâce aux rongeurs fossiles. Il devait y avoir une prairie avec des affleurements rocheux bordant des zones humides, comme dans les zones fréquentées aujourd'hui par cette espèce de serpent (Dawson *et al.*, 1991).

Les deux précédents exemples montrent qu'il est possible d'avoir plus d'informations concernant la paléobiodiversité et le paléoenvironnement à partir de l'étude des restes de reptiles de petite taille. Cette dernière reste balbutiante et doit être développée.

3.3.2 Les rongeurs

Les rongeurs sont des micromammifères fortement tributaires des environnements (couverture végétale, ressources en eau...) dans lesquels ils évoluent (De Graaff, 1981 ; Skinner et Smithers, 1990). Ils peuvent être la proie de carnivores et de rapaces, diurnes ou nocturnes,

chacun laissant une empreinte taphonomique identifiable sur les ossements (Andrews, 1990). Le contributeur principal des accumulations fossiles de rongeurs dans le Cradle of Humankind semble être la Chouette effraie (*Tyto alba*). Ce rapace chasse dans une zone restreinte autour du lieu de régurgitation (cercle de quelques kilomètres seulement de rayon) et est plutôt opportuniste, se nourrissant des taxons les plus facilement accessibles. L'accumulation fossile de rongeurs donne ainsi une image locale (au contraire d'une image régionale donnée par la grande faune) de l'environnement passé au moment du dépôt des pelotes.

Si, globalement, les reconstitutions paléoenvironnementales pour les sites classiques pléistocènes inférieurs du Cradle of Humankind, y compris ceux de BFCS (Gommery *et al.*, 2008b), tendent à indiquer un environnement mosaïque plutôt ouvert, la reconstitution de l'environnement pour le gisement pliocène de Waypoint 160, même s'il reste mosaïque, indique une phase d'aridification autour de cette période, avec une espèce de milieu aride et semi-aride *Petromus antiquus* (Sénégas, 2004), et d'autres taxons indiquant une grande ouverture du milieu (*Euryotomys bolti*, *Cryptomys* sp., un Gerbillinae...).

3.3.3 Les carnivores

Les présentes fouilles des différents dépôts géologiques à BFCS ont livré toute une série d'espèces de carnivores. Bien que cette zone soit déjà connue pour avoir livré de 'grands chats' fossiles (Cooke, 1991) (Figure 10), nous pouvons maintenant identifier 32 taxons de carnivores pour 11 loci de BFCS (Tableau I). La gamme des différentes espèces se répartit des petits spécimens de suricate (*Suricatta*) provenant des deux loci X Cave et Bridge Cave, aux très grands spécimens de 'lions', attribués ici à *Panthera* aff. *P. leo*, découverts dans les dépôts de Bridge Cave et de X Cave.



Figure 10 Crâne and manible de *Dinofelis barlowi* provenant du Pit 23 à Bolt's Farm Cave System (Collection du Ditsong National Museum of Natural History, photographie : D. Gommery).

Des restes d'hyènes ont été trouvés à Aves Cave I, Brad Pit A, Brad Pit B, Bridge Cave et X Cave. Des coprolithes de ces animaux ont aussi été identifiés à Milo A et X Cave. Concernant les spécimens pouvant être déterminés plus précisément, certains, à Aves Cave I et X Cave, peuvent être attribués au même genre que l'hyène tachetée actuelle, cf. *Crocuta*, et des

restes dentaires de X Cave correspondent à l'espèce fossile *Crocota ultra*. Il est maintenant reconnu que la présence de l'espèce actuelle, *C. crocuta*, est plus récente qu'envisagé auparavant dans les sites du Pléistocène. C'est pourquoi nous attribuons ici le matériel de *Crocota* à l'espèce *C. ultra* (Kuhn *et al.* 2016). Des restes provenant de X Cave appartiennent au protèle (cf. *Proteles*), une hyène spécialisée dans la recherche de termites. Pour terminer, ils existent des spécimens qui sont rapportés au genre *Chasmaporthetes* (un genre de hyène qui possède des membres longs et effilés adaptés à la course), à cf. *Parahyaena* (la hyène brune appartient à ce genre) et à cf. Hyaenidae at Aves Cave I. Il est important de préciser que les fouilles antérieures à BFCs n'avaient identifié aucun hyénidés (Werdelin et Peigné, 2010).

	ACI	ACII	BPA	BPB	BC	CC	FD	GRC	MA	WP	XC
Hyaenid			X	X					X*		X*
cf. Hyaenidae	X				X						
<i>Crocota ultra</i>											X
cf. <i>Crocota</i>	X										X
cf. <i>Parahyaena</i>	X										
<i>Chasmaporthetes</i>	X										
cf. <i>Proteles</i>											X
<i>Dinofelis barlowi</i>							X				
cf. <i>Dinofelis</i>	X		X				X				
cf. <i>Megantereon</i>			X								
cf. <i>Homotherium</i>			X		X						
<i>Panthera leo</i>											X
<i>Panthera cf. leo</i>	X		X		X					X	
<i>Panthera aff. P. leo</i>					X						X
<i>Panthera pardus</i>					X						
<i>Panthera cf. pardus</i>	X		X	X	X						
cf. <i>Panthera</i>	X		X	X			X				
<i>Panthera sp.</i>		X	X		X						
Pantherine	X					X					
cf. Caracal	X		X				X				X
<i>Felis sylvestris</i>	X										
<i>Felis cf. sylvestris</i>					X						
<i>Felis sp.</i>	X				X						
Herpestidae	X										
<i>Suricatta suricatta</i>					X						
cf. <i>Suricatta</i>											X
<i>Canis mesomelas</i>					X						
<i>Canis cf. mesomelas</i>	X				X			X			X
<i>Canis sp.</i>	X				X						
Canid	X					X					
<i>Vulpes cf. chama</i>			X								

Tableau 1 Les différents carnivores présents à Bolt's Farm Cave System : ACI, Aves Cave I ; ACII, Aves Cave II ; BPA, Brad Pit A ; BPB, Brad Pit B ; BC, Bridge Cave ; CC, Cobra Cave ; FD, Femur Dump ; GRC, Garage Ravine Cave ; MA, Milo A ; WP, Waypoint 160 ; XC, X Cave ; * indique la présence de coprolithes.

La famille des Felidae est représentée par trois groupes. Les Machairodontinae (les représentants de cette sous-famille sont connus sous le nom populaire de tigres à dents de sabre) sont présents dans quatre loci (Aves Cave I, Brad Pit A, Bridge Cave and Femur Dump). Le genre *Dinofelis* présente comme les autres Machairodontinae sud-africains (*Homotherium* et *Megantereon*) des canines supérieures allongées mais elles ne sont pas aussi comprimées, c'est pourquoi il est placé ici dans un deuxième groupe distinct. Femur Dump a plusieurs spécimens attribués à *Dinofelis barlowi* et cf. *Dinofelis*. Ce dernier est aussi présent à Aves Cave I. Brad Pit A présente du matériel attribué à cf. *Dinofelis*, cf. *Megantereon* ainsi qu'à cf. *Homotherium* (ces deux derniers genres sont des tigres à dents de sabre et les *Homotherium* sont beaucoup plus grands que les lions). Une partie du matériel de grand félin provenant de Bridge Cave est provisoirement rapportée à cf. *Homotherium*. Les panthères constituent le troisième groupe de

Felidae. Elles sont rares dans les collections de fossiles mais abondantes dans les loci de Bolt's Farm Cave System. Nous avons reconnu trois catégories de 'lion' : *Panthera leo* (X Cave), *Panthera* cf. *leo* (Aves Cave I, Bridge Cave, Brad Pit A et Waypoint 32) et *Panthera* aff. *P. leo* (Bridge Cave I et X Cave). Le léopard est représenté par l'espèce actuelle, *Panthera pardus* (Bridge Cave), et *Panthera* cf. *pardus* (Aves Cave I, Brad Pit A, Brad Pit B et Bridge Cave). D'autres spécimens n'ont pu être déterminés aussi précisément. On retrouve donc des fossiles de Pantherinae à Aves Cave I et Cobra Cave, de *Panthera* sp. à Aves Cave II, Brad Pit A et Bridge Cave et de cf. *Panthera* à Aves Cave I, Brad Pit A, Brad Pit B, Femur Dump et Bridge Cave. Les petites formes de Felidae sont représentées par un cf. *Caracal* (Aves Cave, Brad Pit A, Femur Dump and X Cave), mais aussi par des chats comme *Felis sylvestris* (le chat sauvage) et *Felis* sp. à Aves Cave et Bridge Cave, et *Felis* cf. *sylvestris* à Bridge Cave. Les fouilles anciennes avaient livré des restes de *Dinofelis barlowi* (Werdelin et Peigné, 2010) ainsi que de *Felis shawi* (ce dernier taxon a été remplacé par la suite par *Panthera leo*). Ici, nous utilisons la dénomination *Panthera* aff. *P. leo* pour désigner les spécimens ressemblant au lion mais de taille inhabituelle.

La famille des Canidae est représentée par : *Canis mesomelas* (le chacal) est présent à Bridge Cave, et *Canis* cf. *mesomelas* a été découvert à Aves Cave I, Bridge Cave, Garage Ravine Cave et X Cave. *Canis* sp. a été identifié à Bridge Cave et Aves Cave I. Des spécimens plus problématiques d'Aves Cave I et de Cobra Cave ont été rapportés simplement aux canidés. Les restes de petits canidés ont été rapportés à des formes de renards, *Vulpes* cf. *chama* à Brad Pit A et cf. *Vulpes* à Brad Pit A et Bridge Cave. Comme pour les Hyaenidae, aucune espèce de canidé n'a été reconnue précédemment à BFCS (Werdelin et Peigné, 2010).

Les petits carnivores sont représentés par des suricates, *Suricata suricatta* (à Bridge Cave et cf. *Suricata* à X Cave), et des Herpestidae (mangoustes) à Aves Cave I. Les fouilles anciennes avaient livré une forme de mangouste fossile, *Crossarchus transvaalensis*, ainsi qu'un mustélidé fossile, *Prepoecilogale botli* (Werdelin and Peigné, 2010).

3.3.4 Les bovidés

Les anciennes collections de BFCS présentent de rares restes de bovidés. Les nouvelles fouilles commencent à livrer une collection plus importante de restes dont l'étude apporte petit à petit des informations. Actuellement, les bovidés sont très diversifiés en Afrique du Sud. La plus grande espèce est représentée par l'Eland du Cap (*Taurotragus oryx*) dont le poids des plus grands mâles dépasse 900 kg (plus que le buffle africain) et les deux plus petites espèces sont le Suni (*Nesotragus moschatus*) avec un poids compris entre 5,1 et 6,8 kg et le Céphalophe bleu (*Philantomba (Cephalophus) monticola*) dont le poids varie entre 3,5 et 6 kg (Stuart C. et M., 2015). Ils vivent dans des milieux très divers, des zones arides du Nord-Est aux forêts côtières de l'Ouest, en passant par les régions montagneuses et rocailleuses.

Dans l'échantillon des fossiles des différents loci de BFCS, on retrouve un fort gradient de taille puisque des restes d'Eland ont été découverts à Garage Ravine Cave (Badenhorst *et al.*, 2011) et à X Cave (van Zyl *et al.*, 2016) mais aussi des bovidés de petite taille appartenant aux genres *Raphicerus* et *Oreotragus* dont les représentants actuels pèsent autour de 10 kg. Ces deux derniers genres ont été découverts à Aves Cave I et Brad Pit B mais également à X Cave (van Zyl *et al.*, 2016).

L'antilope la plus emblématique de l'Afrique du Sud reste le Springbok (*Antidorcas marsupialis*). On connaît peu de choses sur l'histoire évolutive de cette antilope. Dans les sites

plio-pléistocènes du Cradle of Humankind, des restes de l'espèce actuelle ont été découverts ainsi que ceux de deux espèces fossiles (*A. bondi* et *A. recki*) (Brain, 1981). Des restes d'*A. recki* sont présents à Aves Cave I et à Milo A ; ils peuvent être considérés comme parmi les plus anciens, voire les plus anciens, pour cette espèce en Afrique du Sud. Ils proviennent de niveaux géologiques qui ont entre 3 et 2,5 millions d'années. Cette espèce fossile est connue en Afrique de l'Est au Pliocène Moyen et évolue probablement en *A. marsupialis* juste après le Pléistocène inférieur (Gentry, 2010 ; Gentry et Gentry, 1978). *A. recki* semble présenter une tolérance alimentaire plus large que l'espèce actuelle (Peters *et al.*, 2008).

Le Gnou est l'un des bovidés africains des plus connus du grand public. Il existe deux espèces actuelles en Afrique du Sud, le gnou bleu (*Connochaetes taurinus*) qui est le plus largement répandu car il existe aussi en Afrique de l'Est (célèbre par ses grandes migrations), et le gnou à queue blanche (*Connochaetes gnou*) inféodé à l'Afrique du Sud uniquement. Il semble présent à X Cave même si l'espèce n'a pas pu être précisée (van Zyl *et al.*, 2016). A Aves Cave I, les dimensions des restes dentaires coïncident avec celle de *C. gentryi* de l'Est Turkana au Kenya. Cette espèce fossile est connue aussi à l'Ouest Turkana (Kenya) et à Olduvai (Tanzanie). Cette espèce semble s'étendre de la fin du Pliocène jusqu'au Pléistocène inférieur ; aucun reste de moins de 1,5 million d'années n'a été découvert (Harris, 1991 ; Harris *et al.*, 1988 ; Gentry, 2010). Cette espèce est considérée comme partageant de nombreuses adaptations avec les gnous actuels pour brouter des herbes rases (Peters *et al.*, 2008). La présence de *C. gentryi* indique l'existence d'une prairie.

3.4 Biochronologie

Il existe plusieurs façons de dater les sites, soit par la faune ou biochronologie (datations relatives), soit par des méthodes physiques (datations absolues). Toutes ces méthodes se complètent et il est préférable d'avoir des datations par différentes méthodes pour éviter certains biais ou anomalies possibles. Les premières dates pour un site sont pratiquement toujours obtenues à partir de la faune et permettent de choisir les méthodes physiques appropriées pour l'intervalle de temps supposé correspondre à la période des dépôts géologiques. La biochronologie repose sur le temps de vie d'une espèce. Chaque espèce évolue au cours du temps (intervalle de vie d'une espèce) en une ou de nouvelles espèces, mais elle peut aussi disparaître sans descendance. La biochronologie va se baser sur un assemblage d'espèces qui sont de bons marqueurs chronologiques (évoluent vite). Pour les périodes qui nous intéressent à BFCS, il s'agit surtout des suidés (cochons), des équidés (chevaux et zèbres) et des rongeurs. Chaque espèce évolue séparément et ne se retrouvent ensemble que pendant des périodes plus ou moins longues ce qui permet d'affiner l'intervalle de temps correspondant aux niveaux fossilifères. Par exemple, pour un site, il y a une espèce A qui est connue entre 5 et 3 millions d'années, et une espèce B présente entre 4 et 2 millions d'années. L'espèce A et B ont coexisté entre 4 et 3 millions d'années. Ce dernier intervalle de temps correspond à l'âge potentiel du site. Plus il y aura d'espèces et plus on pourra affiner cet intervalle.

Par rapport à l'Afrique de l'Est, les équidés ne sont pas d'aussi bons marqueurs pour les sites sud-africains. Ceci est dû à la persistance tardive des hipparions (équidés qui présentent deux doigts vestigiaux qui se situent de chaque côté du doigt principal) et qui sont placés dans le genre *Eurygnathohippus*. Les derniers représentants pour ce genre ont été découverts dans un niveau du site de Cornelia-Uitzoek daté entre 990 000 et 780 000 ans (Brink *et al.*, 2012), donc plus récent que les dépôts géologiques étudiés à BFCS. Par contre le genre *Equus* qui regroupe les chevaux, les ânes et les zèbres semble être un bon marqueur. Ce genre ne semble connu en Afrique qu'à partir de la partie inférieure du Membre G de la Formation de Shungura

dans le Bassin de l'Omo en Ethiopie qui est daté de $2,33 \pm 0,03$ millions d'années (Bernor *et al.*, 2010 ; Eisenmann, 1976 ; Hooijer, 1976 ; Geraads *et al.*, 2004)

Les suidés sont de très bons marqueurs biochronologiques et ils ont été essentiels pour dater le remplissage karstique d'Aves Cave I. Deux espèces sont reconnues (*Potamochoeroides hypsodon* et *Notochoerus capensis*) (Pickford et Gommery, 2016). Il existe un autre site sud-africain qui présente ces deux suidés associés, il s'agit de Makapansgat Limeworks situé dans le Nord-Ouest de l'Afrique du Sud. Ils proviennent des Membres 3 et 4 qui sont datés entre environ 3 et 2,5 millions d'années (Herries *et al.*, 2013 ; Pickford, 2006). Le remplissage d'Aves Cave I est probablement du même âge.

Les rongeurs sont également de très bons marqueurs biochronologiques partout dans le monde. Malheureusement, pour l'Afrique du Sud, la grande majorité des espèces semblent se trouver en stase morphologique (au niveau de la denture en tout cas) à partir de la fin du Pliocène supérieur. A l'exception de quelques taxons fossiles (par exemple *Dasymys bolti* ou *Proodontomys cookei*) qui semblent s'éteindre vers la fin du Pléistocène inférieur (Sénégal, 2000) et de possibles chrono-espèces (par exemple *Mystromys hausleitneri* ou *Otomys gracilis*), la faune actuelle de rongeurs semble se mettre en place à la fin du Pliocène supérieur, ce qui la rend difficilement exploitable à des fins biochronologiques pour les périodes les plus récentes. Néanmoins, le gisement de Waypoint 160 a livré une faune inédite pour le Cradle of Humankind, ayant des affinités fortes avec le gisement pliocène inférieur de Langebaanweg (Sénégal, 2000). La découverte, en particulier, d'une deuxième espèce d'*Euryotomys* (Sénégal et Avery, 1998) plus évoluée que l'espèce décrite par Pocock (1976) à Langebaanweg, a permis de replacer Waypoint 160 entre ce site et le Membre 3 de Makapansgat, daté entre 3 et 2,5 millions d'années (Herries *et al.*, 2013). Bolt's Farm est donc l'hôte du plus ancien site du Cradle of Humankind. Si les périodes plus récentes sont difficiles à caractériser par la faune de rongeurs, le Pliocène présente des taxons éteints qui le rendent facilement identifiable.

4. Etudes géologiques et géochimiques

4.1. L'étude du karst

Depuis 2012, des études géologiques et géochronologiques sont entreprises à BFCS suivant une approche multi-disciplinaire. Tous les dépôts des BFCS sont situés dans des dolomies du Néoarchéen (roches calcaires datées entre 2,6 à 2,8 milliards d'années). Les loci de BFCS présentent le même aspect morphologique existant dans de nombreux sites du Cradle of Humankind. Ils sont constitués à la fois de dépôts internes de grottes ainsi que des sections issues de l'effondrement et de l'érosion de celles-ci (Figure 11). Il y a aussi différentes séquences stratigraphiques plus discrètes qui se forment entre les parois des grottes et les remplissages sédimentaires, il s'agit de spéléothèmes qui présentent différentes morphologies (stalactites, stalagmites, etc.). La formation de ces spéléothèmes nécessite des conditions chimiques particulières qui existent durant la période avant l'ouverture de la grotte. Après son ouverture avec la surface, ce système a été alimenté par les sédiments provenant de diverses entrées qui se sont formées au cours du temps. La base de la séquence des remplissages repose alors sur un plancher dolomitique recouvert de spéléothèmes. Plusieurs générations de remplissages se sont formées avec des morphologies différentes suivant la localisation de l'entrée (flux de sédiments).



Figure 11 Un exemple de site fossilifère à Bolt's Farm Cave System : Milo A durant la fouille d'avril-mai 2016 (photographie : D. Gommery)

Sous ou à proximité d'une ouverture, un cône d'éboulis apparaît avec l'accumulation de sédiments, de pierres, de graviers et de fossiles. En général, le matériel lourd comme les grosses pierres ou les os restent où ils sont tombés ; ce n'est pas le cas pour les petits éléments. Les dépôts du cône d'éboulis sont entourés par des dépôts bien stratifiés, formés par de fines couches limoneuses et sableuses, qui présentent un faible angle de pendage. Ces dépôts plus fins conservent souvent des restes abondants de microfaune (Figure 12). Certains ont pu être transportés par l'eau et il existe alors une sélection de la répartition de ces restes suivant leur nature morphologique. Les dépôts de cône eux-mêmes peuvent également recouvrir d'autres plus anciens suivant une succession cyclique de remplissages.

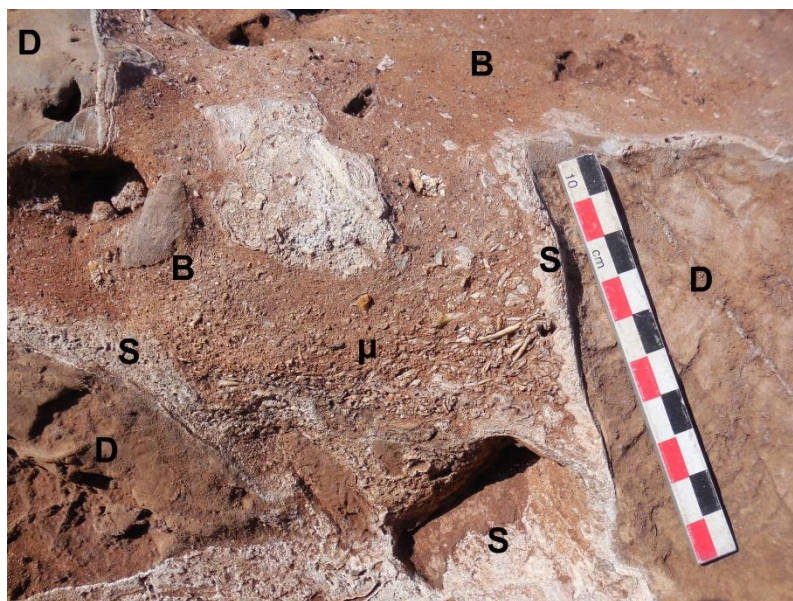


Figure 12 Détail d'un remplissage à Milo A (Bolt's Farm Cave System). B, brèche ; D, dolomie ; S, spéléothème ; μ , microfaune. (photographie : D. Gommery)

Suivant la terminologie de Moriaty *et al.* (2000), les dépôts de BFCS sont constitués de sédiments clastiques bien stratifiés entrecoupés de niveaux de spéléothèmes, formant ainsi des unités stratigraphiques bien individualisées (flowstone bounded units ou FBU), comme dans le site de Gladysvale (situé dans le nord du berceau de l'humanité) et mises en évidence par Pickering *et al.* (2007). La reconnaissance de ces séquences d'unités stratigraphiques est importante car elle permet de faire des corrélations avec d'autres sites du Cradle of Humankind (Adams *et al.*, 2010 ; Pickering *et al.*, 2011).

Différentes méthodes de datations physiques ont été utilisées sur des sédiments, des spéléothèmes et des dents pour replacer chronologiquement les événements liés à la mise en place des dépôts fossilifères des grottes (Herries et Shaw, 2011 ; Pickering *et al.*, 2011). Actuellement, un certain nombre de datations de spéléothèmes a été obtenu par la méthode U-Pb (Uranium-Plomb). Les datations ESR (Résonance de spin électronique) sur des dents sont en cours. En outre, les études paléomagnétiques préliminaires ont été effectuées et viennent compléter les estimations d'âges données par les méthodes physiques et la faune. Les études paléomagnétiques identifient les anciennes directions du champ magnétique terrestre qui se retrouvent en quelque sorte 'fossilisées' dans les sédiments et les spéléothèmes des grottes. Ceci a permis de confirmer l'âge Pliocène de certains loci de BFCS, soit un âge plus ancien que 2,6 millions d'années. Cette période est rarement représentée dans les archives fossiles d'Afrique du Sud.

Sous l'effet de l'érosion, les plus anciennes grottes ont souvent disparu du paysage. Il est donc nécessaire de comprendre pourquoi d'aussi anciens remplissages sont préservés dans des zones comme BFCS, mais également quelles sont les modalités de formation des grottes à des endroits spécifiques dans la dolomie. Notre approche, à BFCS, combine à la fois une numérisation laser 3D des grottes elles-mêmes ainsi que la modélisation des surfaces exposées grâce à des relevés obtenus par la méthode de photogrammétrie et une cartographie GPS différentiel. L'ensemble des données conduira à la création d'une carte complète de la zone et des cavités karstiques de BFCS permettant ainsi d'évaluer les relations entre les différents loci. Il sera ainsi possible de corréler les loci actuellement fouillés et/ou étudiés avec les cavités repérées lors de la première cartographie de BFCS effectuée entre 1947 et 1948 par l'University of California Expedition.

L'utilisation d'un radar à pénétration de sol ou RPS (Ground Penetrating Radar ou GPR en Anglais) permet d'observer la géologie structurale cachée de BFCS. Le RPS est un appareil géophysique qui envoie des ondes électromagnétiques dans le sol. Ces ondes sont renvoyées vers la surface lorsqu'elles rencontrent des changements dans le sous-sol (roche différente, cavité...). Ce travail permet également d'identifier les grottes qui n'ont pas d'ouverture avec l'extérieur ou qui ont disparu suite à des effondrements. Les lignes de faille peuvent être mises en évidence, le long desquelles les cavités karstiques peuvent se former. Un certain nombre de très grandes structures liées à des failles a pu être ainsi identifié et expliquerait la présence de ce système karstique ainsi que sa profondeur. Ces caractéristiques permettent de comprendre la présence de dépôts anciens du Pliocène car seuls ces derniers ont pu pénétrer aussi profondément dans la dolomie et échapper ainsi à l'érosion.

Les futures recherches vont également se pencher sur des études à plus petite échelle via des analyses micromorphologiques qui pourront être corrélées à des études taphonomiques des faunes afin de comprendre l'histoire des remplissages des grottes. La lecture microstratigraphique des unités sédimentaires permet en effet d'identifier finement les différents types de dépôts (éboulis, coulées de débris, transport alluvial, phases éoliennes), ainsi

que leur dynamique de mise en place, apportant des données sur les vitesses d'enfouissement, liées à l'activité du système karstique et ses relations avec le milieu extérieur, de même que les lacunes érosives ou tronçatures qui pourront être également mises en évidence. L'impact des phénomènes post-dépositionnels (percolation, altération ou précipitation) permettra de mieux connaître les conditions de fossilisation et identifier des épisodes paléoclimatiques marquants. Les épisodes de formations de sols liés à l'exhumation de ces dépôts souterrains pourront également être appréhendés au travers de la bioturbation enregistrée dans ces sédiments. Tous ces éléments contribuent à la compréhension de la genèse du dépôt et de son évolution, et permettent une validation des données paléoclimatiques, et de datation par les techniques radiochronologiques ou du paléomagnétisme. En effet, certains sédiments étudiés lors de l'analyse du paléomagnétisme présentent un certain degré d'altération minéralogique qui a affecté le signal magnétique enregistré. Ces études sont donc importantes afin d'être certain que l'enregistrement soit bien celui du champ magnétique passé de la Terre lors du dépôt et non pas qu'il soit issu d'événements d'altérations plus récents. Seule une telle analyse multidisciplinaire aussi détaillée peut nous permettre d'être certains des âges et de l'histoire de formation des dépôts fossilifères dans les grottes.

4.2 Reconstitution des données éco-climatiques à partir des études isotopiques du carbone et de l'oxygène

L'étude des rapports des isotopes stables de l'oxygène et du carbone en domaine continental mesurés sur les restes fossiles se révèle utile pour déterminer à la fois la végétation présente dans les écosystèmes, l'écologie des faunes et l'évolution du climat. Cette approche appliquée aux séries du Mio-Pliocène d'Afrique a été documentée pour l'étude des environnements plio-pléistocènes à hominidés en Afrique orientale comme au Kenya et en Ethiopie (Cerling *et al.*, 2011 ; Levin *et al.*, 2006 ; Roche *et al.*, 2013 ; White *et al.*, 2009), en Afrique centrale comme au Tchad (Zazzo *et al.*, 2000) ou en Afrique du Sud (Sponheimer et Lee-Thorp, 1999). Elle a permis, entre autres, de mettre en évidence l'abondance ou non des graminées tropicales C4 dans les milieux. La distribution des arbres, arbustes, graminées C4/C3 est sous le contrôle de paramètres climatiques tels que la température, l'humidité et l'insolation durant les phases de croissance des plantes. De plus leur rapport isotopique en carbone diffère également de façon drastique : $-27\text{‰}\pm 2$ pour les plantes en C3 et $-12\pm 1\text{‰}$ pour les plantes en C4. En tenant compte du filtre métabolique, l'émail dentaire des grands mammifères herbivores présente un enrichissement de l'ordre de 12 ‰ à 14 ‰ par rapport à la nourriture ingérée. Ainsi on peut déterminer quels types de plantes composent leur régime alimentaire. Pour l'oxygène, leurs valeurs isotopiques reflètent la composition isotopique de l'eau de boisson et/ou celle de l'eau contenue dans les feuilles (cette dernière pouvant être très enrichie en ^{18}O sous l'effet de l'évapo-transpiration).

Le site de Makapansgat Limeworks (situé au Nord de l'Afrique du Sud) présente les premiers indices d'une consommation de plante en C4 par des rongeurs (Hopley *et al.*, 2006). Les niveaux fossilifères les plus anciens de ce site sont actuellement datés entre 3 et 2,5 millions d'années (Herries *et al.*, 2013) et ont livré les plus anciens hominidés d'Afrique du Sud. Hopley *et al.* (2007) ont identifié des pollens de plantes en C4 provenant de spéléothèmes de Makapansgat Limeworks datés d'environ 4 millions d'années. Il existe des débats concernant l'apparition des plantes en C4 dans cette partie de l'Afrique du Sud (Ségalen *et al.*, 2007). Elles semblent absentes à Langebaanweg (Province du Cap), daté d'environ 5,1 millions d'années, mais ce site se trouve dans une zone différente pour la saison des pluies (pluie d'hiver australe). En effet, le site de Makapansgat Limeworks et le Cradle of Humankind, et donc BFCS, se situent à l'Est de l'Afrique du Sud où il existe un autre système saisonnier pour les précipitations

(pluie d'été australe (environ entre octobre et mars)). Les études isotopiques en cours pour les différents loci de BFCS devraient permettre de mettre en évidence l'évolution de l'environnement entre 4,5-4 à 0,9 million d'années dans cette partie de l'Afrique du Sud. Les résultats escomptés devraient servir de base de référence pour l'ensemble des sites du Cradle of Humankind.

Il est potentiellement possible d'observer des différences régionales. Makapansgat Limeworks et BFCS sont situés dans la même zone de précipitations saisonnières mais les environnements actuels sont différents. Aves Cave I à BFCS présente probablement des niveaux de même âge que les Membres 3 et 4 de Makapansgat Limeworks. Il existe, dans ces mêmes niveaux, des suidés présentant des molaires hypsodontes (*Potamochoeroides hypsodon* et *Notochoerus capensis*) (Pickford, 2006, 2012, 2013a, 2013 b ; Pickford et Gommery, 2016). L'hypsodontie est une stratégie pour augmenter la durée de vie d'une dent au cours du temps afin de consommer préférentiellement une plus grande quantité de graminées tropicales C4. Pour les deux taxons précédents, le degré d'hypsodontie n'a pas atteint celui des molaires du phacochère actuel ou d'autres suidés africains du Pléistocène. Le degré d'hypsodontie traduit en quelque sorte une évolution de l'environnement. Si *Potamochoeroides hypsodon* et *Notochoerus capensis* sont présents dans les deux sites, cela implique-t-il que les conditions environnementales sont exactement les mêmes ? Les analyses isotopiques pourront peut-être le préciser.

L'étude isotopique de restes biologiques des milieux anciens étant basée sur le principe de l'actualisme il est nécessaire de comprendre les modalités d'enregistrement d'un signal environnemental. Des perturbations à la fois chimiques et cristallographiques (structure de la bioapatite) se produisent au cours de la fossilisation en relation avec les circulations des fluides diagenétiques dans la porosité des sédiments encaissants (i.e. Roche *et al.*, 2010 ; Ségalen *et al.*, 2008). Il sera donc nécessaire de connaître les modifications éventuelles liées à la diagenèse du matériel squelettique en fonction de la taphonomie propre aux différents milieux sédimentaires concernés, ici des karsts plus ou moins profonds, mais aussi peut-être au cours du temps puisque Bolt's Farm Cave System présente des dépôts dont les âges s'échelonnent de 4,5-4 à 0,9 million d'années environ.

4.3 Fossilisation des apatites biologiques : approches cristallochimiques et applications géochimiques

Les reconstitutions paléoenvironnementales et paléoclimatiques effectuées à partir de l'étude de la composition chimique et isotopique des restes de vertébrés fossiles dépendent crucialement de leur degré de préservation. Cette préservation est assurée par la relative résistance aux processus de dissolution et d'altération de leur composant inorganique principal, l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) carbonatée. Ainsi la composition isotopique des carbonates structuraux de l'émail dentaire délivre des informations sur le régime alimentaire des vertébrés ($\delta^{13}\text{C}$) et sur leur eau de boisson ($\delta^{18}\text{O}$). Cependant des travaux récents ont permis d'identifier des changements majeurs de l'environnement à l'échelle atomique des carbonates structuraux d'émail dentaire provenant de sites à hominidés d'Afrique de l'Est (Yi *et al.*, 2014), impliquant un processus de dissolution puis recristallisation de fluorapatite carbonatée. Cette nouvelle phase présente un environnement spécifique du carbonate faisant intervenir une compensation de charge locale par un ion fluorure et aisément identifiable par spectroscopie infrarouge (Yi *et al.*, 2013). Une meilleure compréhension de ces processus encore mal connus de transformations cristallochimiques des apatites biologiques au cours de la fossilisation, en particulier le mécanisme d'échange du carbonate avec la solution, est donc indispensable pour

s'assurer de la préservation du signal isotopique originel et valider les enregistrements géochimiques des bio-apatites.

L'objectif de l'étude réalisée dans le cadre d'une thèse vise, d'une part, à améliorer notre connaissance de la structure déficiente des apatites biologiques et, d'autre part, à identifier les mécanismes d'altération impliqués par la fossilisation ainsi que leur effet potentiel sur la composition chimique et isotopique du matériau biologique. Il s'agit notamment de préciser les modes d'incorporation du fluor et le comportement des carbonates par des expériences d'altération en conditions contrôlées et de procéder en parallèle à l'étude d'échantillons naturels issus d'un contexte de fossilisation karstique, plus précisément de l'aire fossilifère de BFCS.

Le cœur de cette approche consiste à sonder les transformations du matériau biologique à l'échelle atomique en associant des mesures par spectroscopies vibrationnelles (FTIR et Raman) et par spectroscopie RMN du solide (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , ^{43}Ca), permettant d'obtenir une information chimiquement sélective sur l'environnement de groupes moléculaires spécifiques tels que les carbonates, à des observations microscopiques (MEB, micro-spectrométrie infrarouge ATR, micro-spectrométrie Raman). Les observations expérimentales sont interprétées en termes de modifications de l'organisation à l'échelle atomique ou mésoscopique des matériaux (Aufort *et al.*, 2016), notamment à l'aide de modélisations *ab initio* utilisant la Théorie de la Fonctionnelle de la Densité (DFT).

Une meilleure connaissance de la variabilité cristallographique des bio-apatites permettra une analyse plus fine des données acquises sur les échantillons fossiles de BFCS. Les résultats obtenus sur les faunes continentales de BFCS seront à mettre en perspective avec ceux obtenus sur les échantillons d'Afrique de l'Est, plus anciens et issus d'un contexte de fossilisation différent, afin de mettre en lumière le rôle de ce dernier sur la transformation du matériau biologique.

5. Conclusion

Pour mieux comprendre l'évolution des primates, il est essentiel d'avoir le maximum de données sur le contexte de leur découverte pour mieux tenter de les intégrer dans un paléoenvironnement le plus précis possible mais aussi pour les situer dans le temps. Pour pouvoir le faire, des spécialistes de différentes disciplines se sont associés et expérimentent de nouvelles voies de recherches qui commencent dès le terrain et se terminent dans les laboratoires avec des techniques qui explorent la composition des roches, des sédiments et des restes fossiles. BFCS constitue un laboratoire expérimental de grande taille. Il est le seul en Afrique australe à présenter une séquence chronologique aussi longue, qui s'étend sur plus de 3 millions d'années, même si pour l'instant elle apparaît discontinue. C'est aussi à BFCS qu'il y a les plus anciens niveaux fossilifères du Cradle of Humankind. Il est probablement possible de faire dans le futur des comparaisons avec les données connues en Afrique de l'Est. On pourra peut-être comprendre les ressemblances ou les différences entre ces deux régions africaines au cours du temps, les impacts des changements climatiques sur l'environnement (synchronie ou non), la mise en place de la biodiversité actuelle, les migrations entre les deux régions et leurs sens mais également identifier l'évolution sur place pour certains groupes. Toutes ces données vont nous permettre de mieux comprendre l'évolution et la diversification des Cercopithecoidea en Afrique australe mais aussi en Afrique de l'Est ; il en sera de même pour les hominidés.

Remerciements

Nous tenons à remercier C. Klinkert et J. Gaylord de nous avoir accordé l'accès à leur propriété durant toutes ces années, nos collègues qui nous apportent régulièrement des conseils (R. Joannes-Boyau, T. Kearney, M. Pavia, R. Pickering, S. Potze et B. Senut), les étudiants de l'University of South Africa (UNISA) et les techniciens qui se sont succédés au DNMNH et qui ont participé aux recherches de terrain, SAHRA (South African Heritage Resources Agency) qui nous a livré les permis de fouille, le bureau du CNRS-IRD-CIRAD à Prétoria (A. Corval, Y. Savidan & J. Albergel) pour le soutien et l'aide apportée sur place, et l'Ambassade de France en Afrique du Sud dont le soutien administratif et financier a permis de développer les recherches à Bolt's Farm Cave System et, en particulier, de mettre en place le laboratoire de préparation au Ditsong National Museum of Natural History. Les différents projets ont été et sont financés par le CNRS-INEE, le DNMNH, la NRF (National Research Foundation), le projet Convergence@Sorbonne Universités-Société et environnement : savoir et enjeux-AFATEMPS (AFrique Australe : Transitions Environnementales Mio-PliocèneS) et le Ministère des Affaires Etrangères et du Développement International (Sous-Direction de la recherche et des échanges scientifiques – Pôle sciences humaines et sociales), ainsi que les institutions d'appartenance des auteurs.

Bibliographie

- Adams JW, Herries AIR, Hemingway J, Kegly A, Kgazi L, Hopley P, Reede H, Potze S, Thackeray JF (2010). Initial fossil discoveries from Hoogland, a new Pliocene primate-bearing karstic system in Gauteng Province, South Africa, South Africa. *J Hum Evol* 59, 685-691. doi : 10.1016/j.jhevol.2010.07.021
- Alexander G, Marais J (2007). *A guide to the Reptiles of Southern Africa*. Cape Town: Struik Nature.
- Andrews PJ (1990). *Owls, Caves and Fossils*. London: Natural History Museum Publications.
- Aufort J, Ségalen L, Gervais C, Brouder C, Balan E (2016). Modeling the attenuated total reflectance infrared (ATR-FTIR) spectrum of apatite. *Phys Chemi Minerals* doi : 10.1007/s00269-016-0821-x
- Badenhorst S, Sénégas F, Gommery D, Potze S, Kgasi L, Thackeray JF (2011). Pleistocene faunal remains from Garage Ravine Cave on Bolt's Farm in the Cradle of Humankind, South Africa. *Ann Ditsong Nat Mus Nat Hist* 1, 33-40.
- Bernor RL, Armour-Chelu MJ, Gilbert H, Kaiser TM, Schulz E (2010). Equidae. In *Cenozoic Mammals of Africa* (Werdelin LW, Sanders WJ, editors). Berkeley: University of California Press. pp 685-721. doi : 10.1525/california/9780520257214.003.0035
- Branch WR (2005). *A Photographic Guide to the Snakes and other Reptiles and Amphibians of East Africa*. Cape Town: Struik Nature.
- Brain CK (1981). *The Hunters or the Hunted? An Introduction to African Cave Taphonomy*. Londres: The University of Chicago Press.
- Brink JS, Herries AIR, Moggi-Cecchi J, Gowlett JAJ, Bousman CB, Hancox JP, Grün R, Eisenmann V, Adams JW, Roussow JW (2012). First hominine remains from a ~1.0 million year old bone bed at Cornelia-Uitzoek, Free State Province, South Africa. *J Hum Evol* 63, 527-535. doi : 10.1016/j.jhevol.2012.06.004
- Broom R (1937). Notices of a few more new fossil mammals from the caves of Transvaal. *Ann Mag Nat Hist* 20(10), 509-514.
- Broom R (1939). A preliminary account of the Pleistocene carnivores of the Transvaal caves. *Ann Trans Mus* 19, 331-338.

- Broom R (1950). *Finding the Missing Link*. Londres: Watts and Co.
- Camp CL (1948). University of California Expedition – Southern Section. *Science* 108, 550-552. doi : 10.1126/science.108.2812.550
- Cerling TE, Wynn JG, Andanje SA, Bird MI, Korir DK, Levin NE, Mace W, Macharia AN, Quade J, Remien CH (2011). Woody cover and hominin environments in the past 6 million years. *Nature* 476, 51-56. doi : 10.1038/nature10306
- Cooke HBS (1991). *Dinofelis barlowi* (Mammalia, Carnivora, Felidae) cranial material from Bolt's Farm, collected by the University of California African Expedition. *Palaeont afr* 28, 9-21.
- Dawson P, Alexander GJ, Nicholls S (1991). The rinkhals (*Hemachatus haemachatus*) a southern African venomous snake-housing, husbandry and maintenance. *Animal Technology* 42, 71-76
- De Graaff G (1981). *The Rodents of Southern Africa*. Butterworths: Durban, Pretoria.
- Delson E (1984). Cercopithecoid biochronology of the African Plio-Pleistocene: correlation among eastern and southern hominid-bearing localities. *Cour Forsch Inst Senckenberg* 69, 199-218.
- Eisenmann V (1976). Equidae from the Shungura Formation. In *Earliest Man and Environment in the Lake Rudolf Basin* (Coppens Y, Clark Howell F, Isaac GL, Leakey R, editors). Chicago: University of Chicago Press. pp 225-233.
- Freedman L (1957). The fossil Cercopithecoidea of South Africa. *Ann Trans Mus* 23, 121-262.
- Freedman L (1965). Fossil and subfossil primates from the Limestone deposits at Taung, Bolt's Farm and Witkrans, South Africa. *Palaeont afr* 9, 19-48.
- Freedman L (1970). A new check-list of fossil Cercopithecoidea of South Africa. *Palaeont afr* 13, 109-110.
- Freedman L (1976). South African fossil Cercopithecoidea: a re-assessment including a description of new material from Makapansgat, Sterkfontein and Taung. *J Hum Evol* 5, 297-315. doi : 10.1016/0047-2484(76)90033-6
- Frost SR (2001). Fossil Cercopithecidae of the Afar Depression, Ethiopia: Species systematics and comparison to the Turkana Basin. PhD: City University of New York. pp 1-463.
- Gentry AW (2010). Bovidae. In *Cenozoic Mammals of Africa* (Werdelin LW, Saunders WJ, editors). Berkeley: University of California Press. pp 741-796. doi : 10.1525/california/9780520257214.003.0038
- Gentry AW, Gentry A (1978). Fossil Bovidae (Mammalia) of Olduvai Gorge, Tanzania. Part I. *Bull British Mus Nat Hist* 29, 290-446.
- Geraads D, Raynal JP, Eisenmann V (2004). The earliest human occupation of North Africa: a reply to Sahnouni *et al.* (2002). *J Hum Evol* 46, 751-761. doi : 10.1016/j.jhevol.2004.01.008
- Gommery D, Bento Da Costa L (2016). Les primates non-humains pliocènes et plio-pléistocènes d'Afrique du Sud. *Revue de primatologie* 7.
- Gommery D, Badenhorst S, Sénégas F, Potze S, Kgasi L, Thackeray JF. (2012). Preliminary results concerning the discovery of new fossiliferous sites at Bolt's Farm (Cradle of Humankind, South Africa). *Ann Ditsong Nat Mus Nat Hist* 2, 33-45.
- Gommery D, Sénégas F, Potze S, Kgasi L (2014a). Les primates non-humains fossiles de Bolt's Farm (Afrique du Sud). Contexte, recherches actuelles et perspectives. *Bull Mém Soc Anthropol Paris* 26, 184-189. doi : 10.1007/s13219-014-0104-3
- Gommery D, Sénégas F, Potze S, Kgasi L, Thackeray JF (2014b). Cercopithecoidea material from the Middle Pliocene site, Waypoint 160, Bolt's Farm, South Africa. *Ann Ditsong Nat Mus Nat Hist* 4, 1-8.

- Gommery D, Sénégas F, Thackeray JF, Potze, Kgasi L, Claude J, Lacruz R (2008a). Plio-Pleistocene fossils from Femur Dump, Bolt's Farm, Cradle of Humankind World Heritage Site. *Ann Trans Mus* 45, 67-76.
- Gommery D, Thackeray JF, Sénégas F, Potze S, Kgasi L (2008b). The earliest primate (*Parapapio sp.*) from the Cradle of Humankind World Heritage Site (Waypoint 160, Bolt's Farm, South Africa). *S Afr J Sci* 104, 405-408.
- Gommery D, Thackeray JF, Sénégas F, Potze S, Kgasi L (2008c). The earliest primate (*Parapapio sp.*) from the Cradle of Humankind World Heritage Site (Waypoint 160, Bolt's Farm, South Africa). *S Afr J Sci* 104, 405-408.
- Gommery D, Thackeray JF, Sénégas F, Potze S, Kgasi L (2009). Additional fossils of *Parapapio sp.* From Waypoint 160 [Bolt's Farm, South Africa], dated between 4 and 4.5 million years ago. *Ann Trans Mus* 46, 63-72.
- Grine FE, Hendery QB (1981). Earliest primate remains from South Africa. *S Afr J Sci* 77, 374-376.
- Hager HA (1998). Area-sensitivity of reptiles and amphibians: Are there indicator species for habitat fragmentation? *Ecoscience* 5, 139-147. doi : 10.1080/11956860.1998.11682463
- Harris JM (1991). Family Bovidae. In *Koobi Fora Research Project, vol 3* (Harris JM, editor). Oxford: Clarendon Press. pp 139-320.
- Harris JM., Brown FH, Leakey MG (1988). Stratigraphy and Paleontology of Pliocene and Pleistocene localities West of Lake Turkana, Kenya. *Con. S. Nat. His. Mus. Los Angeles County* 399, 1-128.
- Herries AIR, Shaw J (2011). Palaeomagnetic analysis of the Sterkfontein palaeocave deposits; age implications for the hominin fossils and stone tool industries. *J Hum Evolution* 60, 523-39. doi : 10.1016/j.jhevol.2010.09.001
- Herries AIR, Pickering R, Adams JW, Curnoe D, War G, Latham AG, Shaw J (2013). A multi-disciplinary perspective on the Age of Australopithecus in Southern Africa. In *The Paleobiology of Australopithecus. Vertebrate Paleobiology and Paleoanthropology series* (Reed K, Fleagle JG, Leakey RE, editors). Dordrecht: Springer Science + Business Media. pp. 21-40. doi : 10.1007/978-94-007-5919-0_3
- Hooijer DA (1976). Evolution of the Perissodactyla of the Omo Group deposit. In *Earliest Man and environment in the Lake Rudolf Basin* (Coppens Y, Clark Howell F, Isaac GL, Leakey R, editors). Chicago: University of Chicago Press. pp 209-213.
- Hopley PJ, Latham AG, Marshall JD (2006). Palaeoenvironments and palaeodiets of mid-Pliocene micromammals from Makapansgat Limeworks, South Africa: A stable isotope and dental microwear approach. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 233, 235-251. doi : 10.1016/j.palaeo.2005.09.011
- Hopley PJ, Marshall JD, Weedon GP, Latham AG, Herries AIR, Kuykendall KL (2007). Orbital forcing and the spread of C4 grasses in the late Neogene: stable isotope evidence from South African speleothems. *J Hum Evol* 53, 620-634.
- Jablonski NG, Frost S (2010). Cercopithecoidea. In *Cenozoic Mammals of Africa* (Werdelin LW, Sanders WJ, editors). Berkeley: University of California Press. pp 393-428
- Kuhn BF, Werdelin L, Steininger C (2016) Fossil Hyaenidae from Cooper's Cave and the palaeoenvironmental implications. *Palaeobiodiversity and Palaeoenvironments*.
- Kuykendall KL, Rae TC (2008). Presence of the maxillary sinus in fossil Colobinae (*Cercopithecoides williamsi*) from South Africa. *Anat Rec* 291, 1499-1505.
- Levin NE, Cerling TE, Passey BH, Harris JM, Ehleringer JR (2006). A stable isotope aridity index for terrestrial environments. *PNAS* 103, 11201-11205.

- Moriarty KC, McCulloch MT, Wells RT, McDowell MC (2000). Mid-Pleistocene cave fills, megafaunal remains and climate change at Naracoorte, South Australia: Towards predictive model using U-Th dating of speleothems. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 159, 113-143.
- Nishimura TD, Takai M, Senut B, Taru H, Maschenko EN, Prieur A (2012). Reassessment of *Dolichopithecus (Kanagawapithecus) leptopostorbitalis*, a colobine monkey from the Late Pliocene of Japan. *J Hum Evol* 62, 548-561.
- Peters CR, Blumenschine RJ, Hay RL, Livingstone DA, Marean CW, Harrison T, Armour-Chelu M, Andrews P, Bernor RL, Bonnefille R, Werdelin L (2008). Paleoeology of the Serengeti-Mara Ecosystem. In *Serengeti III: Human Impacts on Ecosystem Dynamics* (Sinclair ARE, Packer C, Mduma SAR, Fryxell Jm, editors). Chicago: University of Chicago Press. pp 47-94
- Pickering R, Dirks P, Jinnah Z, de Ruiter DJ, Churchill S., Herries AIR, Woodhead J, Hellstrom J, Berger LR (2011). *Australopithecus sediba* at 1.977 Ma and implications for the origins of the genus Homo. *Science* 333,1421-1423.
- Pickering R, Hancox PJ, Lee-Thorp JA, Grün R, Mortimer GE, McCulloch M, Berger LR (2007). The Stratigraphy, U-Th chronology, and paleoenvironments at Gladysvale Cave: insights into the climatic control of South African hominin-bearing cave deposits. *J Hum Evol* 53, 602-619
- Pickford M (2006). Synopsis of the biochronology of African Neogene and Quaternary Suiformes. *Trans Royal Soc S Afr* 61, 51-62.
- Pickford M (2012). Ancestors of Broom's Pigs. *Trans Royal Soc S Afr* 67, 17-35
- Pickford M (2013a). The diversity, age, biogeographic and phylogenetic relationships of Plio-Pleistocene suids from Kromdraai, South Africa. *Ann Ditsong Nat Mus Nat Hist* 3, 1-32.
- Pickford M (2013b). Locomotion, diet, body weight, origin and geochronology of *Metridiochoerus andrewsi* from the Gondolin karst deposits, Gauteng, South Africa. *Ann Ditsong Nat Mus Nat Hist* 3, 33-47.
- Pickford M, Gommery D (2016). Fossil Suidae (Artiodactyla, Mammalia) from Aves Cave I ad nearby sites in Bolt's Farm Palaeokarst System, South Africa. *Estudios geologicos*. 72(2), e059 : 1-24.
- Pocock TN (1976). Pliocene mammalian microfauna from Langebaanweg: a new fossil genus linking the Otomyinae with the Murinae. *S Afr J Sci* 72, 58-60.
- Rae TC, Röhrer-Ertl O, Wallner C-P, Koppe T (2007). Paranasal pneumatization of two Late Miocene colobines: *Mesopithecus* and *Libypithecus* (Cercopithecidae: Primates). *S Afr J Sci* 27(3), 768-771.
- Roche D, Ségalen L, Balan E, Delattre S (2010). Preservation assessment of Miocene-Pliocene tooth enamel from Tugen Hills (Kenyan Rift Valley) through FTIR, chemical and stable-isotope analyses. *J Archaeol Sci* 37, 1690-1699.
- Roche D, Ségalen L, Senut B, Pickford M (2013). Stable isotope analyses of tooth enamel carbonate of large herbivores from the Tugen Hills deposits: Palaeoenvironmental context of the earliest Kenyan hominids. *Earth Planet Sci Lett* 381, 39-51
- Ségalen L, Lee-Thorp JA, Cerling T (2007). Timing of C4 grass expansion across sub-Saharan Africa. *J Hum Evol* 53, 549-559.
- Ségalen L, de Rafélis M, Lee-Thorp JA, Maurer A-F, Renard M (2008). Cathodoluminescence tools provide clues to depositional history in Miocene and Pliocene mammalian teeth. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 266, 246-253.
- Sénégas F (2000). Les faunes de rongeurs (Mammalia) plio-pléistocènes de la province de Gauteng (Afrique du Sud) : mises au point et apports systématiques, biochronologiques et précisions paléoenvironnementales. Thèse de Doctorat : Université Montpellier II. vol.1, pp 1-232 ; vol.2, pp1-225 pp.

- Sénégas F (2004). A new species of *Petromus* (Rodentia, Hystricognatha, Petromuridae) from the early Pliocene of South Africa and its paleoenvironmental implications. *J Vert Pal* 24, 757-763.
- Sénégas F, Avery M (1998). New evidence for the murine origins of the Otomyinae (Mammalia, Rodentia) and the age of Bolt's Farm (South Africa). *S Afr J Sci* 94, 503-507.
- Sénégas F, Michaux J (2000). *Boltimys broomi* (gen. nov. sp. (Rodentia, Mammalia), nouveau Muridae d'affinité incertaine du Pliocène inférieur d'Afrique du Sud. *C R Acad Sci Paris* 330, 521-525.
- Sénégas F, Thackeray JF, Gommery D, Braga J (2002). Palaeontological sites on 'Bolt's Farm', Sterkfontein Valley, South Africa. *Ann Trans Mus* 39, 65-67.
- Senut B (2016). Le renouveau de la "French connection" avec l'Afrique du Sud (1995-2015). *Revue de primatologie* 7
- Skinner JD, Smithers RHN (1990). *The Mammals of the Southern African Subregion*. Pretoria: University of Pretoria.
- Sponheimer M, Lee-Thorp JA (1999). Alteration of enamel carbonate environments during fossilization. *J Archaeol Sci* 26, 143-150.
- Stuart C, Stuart M (2015). *Stuart's Field Guide to Mammals of Southern Africa including Angola, Zambia and Malawi*. Cape Town: Struik Nature.
- Thackeray JF (2016). A History of Research on Human Evolution in South Africa from 1924 to 2016. *Revue de primatologie* 7.
- Thackeray JF, Gommery D, Sénégas F, Potze S, Kgasi L, McCrae C, Prat S (2008). A survey of past and present work on Plio-Pleistocene deposits on Bolt's Farm, Cradle of Humankind, South Africa. *Ann Trans Mus* 45, 83-89.
- Yi H, Balan E, Gervais C, Segalen L, Fayon F, Roche D, Person A, Morin G, Guillaumet M, Blanchard M, Lazzeri M, Babonneau F (2013) A carbonate-fluoride defect model for carbonate-rich fluorapatite *American Mineralogist* 98, 1066-1069.
- Yi H, Balan E, Gervais C, Segalen L, Roche D, Fayon F, Person A, Morin G, Babonneau F (2014) Probing atomic scale transformation of fossil enamel using FTIR and NMR spectroscopy: A case study from the Tugen Hills (Rift Gregory, Kenya). *Acta Biomaterialia* 10, 3952-3958.
- van Zyl W, Badenhorst S, Brink JS (2016). Pleistocene Bovidae from X Cave on Bolt's Farm in the Cradle of Humankind in South Africa. *Ann Ditsong Nat Mus Nat Hist* 6, 39-73.
- Werdelin L, Peigné, S (2010). Carnivora. In *Cenozoic Mammals of Africa* (Werdelin LW, Sanders WJ, editors). Berkeley: University of California Press. pp 603-657.
- White TD, Asfaw B, Beyene Y, Haile-Selassie Y, Lovejoy CO, Suwa G, WoldeGabriel G (2009). *Ardipithecus ramidus* and the paleobiology of early hominids. *Science* 326, 75-86.
- Zazzo A, Bocherens H, Brunet M, Beauvilain A, Billiou D, Mackaye HT, Vignaud P, Mariotti A (2000). Herbivore paleodiet and paleoenvironmental changes in Chad during the Pliocene using stable isotope ratios of tooth enamel carbonate. *Paleobiology* 26, 294-309.

Annexe II. Infrared spectroscopic study of sulfate-bearing calcite from deep-sea bamboo coral

Etienne BALAN, Julie AUFORT, Sophie POUILLE, Marie DABOS, Marc BLANCHARD, Michele LAZZERI, Claire ROLLION-BARD, Dominique BLAMART

Publié dans *European Journal of Mineralogy* (2017) 29, 397-408

DOI : 10.1127/ejm/2017/0029-2611

Abstract

The powder infrared spectra of a sulfate-bearing calcitic coral sample are recorded at room temperature in attenuated total reflectance (ATR) geometry and at low temperature in transmission geometry. The comparison of ATR spectra recorded with diamond or Ge crystal confirms that the width and the shape of the prominent absorption bands, related to CO₃ groups, are dominantly affected by macroscopic electrostatic interactions. In contrast, the temperature-dependence of the position and width of weak and narrow absorption bands, related to CO₃ or SO₄ groups, can be interpreted in terms of thermal expansion, anharmonic coupling, and local strain fluctuations. The three SO₄ stretching bands display a contrasted thermal behavior, the frequency of one of them increasing with temperature. Based on first-principles calculation, this unusual temperature dependence is traced back to the anisotropy of calcite thermal expansion. These results sustain the previously proposed atomic-scale model of sulfate in calcite and attest to a dominantly structural nature of sulfate in the investigated sample. Accordingly, structurally substituted sulfur in deep-sea calcitic bamboo coral could be used as proxy of seawater sulfate.

1. Introduction

Calcium carbonate minerals occur as major phases in sedimentary environments and correspond to the main lithospheric reservoir of carbon (Berner *et al.*, 1983). They are known to naturally incorporate chemical impurities at trace or minor concentration levels (e.g. Bender *et al.*, 1975; Boyle, 1981; Morse & Bender, 1990). These impurities can bring important information on the physical-chemical parameters prevailing during their formation. For example, the concentration and isotopic composition of elements such as magnesium, strontium, boron, or sulfur are quantitatively used for paleoenvironmental reconstructions (e.g., Graham *et al.*, 1982; Mitsuguchi *et al.*, 1996; Palmer *et al.*, 1998; Elderfield & Ganssen, 2000; Kampshulte & Strauss, 2004; Rüggeberg *et al.*, 2008). The presence of chemical impurities can also modify the pathways of crystal growth, the relative stabilities of polymorphs, the size and shape of mineral particles, as well as their elasticity and hardness (e.g., Berner, 1975; Paquette & Redder, 1995; De Yoreo & Vekilov, 2003; Wasylenki *et al.*, 2005; Vavouraki *et al.*, 2008; Kunitake *et al.*, 2013; Long *et al.*, 2013; Côté *et al.*, 2015).

From a crystal-chemical perspective, incorporation of impurities in minerals can display various levels of complexity. Isovalent cationic substitutions are often described by considering the strain related to the insertion of a rigid ionic sphere into an elastic continuum (Blundy & Wood, 1994). Such model can be refined by explicitly considering the site relaxation, i.e., the local changes in the crystal geometry around the impurity (e.g. Reeder *et al.*, 1999). In contrast, heterovalent substitutions and incorporation of molecular species with stiff chemical bonds in a more compliant matrix potentially involve a greater variety of charge compensating mechanisms, coordination states and geometric arrangements (e.g., Reeder *et al.*, 1994; Balan *et al.*, 2014, 2016). In biominerals, an additional complexity arises from their composite nature, involving variably ordered inorganic and organic phases (e.g., Weiner & Dove, 2003; Erez, 2003; Allemand *et al.*, 2004). In this case, the occurrence of trace elements in host crystal sites or in foreign nano-phases or molecules can appear as an open question and bears on their use as geochemical proxies.

Beside the determination of partition coefficients from controlled synthesis experiments (e.g., Busenberg & Plummer, 1985) or the chemical analysis of extant biological species (e.g., Takano, 1985; Vielzeuf *et al.*, 2013), spectroscopic and diffraction-based studies may help to unravel the incorporation mechanisms of impurities and to determine the modification of material properties caused by these impurities. Focusing on molecular impurities, chemically selective methods such as XAS spectroscopy (Reeder *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 2007; Branson *et al.*, 2015) and NMR spectroscopy (Sen *et al.*, 1994; Klochko *et al.*, 2009; Rollion-Bard *et al.*, 2011; Mavromatis *et al.*, 2015; Noireaux *et al.*, 2015) have been used to determine the location and coordination states of selenate, chromate and borate in carbonate minerals. Infrared and Raman spectroscopy can also detect specific signals related to the internal vibrational modes of molecular groups (e.g., Takano *et al.*, 1980; Takano, 1985; Riccardi, 2007; Fernández-Díaz *et al.*, 2010, Floquet *et al.*, 2015). These experimental studies can be sustained by molecular modeling approaches (e.g. Fernández-Díaz *et al.*, 2010; Balan *et al.*, 2014, 2016; Arroyo-de Dompablo *et al.*, 2015), bringing straightforward relations between the spectroscopic properties, thermodynamic parameters, and atomic-scale arrangement of the trace molecular group in its crystalline host.

The present study focuses on the infrared spectroscopic properties and location of sulfate in biogenic calcite. Sulfate is a common impurity in carbonate minerals (Gill *et al.*, 2008). The sulfur isotopic composition of carbonate-associated sulfate (CAS) is currently used as a proxy of the seawater sulfate isotopic composition (e.g. Strauss, 1999; Kampshulte & Strauss, 2004; Riccardi *et al.*, 2006). It brings important information to infer the global balance between oxidized and reduced forms of sulfur over geological times (Halevy *et al.*, 2012). Sulfate groups also significantly affect the growth of carbonate group minerals (Vavouraki *et al.*, 2008). The seawater sulfate concentration, together with Mg/Ca ratio, has been suggested as a key parameter controlling the preferential formation of aragonite vs. calcite in past oceans (Bots *et al.*, 2011). Numerous studies suggest that sulfate groups are structurally incorporated in carbonate minerals (Takano *et al.*, 1980; Pingitore *et al.*, 1995; Kontrec *et al.*, 2004; Vavouraki *et al.*, 2008; Vielzeuf *et al.*, 2013; Balan *et al.*, 2014; Tamemori *et al.*, 2014; Floquet *et al.*,

2015). Sulfate incorporation is easier in calcite than in aragonite and facilitated by the occurrence of Mg up to 2-3 wt. % in calcite (Takano, 1985). However, other forms of sulfur, such as S-containing aminoacids and sulfated sugars, have also been observed to be associated to the organic fraction in biogenic carbonates (Cuif *et al.*, 2003; Dauphin *et al.*, 2005; Vielzeuf *et al.*, 2013; Tamenori *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2014; Floquet *et al.*, 2015).

Here, we analyze in details the infrared spectroscopic properties of a sulfate-bearing deep-sea calcitic coral (bamboo coral). Deep-sea corals have important geochemical implications because they potentially offer long-term records of ocean water-mass variability; related to climatic parameters fluctuations (Murray Roberts *et al.*, 2009). The infrared spectrum is recorded at room temperature in attenuated total reflectance (ATR) geometry and its temperature-dependence is explored in transmission geometry. The present results show that the spectroscopic properties of the biogenic calcite, i.e. the host crystalline matrix, can be interpreted in the light of the inorganic calcite properties whereas the temperature-dependence of the sulfate absorption spectrum brings a new support to the previously proposed structural model of sulfate in calcite (Balan *et al.*, 2014).

2. Analyzed sample

The analyzed sample is a deep-sea calcitic coral (bamboo coral; phylum Cnidaria, class Anthozoa, subclass Octocorallia, family Isidae) collected off the coast of Chile at around 77°E, 33°S at 500 m water depth during dredging operation. Optically clean fragments were selected under a binocular microscope and were gently ground in an agate mortar. Minor and trace element composition were measured at SARM national facility (Nancy, France) following the method described in Carignan *et al.* (2001). They include Mg (3.0 wt. % MgO), Na (0.45% Na₂O), Sr (2447 ppm), B (~100 ppm) and sulfate (~3000 ppm). The reproducibilities of major and trace element measurements are around ±2% and ±10%, respectively.

3. Infrared spectroscopic measurements

Infrared spectra have been recorded using a Nicolet 6700 FTIR spectrometer equipped with an Ever-Glo source, KBr beamsplitter and DTGS-KBr detector. The spectra were obtained between 500 and 4000 cm⁻¹ by averaging 100 scans with a resolution of 1 cm⁻¹. The room temperature ATR-FTIR spectrum was recorded on the sample powder packed at the surface of a diamond or Ge ATR crystal using a Quest ATR device (Specac). Low-temperature FTIR transmission measurements were performed on a composite pellet made of the calcite sample and a diluting KBr matrix. The pellet was obtained by compressing a mixture of about 10 mg of gently ground sample diluted in 300 mg of dried KBr under a pressure of 10⁴ kg/cm². It was oven-dried overnight to remove adsorbed water, and pressed again at the same pressure before insertion in the high-vacuum chamber. During the measurements, the sample temperature was controlled using an ARS CS-204 SI cryocooler fitted with KRS-5 windows and a Si diode fixed on the sample holder. Measurements were collected from 10 to 290 K by steps of 40 K.

The position of the maximum of the bands was determined on the raw spectra. Accuracy on the position is estimated to be better than $\pm 0.2 \text{ cm}^{-1}$. The analysis of the width was performed using the autocorrelation method exposed in Salje *et al.* (2000) and further used in Blanch *et al.* (2007) and Balan *et al.* (2010; 2011). This method provides an efficient way to extract a robust width parameter Δ_{corr} from spectra displaying complex band shape and baseline, for which conventional fitting procedure using symmetric lorentzian or gaussian-type functions would lead to disputable results. It is particularly well suited to analyze the usually moderate changes of linewidths with temperature. For a simple lorentzian shape, the extracted autocorrelation parameter Δ_{corr} is close to its full-width at half maximum.

4. Theoretical modeling

The sensitivity of vibrational modes to thermal expansion was theoretically assessed by computing the mode frequencies at selected cell geometries. Calculations were performed within density functional theory (DFT) framework, using periodic boundary conditions and the generalized gradient approximation (GGA) to the exchange-correlation functional (PBE functional; Perdew *et al.*, 1996). The ionic cores were described using the latest version of ultra-soft pseudopotentials from the GBRV library (Garrity *et al.*, 2014). The electronic wave-functions and charge density were expanded using a finite basis sets of plane-waves with 40 and 200 Ry cutoffs, respectively, corresponding to a convergence of the total energy better than 1 mRy/atom. The structural relaxation and vibrational mode calculations were performed using the PWscf and Phonon codes of the Quantum ESPRESSO package (Giannozzi *et al.*, 2009; <http://www.quantum-espresso.org>).

A periodic model of sulfate-bearing calcite was built from a rhombohedral 2x2x2 super-cell of calcite (80 atoms) as in Balan *et al.* (2014). The geometry of the initial model was obtained by varying the internal coordinates to minimize the forces on atoms to less than 10^{-5} Ry/a.u. , while the cell parameters were kept fixed to those of the theoretically relaxed pure calcite (hexagonal cell parameters: $a=5.05 \text{ \AA}$, $c=17.2 \text{ \AA}$). This initial model is assumed to correspond to the low-temperature ($T=0\text{K}$) structure of substituted sulfate in calcite. The temperature dependence was then considered by modifying the cell-parameters of the model using the experimentally determined variations of the calcite cell-parameters (Rao *et al.*, 1967). Two theoretical expanded geometries were considered by increasing the c cell-parameter by 0.25 and 0.5% and by using the corresponding experimentally determined variation of the c/a ratio. These two geometries correspond to a relative volume expansion of 0.16 and 0.33 %, respectively, with an anti-correlated c cell-parameter increase and a cell-parameter decrease. Based on the linear variation of the cell-parameters as a function of temperature reported by Rao *et al.* (1967), they correspond to a temperature increase of ~ 84 and $\sim 168 \text{ K}$, respectively. The two expanded models correspond to a homothetic expansion of the structure at $T=0\text{K}$, i.e. internal coordinates are kept fixed to those determined on the initial geometry without further minimizing the total energy of the system. For the three cell geometries (i.e., $\Delta V/V_0=0, 0.16$ and 0.33%), harmonic frequencies of the SO_4 internal modes were calculated at the Brillouin zone center (Γ point) using the linear response theory (Baroni *et al.*, 2001). They were obtained by diagonalizing a partial dynamical matrix restricted to displacements

of atoms belonging to the sulfate group only. As previously shown (Balan *et al.*, 2014), this approximation leads to SO_4 vibrational frequencies differing by less than 3 cm^{-1} from those obtained from the full dynamical matrix.

5. Results and Discussion

5.1. ATR spectrum of biogenic calcite

The ATR spectrum of the calcitic coral sample displays the absorption bands commonly observed in calcite (Fig. 1). A full interpretation of these bands has been given by, e.g., Hellwege *et al.* (1970) and White (1974). The vibrational modes of calcite were also determined by theoretical calculations (e.g., Pavese *et al.*, 1992; Prencipe *et al.*, 2004; Valenzano *et al.*, 2006). In the investigated frequency range, all the observed calcite bands correspond to the internal vibrational modes of the carbonate groups and can be related to those of the isolated CO_3 group, referred to as ν_1 , ν_2 , ν_3 and ν_4 (White, 1974). The ν_1 and ν_2 modes are not degenerated and correspond to the totally symmetric C-O stretching mode and to the oscillating motion of the C atom perpendicularly to the CO_3 plane, respectively. The degenerated ν_3 and ν_4 modes correspond to anti-symmetric C-O stretching and to bending modes, respectively.

The intense bands related to the ν_3 and ν_2 CO_3 modes are comparatively broader than the other absorption bands (Fig. 1a). In the diamond ATR spectrum, the ν_3 CO_3 band extends from about 1000 to 1490 cm^{-1} , while the ν_2 CO_3 band extends from about 840 to 890 cm^{-1} . Both bands display the peculiar asymmetric shape due to joint effects of the macroscopic electrostatic properties of the sample and experimental ATR geometry, as discussed in details by Aufort *et al.* (2016). Briefly, this shape can be understood by considering that the sample properties are well described by the effective dielectric properties of a solid/air composite obtained within the Bruggeman approach (Bruggeman, 1935). In this case, the imaginary (absorptive) part of the dielectric function extends from the transverse to the longitudinal optical frequencies of the modes, explaining the asymmetry of the bands toward higher wavenumbers. For the ν_3 CO_3 and the less intense ν_2 CO_3 band of pure calcite, the experimental splitting between transverse optical (TO) and longitudinal optical (LO) frequencies is 142 cm^{-1} and 18 cm^{-1} , respectively (White, 1974). The relatively low refractive index of diamond ($n=2.4$), although leading to a stronger absorbance and better signal/noise ratio than more refractive ATR crystals such as Ge ($n=4$), induces additional modifications of the band shape with respect to the absorptive part of the sample dielectric function. They consist in a shift and a pronounced asymmetry toward lower wavenumbers. This is particularly apparent when comparing the diamond ATR spectrum with that obtained with a Ge crystal (Figs. 1b, 1c). The maximum of the ν_3 CO_3 band at 1393 cm^{-1} is shifted by about -14 cm^{-1} from the TO frequency of pure calcite, whereas this shift is only of -2 cm^{-1} for the ν_2 CO_3 band observed at 870.5 cm^{-1} . Thus, the two prominent ν_3 and ν_2 CO_3 absorption bands in the powder infrared spectrum of calcite are strongly affected by electrostatic effects. Because of their consequent broadening, they are not expected to provide detailed information on the atomic scale structure of the sample. Similar

conclusions were previously obtained for the intense bands in the powder infrared spectrum of apatite (Balan *et al.*, 2001; Aufort *et al.*, 2016).

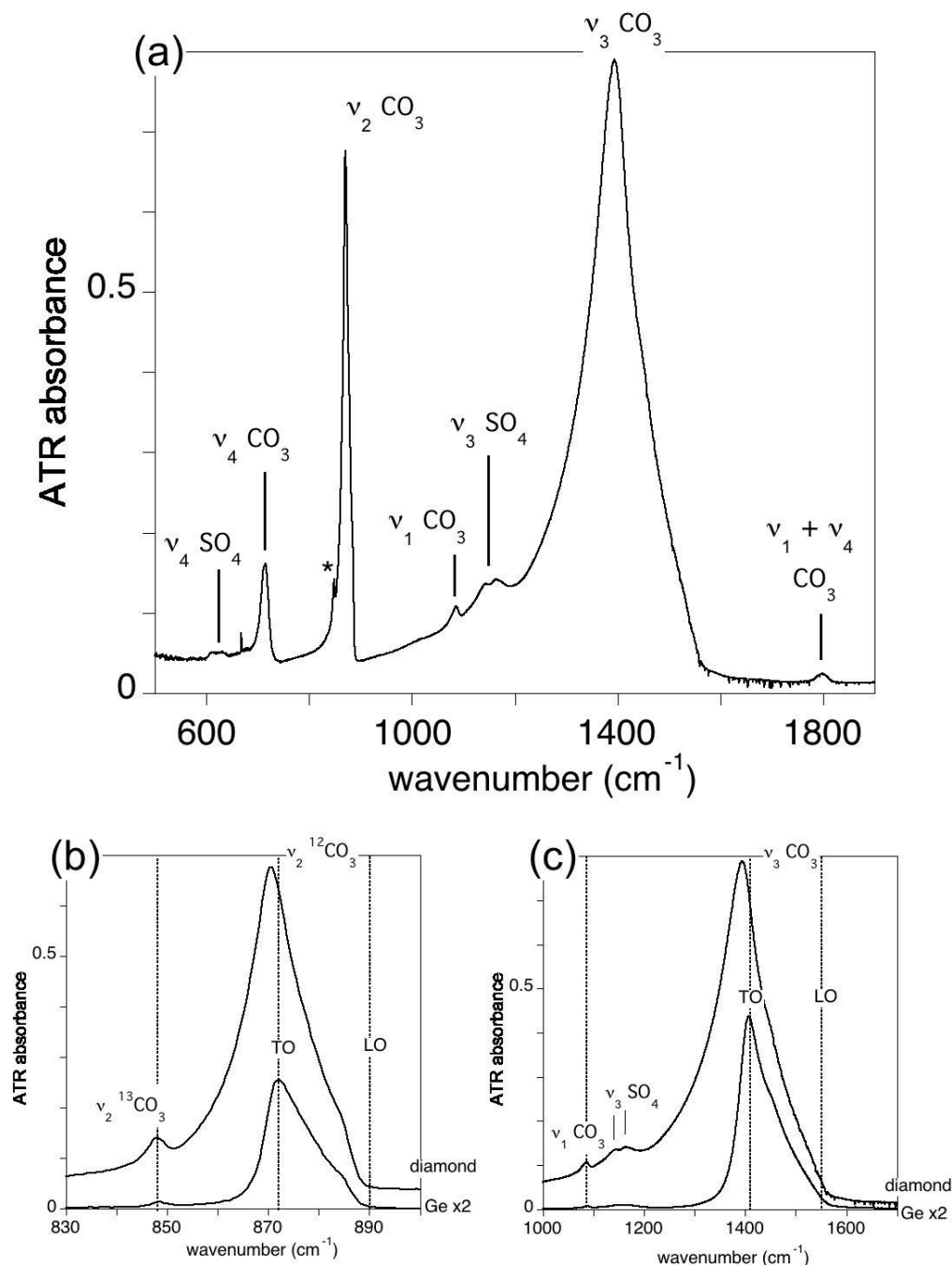


Figure 1 (a) ATR-FTIR spectrum of biogenic calcite recorded using a diamond ATR crystal. At the bottom are shown enlarged views of the ν_2 CO₃ (b) and ν_3 CO₃ (c) bands comparing the ATR spectra recorded using diamond and Ge crystals. To facilitate the comparison, the intensity of the Ge ATR spectrum has been multiplied by two. The transverse optical (TO) and longitudinal optical (LO) frequencies of the ν_2 and the ν_3 CO₃ modes of pure calcite (White 1974) are reported. Note the similar shape of the ν_2 and ν_3 CO₃ bands. The differences observed between the diamond and Ge ATR spectra attest to the role of macroscopic electrostatic effects on the band shapes. The weak band related to ¹³CO₃ species (marked with an asterisk in (a) and that related to the ν_1 CO₃ mode are not affected by these effects

The ν_1 and ν_4 CO_3 modes induce a smaller polarization of the crystal, as attested by smaller LO-TO splitting values (White, 1974). Therefore, they are less affected by electrostatic interactions than the ν_3 and ν_2 CO_3 bands. They appear as weaker and narrower features in the spectrum (Fig. 1a) and can provide more information on microscopic (atomic-scale) structural parameters. The ν_1 CO_3 mode is not IR active in perfect calcite but is commonly observed as a weak band in natural and synthetic calcite samples (e.g., Bottcher *et al.*, 1997, Xu & Poduska, 2014; Floquet *et al.*, 2015). In the investigated sample, it appears as an asymmetric band at 1085.5 cm^{-1} , overlapping with the low-frequency tail of the broad ν_3 CO_3 band. The observed asymmetry is related to this overlap, which induces a mixing between the imaginary and real parts of the dielectric function (Aufort *et al.*, 2016). The ν_4 CO_3 mode observed at 713.6 cm^{-1} is IR active but the corresponding experimental splitting of LO and TO modes is only of 3 cm^{-1} (White, 1974). In the investigated sample, its full-width at half maximum (FWHM) is significantly larger, amounting to $\sim 17\text{ cm}^{-1}$. This indicates that electrostatic effects cannot represent a dominant contribution to its width and shape. Its position is consistent with the presence of Mg in the calcite structure (Bottcher *et al.*, 1997; Dauphin, 1999). A weak and narrow band is also observed at 848 cm^{-1} on the low-frequency side of the ν_2 CO_3 band. This weak feature is observed in various carbonate minerals and has been related to the ν_2 vibration of the $^{13}\text{CO}_3$ isotopic species, which naturally occurs with an abundance of 1.1 % (Sterzel & Chorinsky, 1968; Belousov *et al.*, 1970; White, 1974; Floquet *et al.*, 2015). However, it could also be related to a combination mode involving the ν_4 CO_3 mode and a lattice mode (Donoghue *et al.*, 1970; White, 1974; Carteret *et al.*, 2013). Several combination bands are observed at higher frequency. A combination of ν_1 and ν_4 modes is observed at 1797.9 cm^{-1} , while a combination of ν_1 and ν_3 modes is observed at 2518.2 cm^{-1} . This last value is consistent with the presence of Mg in the sample (Bottcher *et al.*, 1997).

The weak bands (Fig. 1a) observed at 611 , 630 , 1144.2 and 1163.2 cm^{-1} can be ascribed to internal vibrations of SO_4 groups (Takano *et al.*, 1980; Takano, 1985; Riccardi, 2007; Floquet *et al.*, 2015). The vibrations of an isolated SO_4 group with Td symmetry consist in two triply degenerated ν_3 (S-O stretching) and ν_4 (rocking) modes, a doubly degenerated ν_2 (scissoring) and a non-degenerated ν_1 (totally symmetric S-O stretching) mode. In the calcite structure, the degenerated modes are split by interaction with the host crystal structure (Balan *et al.*, 2014). The doublet at 611 and 630 cm^{-1} correspond to ν_4 vibrations, whereas that at 1144.2 and 1163.2 cm^{-1} can be ascribed to ν_3 vibrations. The feature at 1248 cm^{-1} observed by Floquet *et al.* (2015) on a calcitic red coral sample is not present in the present calcitic coral sample.

5.2. Low-temperature dependence of internal CO_3 modes in biogenic calcite

As discussed above, the temperature dependence of relatively weak and narrow bands is expected to bring more detailed information on microscopic order parameters than the broad prominent bands of the powder IR spectrum of calcite (e.g., Xu & Poduska, 2014). Accordingly, the signal/noise ratio of the weak absorption bands has been improved by increasing the calcite/KBr ratio of the sample

measured in transmission geometry whereas the saturated strong ν_3 and ν_2 absorption bands were not analyzed.

The ν_4 and ν_1 CO_3 bands, as well as the ν_2 $^{13}\text{CO}_3$ feature, display small changes with temperature (Fig. 2). Their shift between 10 and 290 K is smaller than 1 cm^{-1} and the temperature dependence of their width is also weak.

The width parameter Δ_{corr} of the ν_4 and ν_2 $^{13}\text{CO}_3$ bands displays the temperature dependence typically ascribed to anharmonic coupling between the vibrational excitation and other vibrational modes of the structure (e.g., Menéndez & Cardona, 1984): it consists in a low-temperature quantum saturation domain in which the linewidth is almost temperature-independent followed by a marked increase in the linewidth at higher temperature (Fig. 2). This behavior relates to the decay of the excitation in two phonons and can be fitted using an equation of the form (Salje *et al.*, 1991; Blanchard *et al.*, 2014):

$$A(T) = A_0 + B \coth(\Theta_s/T) \quad (1)$$

where T is the temperature (K) and A_0 , B and Θ_s are adjustable parameters. In this formalism, the temperature-independent domain extends from 0K to a critical temperature $T_s \sim \Theta_s/2$. Previous investigations of the temperature dependence of the calcite vibrational spectrum have shown that four-phonon processes can also contribute to the homogeneous broadening of the bands (Sakurai & Sato, 1971; Sood *et al.*, 1981; Delfyett *et al.*, 1989). Notably, four-phonon processes lead to the phase relaxation of the vibrational excitation by phonon-phonon scattering. Three- and four-phonon processes could be discriminated by their different temperature dependence but this would require investigations at higher temperatures than in the present study (Sakurai & Sato, 1971) or dedicated experiments (Delfyett *et al.*, 1989). Accordingly, we restrict our analysis to the generic ansatz given by Equation (1).

For the ν_4 and ν_2 $^{13}\text{CO}_3$ bands, the variation of the linewidth with temperature does not exceed 0.2 cm^{-1} in the investigated range (Fig. 2). This indicates that, beside the instrumental resolution ($\sim 1\text{ cm}^{-1}$), the observed width is mostly determined by inhomogeneous broadening contributions. These contributions include macroscopic electrostatic interactions and the dependence of vibrational frequencies on local strain fluctuations. The electrostatic contribution should be negligible for the ν_2 $^{13}\text{CO}_3$ band which is related to a highly dilute species. The ν_2 $^{13}\text{CO}_3$ mode also displays a very small dependence on variations in the crystal cell geometry, as attested by the theoretical analysis of Gueta *et al.* (2007) and observations on the isostructural mineral magnesite (Grzechnik *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 2011). Consequently, the ν_2 $^{13}\text{CO}_3$ band displays a very small width parameter at 0K ($\Delta_{\text{corr}} \sim 2.6\text{ cm}^{-1}$). For the ν_4 band, the electrostatic contribution would not exceed 3 cm^{-1} , corresponding to the LO-TO splitting value. Its more significant width ($\sim 11\text{ cm}^{-1}$) thus attests for a significant distribution in the environment of carbonate groups. In biogenic minerals, local strain fluctuations may arise from the incorporation of chemical impurities and finite size effects. In the case of calcitic coral, Mg and sulfate

incorporation are expected to play a major role in the fluctuations of the local environment of CO₃ groups (Floquet *et al.*, 2015).

The position of the ν_4 and ν_2 ¹³CO₃ bands also displays a quantum saturation domain at low temperature followed by a more pronounced shift above a critical temperature (Fig 2; Table 1). Compared with the linewidth, the mode frequency variation contains an additional contribution related to the thermal expansion of the crystal structure (Menéndez & Cardona, 1984). In calcite, this contribution is however expected to be significantly smaller (Sakurai & Sato, 1971). Here, we note that the results obtained on the ν_2 ¹³CO₃ band are well consistent with those reported by Sakurai & Sato (1971) for the ν_2 ¹²CO₃ mode of a single-crystal of optical-grade natural calcite, i.e. a damping coefficient at 300K of 1.9 cm⁻¹ (to be compared to $\Delta_{\text{corr}} = 2.8$ cm⁻¹ at 290 K in the present study) and an anharmonic shift of 0.3 cm⁻¹ (to be compared to 0.4 cm⁻¹ at 290 K in the present study). This agreement further confirms the very small sensitivity of the ν_2 CO₃ mode to variations of its local environment (Gueta *et al.*, 2007). It is fully consistent with the interpretation of this band as related to the ¹³CO₃ species, instead of to a two-phonon absorption. A significantly different behavior and a larger linewidth would be expected in the case of a combination band involving low-frequency vibrational modes.

The behavior of the ν_1 CO₃ band (Fig. 2) is not easily explained within the same framework. Its position shows a linear variation with temperature without perceptible low-temperature saturation domain. The corresponding slope is -3.6×10^{-3} cm⁻¹/K (Table 1). Its width parameter displays a low-temperature saturation domain with relatively dispersed values but it is followed by a decrease with increasing temperature. This variation of the width of the ν_1 CO₃ band cannot be simply related to anharmonic phonon decay, which tends to decrease the phonon lifetime (thus increasing the linewidth) with increasing temperature (Delfyett *et al.*, 1989). The observed behavior should thus arise from a temperature-related change in the inhomogeneous broadening of the band. The ν_1 CO₃ band displays two characteristics that could be linked to its anomalous behavior. The observed absorption is indeed exclusively related to a break of the IR selection rules, most likely induced by local distortions of the structure. In addition, it overlaps with the low frequency tail of the strong ν_3 CO₃ band. As discussed for the ATR spectrum, this overlap leads to a marked asymmetric shape depending on the respective contribution and position of the narrow and broad resonances (Aufort *et al.*, 2016). Whatever its precise origin, the overall change of the width with temperature remains small, typically within 0.2 cm⁻¹. As for the ν_4 CO₃ band, the observed width should be mostly related to local strain fluctuations. Both bands indeed display comparable width (Table 1) and the related modes have a similar sensitivity to pressure changes (Salje & Viswanathan, 1976; Clark *et al.*, 2011).

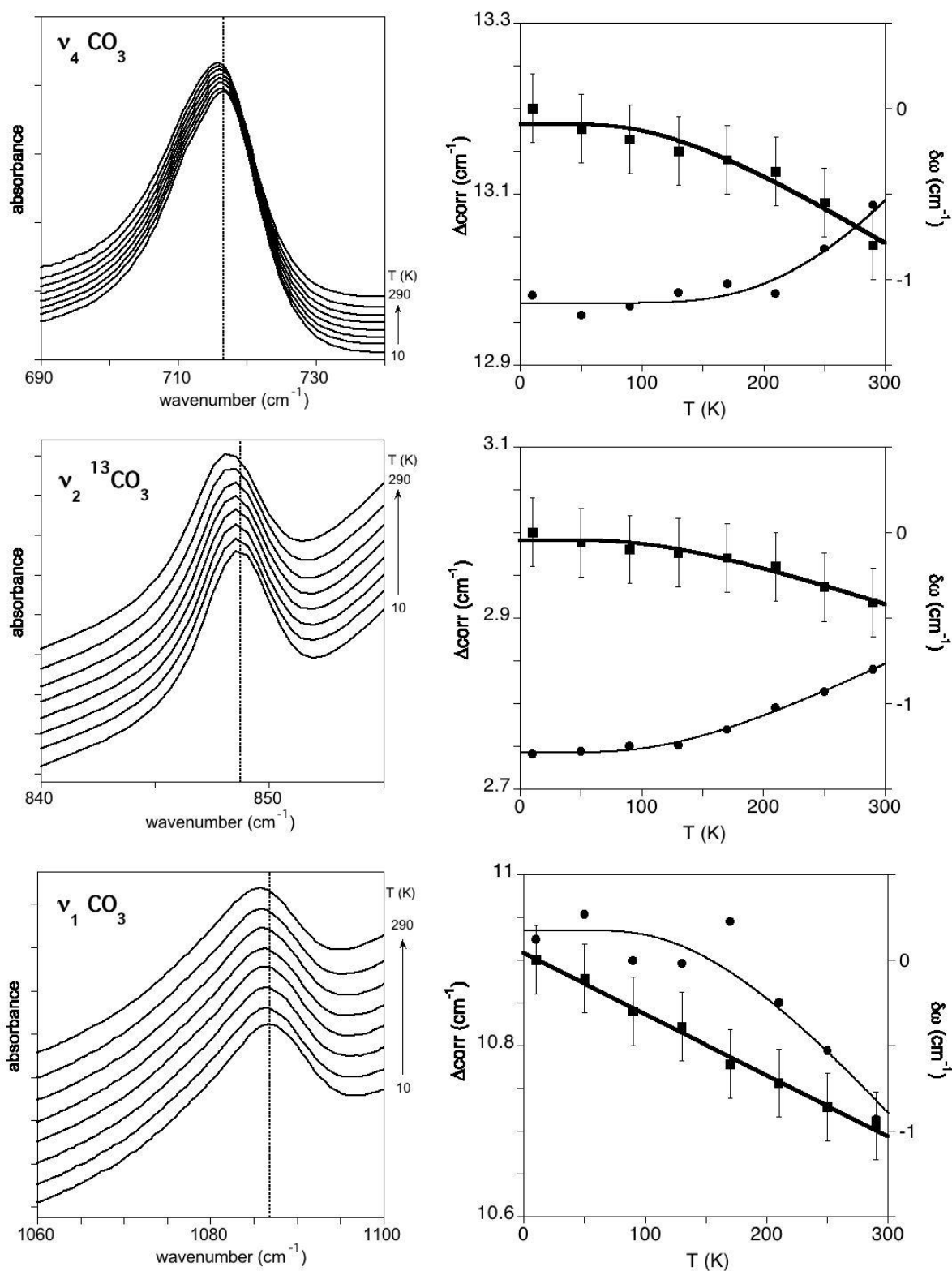


Figure 2 Low-temperature transmission spectrum of CO_3 bands (left panels). The vertical lines indicate the band position at 10 K. The temperature dependence of the position $\delta\omega = \omega - \omega_0$ (squares, bold curves) and width Δ_{corr} (circles) parameters are reported in the right panels. Note the quantum saturation observed at low-temperature for the ν_4 and ν_2 $^{13}\text{CO}_3$ bands. The width parameter has been determined after a linear baseline subtraction on the following domains $680\text{-}735\text{ cm}^{-1}$ (ν_4 CO_3), $840\text{-}852\text{ cm}^{-1}$ (ν_2 $^{13}\text{CO}_3$), $1060\text{-}1098\text{ cm}^{-1}$ (ν_3 CO_3). The parameters of the fits using Eq. (1) are reported in Table 1.

Table 1 Temperature-dependence of position and width of selected CO₃ and SO₄ bands. Measurements are fit with Eq. 1, which defines the quantities A₀, B, T_S. The average slope of the frequency ω and of the width parameter (Δ_{corr} , defined in Salje *et al.* (2000)) as a function of temperature, $d\omega/dT$ and $d(\Delta_{\text{corr}})/dT$, respectively, are also reported.

band	position					width			
	ω_0 (10K) (cm ⁻¹)	A ₀ (cm ⁻¹)	B (cm ⁻¹)	θ_S (K)	$d\omega/dT$ (cm ⁻¹ K ⁻¹)	A ₀ (cm ⁻¹)	B (cm ⁻¹)	θ_S (K)	$d(\Delta_{\text{corr}})/dT$ (cm ⁻¹ K ⁻¹)
ν_4 CO ₃	716.4	.85	-0.95	197	-	11.4	1.6	496	-
ν_2 ¹³ CO ₃	848.7	.45	-0.49	194	-	2.6	.17	221	-
ν_1 CO ₃	1086.8	-	-	-	-3.6 10 ⁻³	11.4*	-.5*	260*	-
ν_4 SO ₄ (A)	611.8	-	-	-	< d.l.	12.0	-	-	5.2 10 ⁻³
(B)	631.8	6.7	-6.7	347	-	"	-	-	"
ν_3 SO ₄ (C)	1142.9	-	-	-	6.6 10 ⁻³	27.7	-	-	44.1 10 ⁻³
(D)	1168.2	-	-	-	-12.6 10 ⁻³	"	-	-	"
(E)	1175.8	-	-	-	n.d.	"	-	-	"

Note: *the fitting parameters of the ν_1 CO₃ width are not related to anharmonicity.

5.3. Low-temperature dependence of internal SO₄ modes in biogenic calcite

The room temperature spectrum (Fig. 1a) of the sample displays four bands which can be ascribed to the ν_4 and ν_3 SO₄ vibrations. In the spectrum recorded at 10K, the bands at 611.8 and 631.8 cm⁻¹ (labeled A and B in Fig. 3), as well as an additional broad feature observed at 673 cm⁻¹, can be ascribed to the triply degenerated ν_4 vibration split by the interaction of the molecular species with the crystalline host. The three bands related to the split ν_3 vibration are observed at 1142.9, 1162.8 and 1175.8 cm⁻¹ (bands C, D and E in Fig. 3). A very weak feature is observed at 1021 cm⁻¹ corresponding to the ν_1 band. The ν_4 band at 612 cm⁻¹ (band A) does not display any apparent shift with temperature, whereas that at 631.5 cm⁻¹ (band B) shows a slight frequency decrease with temperature, analogous to that observed for the ν_4 and ν_2 ¹³CO₃ bands. Its Θ_s value of 347 K corresponds to a coupling with a mode at ~241 cm⁻¹, thus enabling an efficient decay toward the low-frequency domain of the calcite density of vibrational states (Catti *et al.*, 1993). A more contrasted behavior is observed among the ν_3 SO₄ stretching bands. The band C at 1142.9 cm⁻¹ shifts toward the high frequency values with increasing temperature; whereas the two other bands display a marked shift toward the lower frequencies (Fig. 2). The position of the high-frequency band E at 1175.8 cm⁻¹ could not be determined over the whole temperature range because of its overlap with band D when the temperature increases. For the three bands, the magnitude of the shifts is significantly larger than that observed for the CO₃ modes and the ν_4 SO₄ bands (Fig. 2 and 3). The overall width parameter Δ_{corr} determined for the two bands A and B displays an increase of ~2 cm⁻¹ with temperature, whereas its increase for the three ν_3 bands reaches 14 cm⁻¹. In both cases, the width parameter is affected by variations in the line splitting and related band overlaps.

Insight in the origin of the observed lineshift can be obtained by considering the theoretical variation of the vibrational frequencies of the SO₄ group as a function of crystal thermal expansion. The

theoretical model of SO_4 in calcite (Fig. 4) is identical to that previously obtained by Balan *et al.* (2014). The SO_4 group is slightly tilted with one S-O bond approximately oriented along the c -axis (S-O1), two S-O bonds in the perpendicular plane (S-O2 and S-O4) and the last S-O3 bond with an intermediate orientation. A full modeling of the temperature-dependent vibrational properties of the system would require minimization of its free-energy as a function of internal coordinates at a given temperature, using e.g. the quasi-harmonic approximation (Catti *et al.*, 1993; Quong & Liu, 1997; Lazzeri & de Gironcoli, 1998). This approach requires extensive calculation of the phonon density of states and is hardly applicable to large system sizes, such as those considered in the present study. For this reason, a simplified approach is used. It consists in calculating the harmonic vibrational frequencies of SO_4 groups for systems obtained by a homothetic expansion of the cell geometry (clamped atomic positions). All inter-atomic bonds are thus considered to deform in a similar way. The frequency variations related to rigid molecular groups (e.g. CO_3 , SO_4) are likely to be overestimated with respect to those related to vibration of softer bonds (e.g. Ca-O). Meanwhile, a reasonable account of the contrasted behavior of the modes with a similar nature, such as the S-O stretching modes, is expected. We also recall that anharmonic frequency shift results from a sum of a lattice thermal expansion contribution and of the direct phonon-phonon anharmonic interactions as described in Menéndez & Cardona (1984). The present approach only considers the first contribution.

As previously observed (Balan *et al.*, 2014), the theoretical frequencies of internal SO_4 vibrational modes are underestimated by $\sim 5\%$ (Table 2). This underestimation is ascribed to the usual overestimation of bond lengths and underestimation of corresponding force constants by the GGA. All the ν_4 modes display a small frequency lowering when the crystal cell expands, with the low-frequency mode displaying the weakest dependence. This behavior is consistent with the contrasted shifts experimentally observed for the two bands A and B. A more contrasted behavior is predicted by calculations for the stretching modes (Table 2; Fig. 4). The mode computed at 1073 cm^{-1} , corresponding to the band C (Fig. 3), is mostly related to the coupled stretching vibration of the S-O2 and S-O4 bonds. It displays a frequency increase as a function of the crystal cell expansion. In contrast, the mode calculated at 1109.9 cm^{-1} , corresponding to band D, is related to the S-O3 stretching vibration. It displays a moderate decrease as a function of the crystal cell expansion. Finally, the mode calculated at 1153.8 cm^{-1} , corresponding to band E, is related to the S-O1 stretching and displays a strong and likely overestimated dependence on the crystal cell geometry. Thus, the simple theoretical assessment of the dependence of vibrational frequencies of the SO_4 group on the cell parameters is consistent with the contrasted behavior measured for the experimental ν_3 SO_4 bands, and more specifically with the positive shift of the lowest frequency ν_3 SO_4 band (band B) as a function of temperature. This contrasted behavior can be traced back to the anisotropy of the crystal expansion, which corresponds to a decrease of the a cell-parameter and concomitant increase of the c cell-parameter (Rao *et al.*, 1968). Accordingly, the shift of the ν_3 SO_4 bands in calcite seems to be mostly related to the thermal expansion of the structure, with a weaker role of phonon-phonon anharmonic coupling between the localized vibrational modes and the vibrational density of states of the crystal host. This behavior differs from that of the CO_3 groups.

In the case of the high-frequency modes of a molecular impurity in a crystal host, the number of anharmonic decay channels can be small, leading to weaker anharmonic effects at low-temperature.

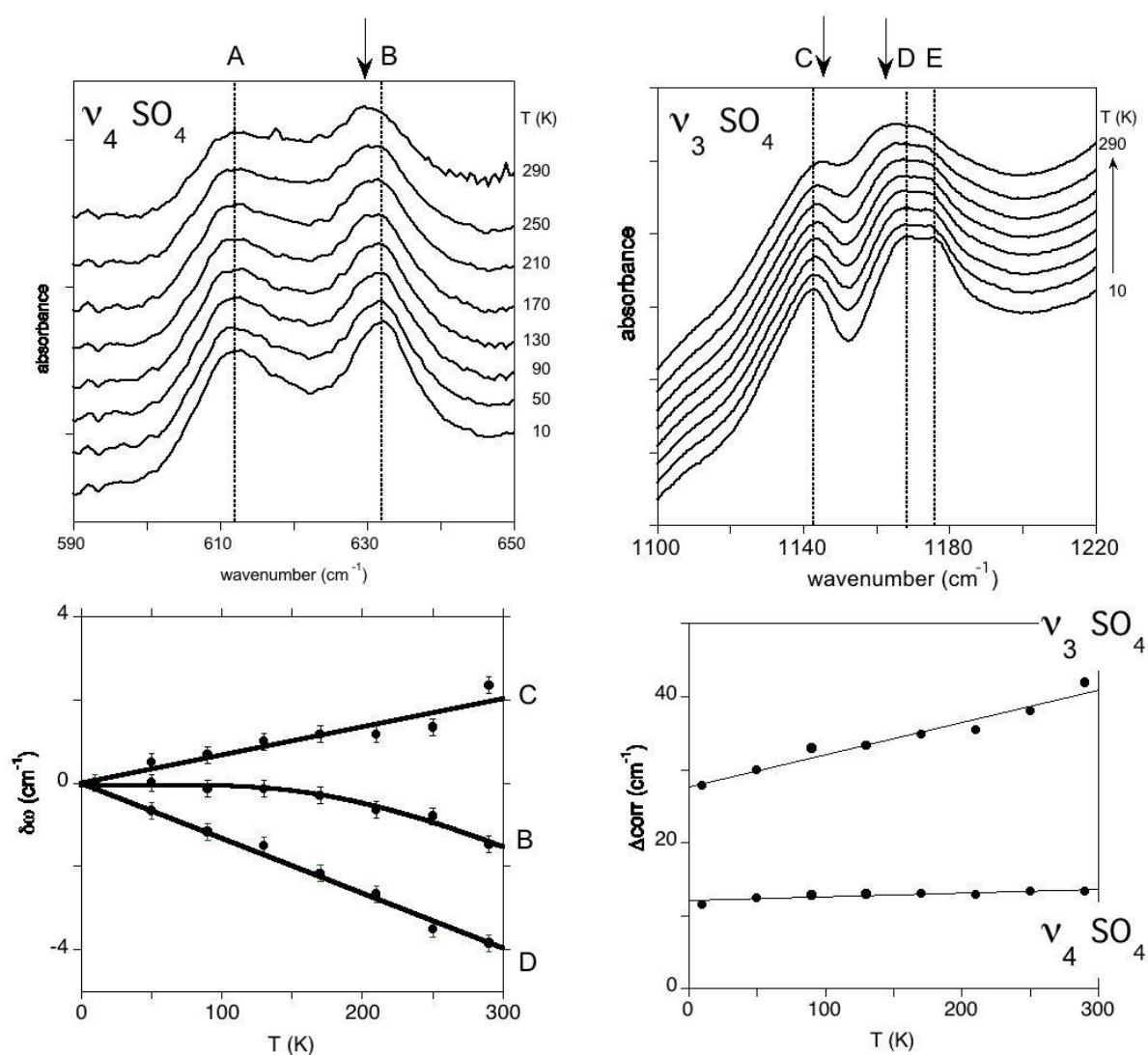


Figure 3 Low-temperature transmission spectra of SO_4 bands (top panels). Note the contrasted shift of bands B, C and D (left bottom panel). Global width parameters Δ_{corr} (right bottom panel) have been determined after a linear baseline subtraction on the domain $590\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_4 \text{SO}_4$) and a non-linear Stineman baseline (Stineman, 1980) on the domain $1100\text{-}1220\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_3 \text{SO}_4$). The parameters of the fits using Eq. (1) for band B and linear behavior for the other curves are reported in Table 1. The vertical lines indicate the band position at 10 K, whereas the vertical arrows point to the position of shifted bands at room temperature.

Table 2 Sulfate mode frequencies and their dependence on crystal cell volume. Measurements (exp) vs. calculations (theo.). The parameter V_0 ($\Delta\omega/\Delta V$) corresponds to the frequency variation as a function of relative cell-volume change.

mode	ω_{theo} (cm^{-1})	V_0 ($\Delta\omega/\Delta V$) (theory) (cm^{-1})	ω_{exp} (cm^{-1})
$v_4 \text{SO}_4$	587.8	-130	611.8 (A)
	592.9	-260	631.8 (B)
	632.9	-310	673.0
$v_1 \text{SO}_4$	962.7	-820	1021.0
$v_3 \text{SO}_4$	1073.1 (S-(O2,O4))	+660	1142.9 (C)
	1109.9 (S-O3)	-410	1168.2 (D)
	1153.8 (S-O1)	-6230	1175.8 (E)

note: the dominant contribution of S-O bonds for the $v_3 \text{SO}_4$ modes are indicated in parenthesis. Oxygen labels refer to Fig. 4.

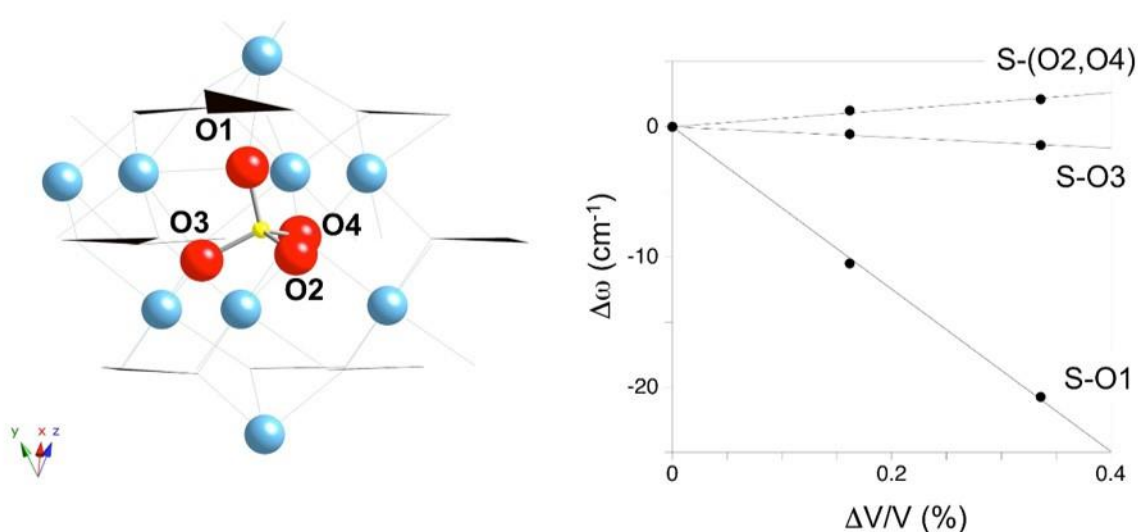


Figure 4 Model of sulfate substituted for carbonate in calcite (after Balan *et al.*, 2014). The three-fold axis of the structure is vertically oriented. The carbonate groups correspond to the black triangles. The S atom is in yellow, calcium atoms in blue, oxygen atoms in red. The calculated dependence of vibrational S-O stretching frequencies ($v_3 \text{SO}_4$) on crystal cell expansion is reported on the right. Note the contrasted behavior of the three modes, depending on the structural orientation of the corresponding S-O bonds.

6. Concluding remarks

The combination of spectroscopic and molecular modeling tools appears as a powerful approach to unravel the status of chemical impurities in complex samples, such as biominerals. More specifically, the investigation of the low-temperature dependence of vibrational bands is expected to provide pertinent information about the dynamic interactions of molecular impurities with their crystalline host (Yi *et al.*, 2013). Interestingly, the anharmonic behavior observed on carbonate modes is well consistent with that previously observed on highly ordered calcite crystals, suggesting that the substantial occurrence of Mg and sulfate impurities in the biogenic sample only has a moderate effect on mode-coupling parameters.

The comparison of experimental and theoretical results validates the atomic-scale model proposed for the sulfate incorporation at the carbonate site of the calcite structure. It further confirms the structural location of sulfate in deep-sea calcitic coral. According to the infrared spectroscopic observations, sulfate ions in deep-sea bamboo coral mainly substitutes for carbonate ion and the occurrence of S linked to the presence of organic matter (e.g. Dauphin & Cuif, 1999; Cuif *et al.*, 2003; Dauphin, 2006) plays a lesser role. One consequence is that the observation of S in deep-sea bamboo coral is not a reliable proxy of the presence of S-bearing organic molecules. In the contrary, sulfur as structurally substituted sulfur (SSS; Kampschulte & Strauss, 2004) in deep-sea calcitic bamboo coral could be used as proxy of seawater sulfate.

Acknowledgments

Support by M. Guillaumet and the IMPMC spectroscopy platform is acknowledged. This work has been funded by the French National Research Agency through the CARBORIC (ANR-13-BS06-0013-06) project. This work was performed using HPC resources from GENCI-IDRIS (Grants i2016041519 and i2016097535).

References

- Allemand, D., Ferrier-Pages, C., Furla, P., Houlbreque, F., Puverel, S., Reynaud, S., Tambutte, E., Tambutte, S., Zoccola, D. (2004): Biomineralisation in reef-building corals: from molecular mechanisms to environmental control. *Comptes Rendus Palévol*, **3**, 453–467.
- Arroyo-de Dompablo, M.E., Fernández-Gonzalez, M.A., Fernández-Diaz, L. (2015): Computational investigation of the influence of tetrahedral oxoanions (sulphate, selenate and chromate) on the stability of calcium carbonate polymorphs. *RSC Adv.*, **5**, 59845.
- Aufort, J., Ségalen, L., Gervais, C., Brouder, C., Balan, E. (2016): Modeling the attenuated total reflectance infrared (ATR-FTIR) spectrum of apatite. *Phys. Chem. Minerals*, (DOI 10.1007/s00269-016-0821-x).
- Balan, E., Delattre, S., Guillaumet, M., Salje, E.K.H. (2010): Low-temperature infrared spectroscopic study of OH stretching modes in kaolinite and dickite. *Am. Mineral.*, **95**, 1257-1266.
- Balan, E., Delattre, S., Roche, D., Segalen, L., Morin, G., Guillaumet, M., Blanchard, M., Lazzeri, M., Brouder, C., Salje, E.K.H. (2011): Line-broadening effects in the powder infrared spectrum of apatite. *Phys. Chem. Minerals*, **38**, 111-122.
- Balan, E., Blanchard, M., Pinilla, C., Lazzeri, M. (2014): First-principles modeling of sulfate incorporation and $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ isotopic fractionation in different calcium carbonates. *Chem. Geol.*, **374–375**, 84-91.
- Balan, E., Pietrucci, F., Gervais, C., Blanchard, M., Schott, J., Gaillardet, J. (2016): First-principles study of boron speciation in calcite and aragonite. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **193**, 119-131.
- Baroni, S., de Gironcoli, S., Dal Corso, A., Giannozzi, P. (2001): Phonons and related crystal properties from density-functional perturbation theory. *Rev. Modern Phys.*, **73**, 515-561.
- Belousov, M.V., Pogarev, D.E., Shultin, A.A. (1970): Band intensity of extraplanar ν_2 vibration of CO_3^{2-} and NO_3^- ions in crystals having calcite and aragonite structure. *Soviet Phys. Solid State*, **11**, 2185-2186.
- Bender, M.L., Lorens, R.B., Williams, D.F. (1975): Sodium, magnesium, and strontium in the tests of planktonic foraminifera. *Micropaleontology*, **21**, 448-459.

- Berner, R.A. (1975): The role of magnesium in the crystal growth of calcite and aragonite from sea water. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **39**, 489–504.
- Berner, R.A., Lasaga, A.C., Garrels, R.M. (1983): The carbonate-silicate geochemical cycle and its effect on atmospheric carbon dioxide over the past 100 million years. *Am. J. Sci.*, **283**, 641-683.
- Blanch, A.J., Quinton, J.S., Lenehan, C.E. Pring, A. (2007): Autocorrelation infrared analysis of mineralogical samples: The influence of user controllable experimental parameters. *Anal. Chim. Acta*, **590**, 145–150
- Blanchard, M., Balan, E., Giura, P., Béneut, K., Yi, H., Morin, G., Pinilla, C., Lazzeri, M., Floris, A. (2013): Infrared spectroscopic properties of goethite: anharmonic broadening, long-range electrostatic effects and Al substitution. *Phys. Chem. Minerals*, **41**, 289-302.
- Blundy, J. & Wood, B. (1994): Prediction of crystal-melt partition coefficients from elastic moduli. *Nature*, **372**, 452–454.
- Bots, P., Benning, L.G., Rickaby, R.E.M., Shaw, S. (2011): The role of SO₄ in the switch from calcite to aragonite seas. *Geology*, **39**, 331-334.
- Bottcher, M. E., Gehlken, P. L.; Steele, D. F. (1997): Characterization of inorganic and biogenic magnesian calcites by Fourier transform infrared spectroscopy. *Sol. State Ion.*, **101**, 1379–1385.
- Boyle, E. A. (1981): Cadmium, zinc, copper, and barium in foraminifera tests. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **53**, 11–35.
- Branson, O., Kaczmarek, K., Refern, S.A.T., Misra, S., Langer, G., Tyliczszak, T., Bijma, J., Elderfield, H. (2015): The coordination and distribution of B in foraminiferal calcite. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **416**, 67-72.
- Bruggeman, D.A.G. (1935): Berechnung verschiedener physikalischer Konstanten von heterogenen Substanzen. I. Dielektrizitätskonstanten und Leitfähigkeiten der Mischkörper aus isotropen Substanzen. *Ann. Physik*, **416**, 665-679.
- Busenberg, E., Plummer, L.N. (1985): Kinetic and thermodynamic factors controlling the distribution of SO₄²⁻ and Na⁺ in calcites and selected aragonites. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **49**, 713-725.
- Carignan, J., Hild, P., Mevelle, G., Morel, J., Yeghicheyan, D. (2001): Routine Analyses of Trace Elements in Geological Samples Using Flow Injection and Low Pressure On-Line Liquid Chromatography Coupled to ICP-MS: A Study of Geochemical Reference Materials BR, DR-N, UB-N, AN-G and GH. *Geostandards Newsletter*, **25**, 187–198.
- Carteret, C., De La Pierre, M., Dossot, M., Pascale, F., Erba, A., Dovesi, R. (2013): The vibrational spectrum of CaCO₃ aragonite: A combined experimental and quantum-mechanical investigation. *J. Chem. Phys.*, **138**, 014201.
- Catti, M., Pavese, A., Price, G.D. (1993): Thermodynamic properties of CaCO₃ calcite and aragonite: A quasi-harmonic calculation. *Phys. Chem. Minerals*, **19**, 472-479.
- Clark, S.J., Jouanna, P., Haines, J. Mainprice, D. (2011): Calculation of infrared and Raman vibration modes of magnesite at high pressure by density-functional perturbation theory and comparison with experiments. *Phys. Chem. Minerals*, **38**, 193-202.
- Côté, A.S., Darkins, R., Duffy, D.M. (2015): Deformation twinning and the role of amino acids and magnesium in calcite hardness from molecular simulation. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **17**, 20178-20184.
- Cuif, J.P., Dauphin, Y., Doucet, J., Salome, M., Susini, J. (2003): XANES mapping of organic sulfate in three scleractinian coral skeletons. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **67**, 75–83

- Dauphin, Y. (1999): Infrared spectra and elemental composition in recent biogenic calcites: Relationships between the ν_4 band wavelength and Sr and Mg Concentrations. *App. Spectro.*, **53**, 184-190.
- Dauphin, Y. & Cuif, J.P. (1999): Relation entre les teneurs en soufre des biominéraux calcaires et leurs caractéristiques minéralogiques. *Ann. Sci. Nat.*, **2**, 73–85.
- Dauphin, Y., Cuif, J.P., Salome, C., Susini, J. (2005): Speciation and distribution of sulfur in a mollusk shell as revealed by in situ maps using X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy at the S K-edge. *Am. Mineral.*, **90**, 1748–1758.
- Delfyett, P.J., Dorsinville, R., Alfano, R.R. (1989): Multiphonon dephasing of the 1086-cm^{-1} mode in calcite. *Phys. Rev. B*, **39**, 3845-3853.
- De Yoreo, J.J. & Vekilov P.G. (2003): Principles of crystal nucleation and growth. In *Biom mineralization*, Vol. 54 (eds. P. M. Dove, J. J. De Yoreo, S. Weiner) Mineralogical Society of America Washington, D.C.
- Donoghue, M., Hepburn, P.H., Ross, S.D. (1971): Factors affecting the infrared spectra of planar anions with D_{3h} symmetry V: The origin of the splitting of the out-of-plane bending mode in carbonates and nitrates. *Spectrochim. Acta A*, **27**, 1065–1072.
- Elderfield, H. & Ganssen, G. (2000): Past temperature and $\delta^{18}\text{O}$ of surface ocean waters inferred from foraminiferal Mg/Ca ratios. *Nature*, **405**, 442-445.
- Erez, J. (2003): The source of ions for biomineralization in foraminifera and their implications for paleoceanographic proxies, biomineralization. *Rev. Mineral. Geochem.*, **54**, 115–149.
- Fernández-Díaz, L., Fernández-González, A., Prieto, M. (2010): The role of sulfate groups in controlling CaCO₃ polymorphism. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **74**, 6064-6076.
- Floquet N., Vielzeuf D., Ferry D., Ricolleau A., Heresanu V., Perrin J., Laporte D., Fitch A.N. (2015) Thermally Induced Modifications and Phase Transformations of Red Coral Mg-Calcite Skeletons from Infrared Spectroscopy and High Resolution Synchrotron Powder Diffraction Analyses. *Cryst. Growth Des.* 2015, 15, 3690–3706
- Garrity, K.F., Bennett, J.W., Rabe, K.M., Vanderbilt, D. (2014): Pseudopotentials for high-throughput DFT calculations. *Comput. Mat. Sci.*, **81**, 446-452.
- Giannozzi, P., Baroni, S., Bonini, N., Calandra, M., Car, R., Cavazzoni, C., Ceresoli, D., Chiarotti, G.L., Cococcioni, M., Dabo, I., Dal Corso, A., de Gironcoli, S., Fabris, S., Fratesi, G., Gebauer, R., Gerstmann, U., Gougoussis, C., Kokalj, A., Lazzeri, M., Martin-Samos, L., Marzari, N., Mauri, F., Mazzarello, R., Paolini, S., Pasquarello, A., Paulatto, L., Sbraccia, C., Scandolo, S., Sclauzero, G., Seitsonen, A.P., Smogunov, A., Umari, P., Wentzcovitch, R.M. (2009): Quantum ESPRESSO: a modular and open-source software project for quantum simulations of materials. *J. Phys.: Condens. Matter.*, **21**, 395502.
- Gill, B.C., Lyons, T.W., Frank, T.D. (2008): Behavior of carbonate-associated sulfate during meteoric diagenesis and implications for the sulfur isotope paleoproxy. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **72**, 4699-4711.
- Graham, D.W., Bender, M.L., Williams, D.F., Keigwin, L.D. (1982): Strontium-calcium ratios in Cenozoic planktonic foraminifera. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **46**, 1281-1292.
- Grzechnik, A., Simon, P., Gillet, P., McMillan, P. (1999): An infrared study of MgCO₃ at high pressure. *Phys. B: Condens. Matter.*, **262**, 67–73.
- Gueta, R., Natan, A., Addadi, L., Weiner, S., Refson, K., Kronik, L. (2007): Local atomic order and infrared spectra of biogenic calcite. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 291–294.

- Halevy, I., Peters, S.E., Fischer, W.W. (2012): Sulfate burial constraints on the Phanerozoic sulfur cycle. *Science*, **337**, 331-334.
- Hellwege, K.H., Lesch, W., Plihal, M., Schaack, G. (1970): Zwei-phononen-absorptionsspektren und dispersion der schwingungszweige in kristallen der kalkspatstruktur. *Z. Phys.*, **232**, 61-86.
- Kampschulte, A. & Strauss, H. (2004): The sulfur isotopic evolution of Phanerozoic seawater based on the analysis of structurally substituted sulfate in carbonates. *Chem. Geol.*, **204**, 255-286.
- Klochko, K., Cody, G.D., Tossell, J.A., Dera, P., Kaufman, A.J. (2009): Re-evaluating boron speciation in biogenic calcite and aragonite using ^{11}B MAS NMR. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **73**, 1890–1900.
- Kontrec, J., Kralj, D., Brecevic, L., Falini, G., Fermani, S., Noethig-Laslo, V., Miroslavljevic, K. (2004): Incorporation of inorganic anions in calcite. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 4579-4585.
- Kunitake, M.E., Mangano, L.M., Peloquin, J.M., Baker, S.P., Estroff, L.A. (2013): Evaluation of strengthening mechanisms in calcite single crystals from mollusk shells. *Acta Biomater.*, **9**, 5353–5359.
- Lazzeri, M., Calandra, M., Mauri, F. (2003): Anharmonic frequency shift in MgB_2 . *Phys Rev B*, **68**, 220509.
- Long, X., Ma, Y., Qi, L. (2013): Biogenic and synthetic high magnesium calcite – A review. *J. Struct. Biol.*, **185**, 1–14.
- Mavromatis, V., Montouillout, V., Noireaux, J., Gaillardet, J., Schott, J. (2015): Characterization of boron incorporation and speciation in calcite and aragonite from co-precipitation experiments under controlled pH, temperature and precipitation rate. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **150**, 299-313.
- Menéndez, J. & Cardona, M. (1984): Temperature dependence of the first-order Raman scattering by phonons in Si, Ge, and α -Sn: Anharmonic effects. *Phys. Rev. B*, **29**, 2051-2059.
- Mitsuguchi, T., Matsumoto, E., Abe, O., Uchida, T., Isdale, P.J. (1996): Mg/Ca thermometry in coral skeletons. *Science*, **274**, 961-963.
- Morse, J.W. & Bender, M.L. (1990): Partition coefficients in calcite: Examination of factors influencing the validity of experimental results and their application to natural systems. *Chem. Geol.*, **82**, 265-277.
- Murray Roberts, J., Wheeler, A.J., Freiwald, A., Cairns, S.D. (2009): Cold-water corals The biology and geology of deep-sea coral habitats. Cambridge University Press.
- Nguyen, L.T., Rahman, M.A., Maki, T., Tamenori, Y., Yoshimura, T., Suzuki, A., Iwasaki, N., Hasegawa, H. (2014): Distribution of trace element in Japanese red coral *Paracorallium japonicum* by μ -XRF and sulfur speciation by XANES: Linkage between trace element distribution and growth ring formation. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **127**, 1–9.
- Noireaux, J., Mavromatis, M., Gaillardet, J., Schott, J., Montouillout, V., Louvat, P., Rollion-Bard, C., Neuville, D.R. (2015): Crystallographic control on the boron isotope paleo-pH proxy. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **430**, 398-407.
- Palmer, M.R., Pearson, P.N., Cobb, S.J. (1998): Reconstructing past ocean pH-depth profiles. *Science*, **282**, 1468-1471.
- Paquette, J. & Reeder, R.J. (1995): Relationship between surface structure, growth mechanism, and trace element incorporation in calcite. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **59**, 735-749.
- Pavese, A., Catti, M., Price, G.D., Jackson, R.A. (1992): Interatomic potentials for CaCO_3 polymorphs (calcite and aragonite), fitted to elastic and vibrational data. *Phys. Chem. Minerals*, **19**, 80-87.
- Perdew, J.P., Burke, K., Ernzerhof, M. (1996): Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys. Rev. Lett.*, **77**, 3865–3868.

- Pingitore, N.E., Jr, Meitzner, G., Love, K.M. (1995): Identification of sulfate in natural carbonates by X-ray absorption spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **59**, 2477-2483.
- Prencipe, M., Pascale, F., Zicovich-Wilson, C.M., Saunders, V.R., Orlando, R., and Dovesi, R. (2004): The vibrational spectrum of calcite (CaCO₃): an ab initio quantum-mechanical calculation. *Phys. Chem. Minerals*, **31**, 559-564.
- Rao, K.V.K., Naidu, S.V.N., Murthy, K.S. (1968): Precision lattice parameters and thermal expansion of calcite. *J. Phys. Chem. Solids*, **29**, 245-248.
- Reeder, R.J., Lamble, G.M., Lee, J.-F., Staudt, W.J. (1994): Mechanism of SeO₄²⁻ substitution in calcite: An XAFS study. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **58**, 5639-5646.
- Reeder, R.J., Lamble, G.M., Northrup, P.A. (1999): XAFS study of the coordination and local relaxation around Co²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, and Ba²⁺ trace elements in calcite. *Am. Miner.*, **84**, 1049-1060.
- Riccardi, A.L., 2007. Carbonate-associated sulfate: Assessment of and use as an isotopic proxy for global sulfur cycling during end-Permian mass extinction. Thesis. The Pennsylvania State University.
- Riccardi, A.L., Arthur, M.A., Kump, L.R. (2006): Sulfur isotopic evidence for chemocline upward excursions during the en-Permian mass extinction. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **70**, 5740-5752.
- Rollion-Bard, C., Blamart, D., Trebosc, J., Tricot, G., Mussi, A., Cuif J.-P. (2011): Boron isotopes as a pH proxy: A new look at boron speciation in deep-sea corals using ¹¹B MAS NMR and EELS. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **75**, 1003-1012.
- Rüggeberg, A., Fietzke, J., Liebetrau, V., Eisenhauer, A., Dullo, W.-C., Freiwald, A. (2008): Stable strontium isotopes ($\delta^{88/86}\text{Sr}$) in cold-water corals – a new proxy for reconstruction of intermediate ocean water temperatures. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **269**, 570-575.
- Sakurai, T. & Sato, T. (1971): Temperature dependence of vibrational spectra in calcite by means of emissivity measurements. *Phys. Rev. B.*, **4**, 583-591.
- Salje, E.K.H., Wruck, B., Thomas, H. (1991): Order parameter saturation and low-temperature expansion of Landau theory. *Z Phys.*, **82**, 399-404.
- Salje, E.K.H., Carpenter, M.A., Malcherek, T., Boffa Balaban, T. (2000): Autocorrelation analysis of infrared spectra from minerals. *Eur. J. Mineral.*, **12**, 503-519.
- Salje, E.K.H. & Viswanathan, K. (1976): The phase diagram calcite-aragonite as derived from the crystallographic properties. *Contrib. Mineral. Petrol.*, **55**, 55-67.
- Sen, S., Stebbins, J.F., Hemming, N.G., Ghosh B. (1994): Coordination environments of B impurities in calcite and aragonite polymorphs: A ¹¹B MAS NMR study. *Am. Mineral.* **79**, 819-825.
- Sood, A.K., Arora, A.K., Umadevi, V., Venkataraman, G. (1981): Raman study of temperature dependence of lattice modes in calcite. *Pramana*, **16**, 1-16.
- Sterzel, W. & Chorinsky, E. (1968): Die wirkung schwerer kohlenstoffisotope auf das infrarotspektrum von carbonaten. *Spectrochim. Acta*, **24A**, 353-360.
- Stineman, R.W. (1980): A consistently well-behaved method of interpolation. *Creative Comput.*, **6**, 54-57.
- Strauss, H. (1999): Geological evolution from isotope proxy signals - sulfur. *Chem. Geol.*, **161**, 89-101.
- Takano, B., Asano, Y., Watakuni, K. (1980): Characterization of sulfate ion in travertine. *Contrib. Mineral. Petrol.*, **72**, 197-203.
- Takano, B. (1985) Geochemical implications of sulfate in sedimentary carbonates. *Chem. Geol.*, **49**, 393-403.

- Tamenori, Y., Yoshimura, T., Luan, N.T., Hasegawa, H., Suzuki, A., Kawahata, H., Iwasaki, N. (2014) Identification of the chemical form of sulfur compounds in the Japanese pink coral (*Corallium elatius*) skeleton using μ -XRF/XAS speciation mapping. *J. Struct. Biol.*, **186**, 214–223.
- Tang, Y., Elzinga, E.J., Lee, Y.J., Reeder, R.J. (2007): Coprecipitation of chromate with calcite: Batch experiments and X-ray absorption spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **71**, 1480–1493.
- Valenzano, L., Torres, F. J., Doll, K., Pascale, F., Zicovich-Wilson, C.M., Dovesi, R. (2006): Ab initio study of the vibrational spectrum and related properties of crystalline compounds: The case of CaCO_3 calcite. *Z. Phys. Chem.*, **220**, 893–912.
- Vavouraki, A., Putnis, C., Putnis, A., Koutsoukos, P. (2008): An Atomic Force Microscopy study of the growth of calcite in the presence of sodium sulfate. *Chem. Geol.*, **253**, 243-251.
- Vielzeuf, D., Garrabou, J., Gagnon, A., Ricolleau, A., Adkins, J., Gunther, D., Hametner, K., Devidal, J. L., Reusser, E., Perrin, J., Floquet, N. (2013): Distribution of sulphur and magnesium in the red coral. *Chem. Geol.*, **355**, 13–27.
- Wasylenki, L.E., Dove, P.M., Wilson, D.S., De Yoreo, J.J. (2005): Nanoscale effects of strontium on calcite growth: an in situ AFM study in the absence of vital effect. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **69**, 3017-3027.
- Weiner, S. & Dove, P.M. (2003): An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Rev. Mineral. Geochem.*, **54**, 1-29.
- White, W. B. (1974): The carbonate minerals. In: *The Infrared Spectra of Minerals*. Farmer, V. C. Ed., Mineralogical Society, London, 227-284.
- Xu, B. & Poduska, K.M. (2014): Linking crystal structure with temperature- sensitive vibrational modes in calcium carbonate minerals. *Phys.Chem.Chem.Phys.*, **16**, 17634.

Résumé

Les fragments de squelettes de vertébrés préservés sous forme de fossiles fournissent des informations paléo-environnementales uniques via leur composition isotopique et leur teneur en éléments traces. Toutefois la validité de ces informations dépend crucialement de la préservation de l'enregistrement géochimique biogénique au cours de la fossilisation. Ce travail a pour objectif de comprendre comment s'effectue l'acquisition de l'information géochimique puis sa préservation en étudiant les propriétés de fractionnement isotopique de l'apatite, constituant inorganique majeur des os et dents de vertébrés, et les mécanismes de transformations cristallochimiques impliqués par la fossilisation. Celles-ci sont sondées à l'échelle atomique à l'aide des spectroscopies ATR-FTIR et RMN du solide, leur interprétation s'appuyant sur la modélisation des spectres ATR-FTIR et le calcul *ab initio* (DFT) des propriétés de fractionnement isotopique à l'équilibre de l'apatite.

Les transformations à l'échelle atomique observées suite à l'altération d'os actuel en solution aqueuse attestent d'un processus de dissolution partielle de l'apatite biogénique et de formation de fluor- ou hydroxy- apatite carbonatée secondaire à la surface des cristallites, selon la présence ou non de fluor en solution. Ces résultats ont ensuite été appliqués à l'étude de la transformation d'os fossiles issus des environnements karstiques de Bolt's Farm dans le Berceau de l'Humanité (Afrique du Sud) et des environnements fluvio-lacustres volcano-sédimentaires des collines Tugen dans la vallée du Rift Grégory (Kenya). La formation de fluorapatite carbonatée est systématiquement observée, de l'hydroxyapatite carbonatée est également formée dans les fossiles de Bolt's Farm moins fluorés, soulignant ainsi le potentiel des ossements fossiles à révéler les conditions précoces de fossilisation. Un degré maximal de transformation, aussi bien des os fossiles que des os actuels altérés, est observé à environ 60 % d'apatite secondaire, suggérant l'idée d'un rôle protecteur de cette phase contre la dissolution totale de l'apatite primaire.

Mots clés : apatite, fossile, os, diagénèse, Berceau de l'Humanité, fractionnement isotopique, spectroscopie ATR-FTIR, RMN, calculs *ab initio*

Abstract

Chemical and stable isotope compositions of fossil remains of vertebrates provide unique palaeo-environmental information. However, its reliability depends on the preservation of the biogenic geochemical record during the fossilisation process. This work aims to understand how the geochemical record is acquired and preserved by studying the isotopic fractionation properties of apatite, the main inorganic constituent of vertebrates bones and teeth, and the crystal-chemical transformations occurring during fossilisation. These transformations are probed at the atomic scale using ATR-FTIR and solid-state NMR spectroscopies and their interpretation is supported by the modelling of ATR-FTIR spectra and DFT calculations of theoretical equilibrium isotopic fractionation properties.

Atomic scale transformations of bones altered in aqueous solutions consist of partial dissolution of the biogenic apatite and formation of secondary carbonated fluor- or hydroxy- apatite, depending on the presence or absence of fluoride in the solution. These results were then applied to the study of the transformation of fossil bones from the karstic environments of Bolt's Farm cave system (Cradle of Humankind, South Africa) and from the fluvio-lacustrine environments of the Tugen Hills (Gregory Rift, Kenya). Systematic formation of secondary carbonated fluorapatite is observed, as well as formation of secondary carbonated hydroxyapatite in the less fluorinated Bolt's Farm fossils, highlighting the potentiality of fossil bones to record local physical-chemical conditions prevailing in fossilisation environments. The ~ 60 % maximum fraction of secondary apatite observed in fossils and modern bones altered under controlled conditions suggests it has a protective role against further dissolution of the primary apatite.

Key-words: apatite, fossils, bone, diagenesis, Cradle of Humankind, isotopic fractionation, ATR-FTIR spectroscopy, NMR, *ab initio* calculations