



**HAL**  
open science

# Stratégies de reproduction mammaliennes et isotopie du calcium : témoins actuels et perspectives fossiles

Auguste Hassler

► **To cite this version:**

Auguste Hassler. Stratégies de reproduction mammaliennes et isotopie du calcium : témoins actuels et perspectives fossiles. Sciences de la Terre. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LY-SEN033 . tel-03457428

**HAL Id: tel-03457428**

**<https://theses.hal.science/tel-03457428v1>**

Submitted on 30 Nov 2021

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

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



Numéro National de Thèse : 2021LYSEN033

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée par  
**l'École Normale Supérieure de Lyon**

**Ecole Doctorale N°341**  
**Écosystèmes Évolution Modélisation Microbiologie (E2M2)**

**Discipline : Sciences de la Terre**

Soutenue publiquement le 15/07/2021, par :  
**Auguste HASSLER**

---

**Stratégies de reproduction  
mammaliennes et isotopie du calcium :  
témoins actuels et perspectives fossiles**

---

*Mammalian reproduction strategies and calcium  
isotopes: modern evidence and deep-time  
perspectives*

---

Devant le jury composé de :

TÜTKEN Thomas	Professeur des Universités	Université Johannes Gutenberg de Mayence	Rapporteur
ZAZZO Antoine	Directeur de recherche CNRS	MNHN Paris	Rapporteur
JAOUEN Klervia	Chargée de recherche CNRS	GET/OMP Toulouse	Examinatrice
SOURON Antoine	Maître de conférences	Université de Bordeaux	Examinateur
MENOT Guillemette	Professeure des Universités	LGL-TPE, ENS de Lyon	Examinatrice
BALTER Vincent	Directeur de recherche CNRS	LGL-TPE, ENS de Lyon	Co-encadrant
MARTIN Jeremy	Chargé de recherche CNRS	LGL-TPE, UCB Lyon1, ENS de Lyon	Directeur de thèse







# Table des matières

<b>LANGUE/LANGUAGE .....</b>	<b>8</b>
<b>COMMENTAIRE DE L'AUTEUR SUR LE TITRE DE LA THESE.....</b>	<b>8</b>
<b>REMERCIEMENTS/ACKNOWLEDGMENTS .....</b>	<b>10</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>16</b>
<b>CHAPITRE I - INTRODUCTION .....</b>	<b>19</b>
A.    HISTOIRE EVOLUTIVE DES MAMMIFERES ET DE LA LACTATION .....	19
1. <i>Rôle de la lactation dans la biosphère actuelle .....</i>	<i>19</i>
2. <i>L'origine évolutive des mammifères .....</i>	<i>26</i>
3. <i>Premiers mammifères et diversifications du groupe .....</i>	<i>29</i>
4. <i>Origine anatomique, génétique et fonctionnelle de la lactation .....</i>	<i>37</i>
B.    L'APPROCHE GEOCHIMIQUE .....	43
1. <i>Contexte général.....</i>	<i>43</i>
2. <i>Bases de géochimie élémentaire .....</i>	<i>45</i>
3. <i>L'approche géochimique en paléontologie : diagenèse et choix du proxy .....</i>	<i>46</i>
4. <i>Éléments traces et lactation .....</i>	<i>50</i>
C.    GEOCHIMIE ISOTOPIQUE.....	53
1. <i>Bases conceptuelles.....</i>	<i>53</i>
2. <i>Notations et formalisme.....</i>	<i>55</i>
3. <i>Isotopes légers et paléobiologie .....</i>	<i>58</i>
4. <i>Applications des isotopes du Ca.....</i>	<i>64</i>
D.    RESUME DE PROBLEMATIQUE ET PLAN DE THESE .....	72
<b>CHAPITRE II - METHODES DE PREPARATION DES ECHANTILLONS ET D'ANALYSE .....</b>	<b>75</b>
A.    EXTRACTION ET PURIFICATION DU CA .....	75
1. <i>Diversité des méthodes de préparation.....</i>	<i>75</i>
2. <i>Réactifs et matériel de laboratoire.....</i>	<i>76</i>

3.	<i>Dissolution des échantillons et digestion de la matière organique</i>	77
4.	<i>Élimination de la matrice</i>	78
5.	<i>Élimination du Fe, Zn et Cu</i>	81
6.	<i>Séparation du Ca et du Sr</i>	81
B.	<b>ANALYSE DES COMPOSITIONS ISOTOPIQUES DU CA PAR MC-ICP-MS</b>	82
1.	<i>TIMS versus MC-ICP-MS</i>	82
2.	<i>Introduction de l'échantillon</i>	83
3.	<i>Contrôle du faisceau d'ions et système de détection</i>	85
4.	<i>Interférences et pouvoir de résolution</i>	86
5.	<i>Interférence par le strontium</i>	90
6.	<i>Correction du biais en masse instrumentale</i>	91
7.	<i>Séquence d'analyse type</i>	93
8.	<i>Paramètres de contrôle</i>	95
9.	<i>Stabilité à long terme et justesse des mesures de rapports isotopiques</i>	97
10.	<i>Incertitudes de mesures</i>	98
11.	<i>Intervalles de confiance minimum et niveau cible de réplication des mesures</i>	99
12.	<i>Effets de matrice et seuils de concentration</i>	102
	<b>CHAPITRE III - CYCLE DE REPRODUCTION ET FRACTIONNEMENTS ISOTOPIQUES DU CA</b>	<b>107</b>
A.	<b>INTRODUCTION</b>	107
B.	<b>RESUME</b>	107
C.	<b>ARTICLE : LACTATION AND GESTATION CONTROLS ON CALCIUM ISOTOPIC COMPOSITIONS IN A MAMMALIAN MODEL</b>	108
D.	<b>PERSPECTIVES SUR LES EFFETS DE LA LACTATION</b>	124
	<b>CHAPITRE IV - VARIABILITE DES EFFETS DE LA LACTATION CHEZ LES MAMMIFERES</b>	<b>127</b>
A.	<b>PREAMBULE</b>	127
B.	<b>ARTICLE : CALCIUM ISOTOPIC VARIABILITY OF CERVID BIOAPATITE AND IMPLICATIONS FOR MAMMALIAN PHYSIOLOGY AND DIET</b>	127
1.	<i>Introduction</i>	127
2.	<i>Résumé</i>	128
3.	<i>Article</i>	129

4.	<i>Perspectives sur les effets de la lactation</i> .....	144
C.	LE MODELE MURIN .....	144
1.	<i>Introduction</i> .....	144
2.	<i>Matériel et méthode</i> .....	146
3.	<i>Résultats et discussion</i> .....	146
4.	<i>Conclusion et perspectives</i> .....	147
D.	LES MARSUPIAUX ET LES MONOTREMES .....	147
1.	<i>Introduction générale</i> .....	147
2.	<i>Le wallaby de l'île Eugène</i> .....	148
3.	<i>Les monotrèmes</i> .....	154
4.	<i>Le fractionnement isotopique du Ca entre sang et lait</i> .....	163
5.	<i>Conclusion et perspectives</i> .....	170
E.	SYNTHESE ET DISCUSSION DE FIN DE CHAPITRE .....	172
	<b>CHAPITRE V - CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>181</b>
A.	RESUME DES CHAPITRES III ET IV .....	181
B.	PERSPECTIVES POUR L'ETUDE DE SPECIMENS FOSSILES ET DE L'ORIGINE DE LA LACTATION .....	182
1.	<i>Interprétation de l'absence de différences inter-sexes chez les espèces fossiles</i> .....	182
2.	<i>Limites de l'identification des différences isotopiques inter-sexes dans le registre fossile</i> .....	184
3.	<i>Approches possibles</i> .....	186
4.	<i>Premières investigations dans le fossile</i> .....	192
C.	CONCLUSION.....	192
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>194</b>
	<b>ANNEXE A – ARTICLE</b> .....	<b>213</b>
	CALCIUM ISOTOPES OFFER CLUES ON RESOURCE PARTITIONING AMONG CRETACEOUS PREDATORY DINOSAURS .....	213
	<b>ANNEXE B – ARTICLE</b> .....	<b>223</b>
	WESTERN TETHYS EARLY AND MIDDLE JURASSIC CALCAREOUS NANNOFOSSIL BIOSTRATIGRAPHY .....	223
	<b>ANNEXE C – ARTICLE</b> .....	<b>245</b>
	ABSENCE OF TEMPERATURE EFFECT ON ELUTION PROFILES ON ANIONIC AND CATIONIC ION-EXCHANGE RESINS FROM 4°C TO 28°C .....	245



# Langue/Language

La thèse qui suit est rédigée pour l'essentiel en français, à l'exception des figures légendées en français et en anglais et des articles en anglais inclus dans ce manuscrit (articles qui sont au format des journaux dans lesquels ils ont été publiés).

Most of the following thesis is written in French with the exception of figures, tables and their captions which are also written in English, as well as the two articles included in the manuscript (in their original format).

## Commentaire de l'auteur à propos du titre

En démarrant cette thèse l'ambition était d'aboutir rapidement à des études portant sur des espèces fossiles, comme l'atteste le titre initial de cette thèse : Stratégies de reproduction des mammifères et isotopes du calcium : contraindre l'origine de la lactation. Toutefois, les études menées sur les mammifères actuels ont su révéler une diversité bien plus riche de résultats qu'anticipé. Beaucoup de perspectives et de questions ont notamment émergées de l'étude des monotrèmes et des marsupiaux, avec des réponses et des hypothèses qui pour certaines n'ont pu émerger qu'à la lumière d'études plus approfondies d'autres mammifères actuels (le cochon domestique et le cerf élaphe notamment). La place des mammifères actuels dans cette thèse a motivé un changement de titre qui permet de mieux souligner cet aspect central de ces travaux. Bien que cette thèse n'a donc pas été l'occasion de mener des investigations poussées sur des mammifères fossiles ou d'autres clades phylogénétiquement proches, l'objectif est toutefois resté de proposer des solutions pour pouvoir étudier ces groupes fossiles à l'avenir. Le titre final de cette thèse (Stratégies de reproduction mammaliennes et isotopie du calcium : témoins actuels et perspectives fossiles) concilie ces deux aspects.



# Remerciements/Acknowledgments

Si j'en crois les récits de mes confrères doctorants, doctorantes et mon expérience personnelle, on peut résumer une thèse à un mélange subtil d'apprentissages, de découvertes, d'échecs, de défis, de succès et de rebondissements. Si ma thèse fut une aventure scientifique riche en enseignements, elle fut aussi une aventure humaine passionnante dont il me reste, je pense, encore de nombreuses leçons à tirer. Au cours de mon parcours de doctorant, mon chemin aura croisé celui de nombreuses autres personnes qui furent autant de soutiens, de collaborateurs, de compagnons de voyage et de perspectives sur la vie. Je compte profiter de ces quelques lignes pour remercier toutes ces personnes. Mes premiers remerciements s'adressent naturellement à Jeremy Martin, mon directeur de thèse. Tu m'as transmis les bases de la recherche, tu m'as donné la chance dès le master de travailler sur des questions scientifiques passionnantes, et tu m'as donné l'opportunité de m'investir dans de nombreux projets pour lesquels l'avenir promet encore de belles publications je pense. En tant que directeur, tu as toujours su être là pour me guider et me conseiller quand j'en avais besoin, tout en me laissant suivre mes intuitions et mener mes projets à bien de manière autonome. J'ai beaucoup appris à tes côtés et je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi jusqu'ici. Merci d'avoir été mon directeur de thèse.

Je souhaiterais aussi adresser un grand merci à Vincent Balter, mon co-encadrant, dont j'ai pu bénéficier de la clairvoyance tout au long de ma thèse. Tes remarques et tes points de vue ont toujours été d'une grande pertinence et m'auront évité bien des écueils.

J'aimerais adresser ma pleine reconnaissance à Thomas Tütken et Antoine Zazzo pour avoir accepté de rapporter mon travail de thèse et pour leurs remarques constructives, ainsi qu'à Antoine Souron, Klervia Jaouen et Guillemette Menot pour avoir accepté d'être examinateur et examinatrices de ma soutenance de thèse.

Je remercie également chaleureusement mon comité de suivi de thèse composé de Romain Amiot, Cyril Charles, Lionel Hautier et de ma tutrice Sabrina Renaud. Vous m'avez aidé à me poser les bonnes questions aux bons moments, et les discussions que nous avons eues tous ensemble m'auront été

d'une grande aide pour mener cette thèse à bien, tout en l'enrichissant de nouvelles perspectives et projets.

Par ailleurs, je remercie toutes les personnes du Laboratoire de Géologie de Lyon et du reste de la France avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer de près ou de loin durant ma thèse. J'adresse ainsi un grand merci à Emmanuelle Albalat, ta pédagogie et ta grande expérience des méthodes analytiques auront été un soutien inestimable à de nombreuses étapes charnières de ma thèse. Je remercie également Philippe Télouk et Florent Arnaud-Godet pour leur assistance sur les spectromètres. Plus d'une session d'analyse se serait terminée prématurément sans vos conseils aiguisés et vos tours de tournevis bien placés. Merci également à Gilles Montagnac pour ton assistance technique, le partage de ton expertise si précieuse sur les spectromètres Raman et pour ton agréable compagnie. Merci à Bruno Reynard d'avoir partagé avec moi ton expérience sur les terres-rares et le reste. Merci aussi à Théo Tacail, pour tout ce que tu as pu me transmettre lors de ton temps passé à Lyon et au-delà. Merci à Aline Lamboux, pour cette collaboration autour des chimies en conditions thermiques exotiques et pour ta bonne humeur inconditionnelle. Merci à Emanuela Mattioli et Guillaume Suan de m'avoir impliqué si tôt dans des projets de recherche aussi passionnants. Collaborer avec vous a toujours été un plaisir. Merci à Alessandro Menini, pour cette enrichissante collaboration autour des changements environnementaux du PETM. Merci à Christophe Lécuyer pour ces discussions enrichissantes autour de différents systèmes isotopiques. Merci à Damien Molex pour la production des lames minces que j'ai utilisées durant ma thèse et pour ta gestion de la lithothèque. Merci à Gildas Merceron avec qui j'ai eu la joie de collaborer et avec qui c'est toujours un plaisir de discuter de science et d'autres choses. Merci à Mathieu Garel pour ta disponibilité et tes lumières sur l'écologie des cervidés. Merci à Stéphane Ferchaud, Doryan Grivault et au reste de l'équipe de l'INRAE GenESI pour l'enthousiasme et les efforts renouvelés que vous aurez déployés autour du projet IsoCal. Merci également à Laury Ohannessian et au reste de l'équipe du Parc de la Tête d'Or pour votre dynamisme et votre investissement dans les projets que nous avons initiés ensemble. Un grand merci à Marie-Jeanne Barrier pour ta bonne humeur sans faille, ton efficacité redoutable et pour la pédagogie dont tu as toujours fait preuve avec moi pour me guider dans les méandres des procédures administratives. Enfin,



merci à Ronan Allain, Dominique Augier, Jean Goedert et au reste de la « Angeac-family » pour tout ce que j'ai pu partager avec vous durant ces passionnants étés de fouilles.

Je remercie tous les conservateurs de collections et personnels de musée de France et d'Australie qui m'ont permis d'accéder à certains spécimens que j'ai étudiés. Je pense notamment à Emmanuel Robert des collections de paléontologie du Laboratoire de Géologie de Lyon, à Didier Berthet du musée des Confluences de Lyon, à Kenny Travouillon, Paul Doughty et Rebecca Bray du Western Australian museum, ainsi qu'à Heather Janetzki, Patrick Couper et Andrew Amey du Queensland museum.

In 2018, the mission I did in Australia has been a wonderful human and scientific adventure and for that I would like to thank all the persons which contributed to this great experience. First, I would like to thank Tony Dosseto for his trust in me and in the project, for his hospitality, as well as for all what he did for me during my stay. I also want to give a special thanks to Dafne Koutamanis, for our nice collaborations in the labs of Lyon and Wollongong and because you played such a big part in making my mission in Australia such a wonderful moment. I also want to thank (non-exhaustively) all the other great persons I met in the Gong for their warm welcome, so thanks to Mariana Sontag González, Florian Gebert, Amy J Dougherty, Emma Harrison, Alix Scheer, Bryce Sherborne-Higgins, Alexander Francke, Meagan Lowe, Nick Mulcahy, Jessica Walsh, Katie Newton, Holly Taylor, Maria Schaarschmidt, Conor Macadams, Tom MacMahon, André Axver, Magda Pikante, Christian Ecolani, Loic Lombardo and all the others I did not cited already. I would like to express a warm thanks to Vera Weisbecker for all the energy and enthusiasm she put in the project, as well as to Thomas Guillerme, Gabrielle Henderson-Scott, Todd Knight and all the staff of the Queensland museum I already mentioned, for their hospitality and all the nice moments we shared together (extra spicy pizza included). Thanks again to Kenny Travouillon for his help in the Western Australian Museum, as well to all the other nice people I met on my way in Perth in the museum and in this lost location of Bennet Street. Thanks to Julie Sharp for her crucial help in giving me access to marsupial and monotreme milk samples. Finally, a huge thanks to all the nice and inspiring people I met during my peregrinations in this amazing country.

I also would like to express a warm thanks to all the people based in South Africa with whom I exchanged and collaborated during my thesis. Thus, I thank Bruce Rubidge, Julien Benoit, Aliénor

Duhamel and Kevin Rey for the inspiring discussions we had together. I deeply thank Grant Bybee and Jonah Choiniere for their dedication in the promising research projects in which we collaborated. Finally, a special thanks to Priyanka Davechand for all the nice experiments we conducted together in Lyon and all the nice moments we shared. It was simply a pleasure to meet you and work with you.

Finally, I would like to finish these English sections on a light note by thanking the BBC for having satisfied my thirst of dinosaurs during my childhood. I give the same thank to Steven Spielberg, and linked to that I would like to thank the Jurassic foundation for its contribution to one of my first research project.

Le début de mon aventure lyonnaise aura commencé il y a 9 ans. En intégrant la licence de géoscience de Lyon je ne m'imaginai pas tous les évènements et les rencontres qui allaient en découler, ni même que j'allais à mon tour enseigner dans cette même formation 5 ans plus tard. Merci donc à tous les enseignants de mon parcours universitaire lyonnais, mais aussi du reste de ma scolarité en Saône-et-Loire, qui ont su me conseiller et m'aiguiller dans mon parcours. Merci également à toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer durant les enseignements que j'ai donnés dans le cadre de mes ACE puis de mon ATER. Merci donc à Cyril Langlois de m'avoir donné la chance d'enseigner dans le cadre de la préparation à l'agrégation SV-STU. Merci à Claude Colombié, Phillipe Sorrel et Alicia Fantasia avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer dans les UEs de sédimentologie, et merci à Bernard Pitet de m'avoir donné la chance de participer à l'école de terrain de cette dernière année. Merci à Frederic Quillévéré, Vincent Perrier, Régis Chirat et Gilles Cuny pour leur collaboration dans le cadre des UEs de paléontologie et de sciences de l'évolution. Merci à Marianne Métois pour sa gestion aux petits oignons de l'UE de géosciences de 1<sup>er</sup> année dans un contexte sanitaire pourtant plein de rebondissements, et merci à tous les collègues que je n'ai pas encore cités.

Si cette thèse a pu se dérouler dans de bonnes conditions, c'est aussi en grande partie grâce aux personnes que j'ai côtoyées au quotidien au laboratoire de géologie de Lyon et en premier lieu grâce à mes compagnons du thésarium. Je souhaite donc remercier Samuel le Goff et Pierre-Jean Dodat pour les trocs de bécards, colonnes et autres bricoles, pour les coups de main, les tuyaux et surtout tout le reste. Je remercie Thibaut Clarté et Adrien Morison sans qui ce bureau n'aurait pas atteint des anti-

sommets si élevés de jeux de mots et pour leur contribution notable à la métrologie universelle des Mustélidés. Merci également à Damian Walwer, Anaïs Kobsch et Nadège Fetter pour toutes ces discussions et ces bons moments passés autour d'une tasse de thé ou sans. Je fais un clin d'œil à Marie Linglin, Alexandre Assemat, Thibault Clauzel, Mary Robles et Nicolas Lazzerini pour leurs passages appréciés dans ce bureau, et je remercie aussi Yohan Pochat, Danaé Guiserix, Valentine Schaaff, Valentin Bonnet Gibet et Laetitia Lebec qui, j'en suis sûr, assureront la relève spirituelle du thésarium. Ce bureau aura aussi vu passer un nombre notable de stagiaires de licence et de master. Je ne me risquerais pas à l'exercice de tous vous citer, mais par vos heures de labeur au laboratoire, par les discussions que j'ai pu avoir avec vous, ou par ce que vous aurez laissé derrière vous (merci à Alexandre Elyildirim pour cette super cible), vous aurez tous contribué à une part des souvenirs que je garderai de ces murs. Je souhaiterais toutefois adresser un merci particulier à Emma Fabre, Kani Bayez, Julie Rodet et Martin Giraud avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et à qui je souhaite le meilleur.

La liste des personnes du laboratoire avec qui j'aurais partagé les bons moments de cette thèse s'étend bien évidemment au-delà des murs du thésarium. Parmi les personnes que je n'ai pas encore citées, je souhaiterais donc remercier Delphine Losno, camarade de thèse des premiers jours jusqu'aux derniers, pour ta positivité contagieuse et pour tous ces moments passés à discuter des hauts et des bas de nos thèses et de nos vies autour d'une tasse de thé ou d'autre chose. En parlant de thé, merci pour tous les bons moments passés en compagnie de la team thé et des membres de la team café qu'on aime bien quand même. Merci donc aux thé-sards et thé-sés que j'ai déjà cités, et merci à sa majesté Quentin Amet, Mélie Cornet, Jean Milot, Chloé Malod-Dognin, Salomé Ansanay-Alex, Marianne Ars, Marine Pinto pour votre bonne humeur partagée au détour d'un couloir, pour l'ambiance durant les longues heures de chromatographie et pour tous ces moments de convivialité passés à l'ombre des platanes ou accompagnés d'une boisson maltée. Également un grand merci à tous mes comparses de Lyon 1 pour m'avoir accueilli lorsque j'étais de passage, et surtout pour tous ces bons moments passés au R6, à l'ombre d'une terrasse nommée d'un fameux mathématicien et philosophe français, ou bien partout ailleurs. Merci donc à Lucia Mandon, Cédric Millot, Victor Lherm, Robin Metayer et aux autres membres de la meilleure promo de licence/master géol (désolé pour les autres).

Merci aussi à Florian Millet, Rémi Menot, Chloé Alder, Sylvain Breton, Clément Brustel, Navid Hedjazian, Melissa Martinot, Anastasis Gkotsinas, Selma Benseguane, Arnauld Vinçon-Laugier et Ivan Jovović. Un merci particulier à Pauline Guenser et Farid Saleh qui font que 2+1 font 3 (vous pouvez vérifier c'est vrai) et sans qui ces années n'auraient pas été aussi rayonnantes et mémorables (see you for the next PAF annual meeting). Enfin, merci à Mathieu Touboul, Hervé Cardon, Gilles Dromart et à toutes les autres personnes du laboratoire que je n'ai pas encore citées pour ces moments conviviales passés au détour d'une pause café-thé, d'un apéro ou d'un pot de thèse.

Merci également à tous les amis qui m'aident à sortir de ma bulle d'universitaire (chapeau les artistes, ils se reconnaîtront). Vous commencez à être habitués à me voir refaire surface de temps à autre après des mois (années ?) sans trop de nouvelles, et peut être vous êtes-vous demandé ce que je pouvais bien faire depuis ces 4 ans (plus ?). Si c'est le cas je vous ai donné quelques pistes dans les pages qui suivent, et dans tous les cas c'est avec impatience que je vous dis à bientôt.

Aussi loin que je puisse m'en rappeler, je me suis toujours senti soutenu dans mon parcours. Une chose que je dois en premier lieu à mes parents, Francine et Joseph Hassler, qui m'ont toujours soutenu et qui ont permis à l'enfant passionné de géologie, de dinosaures et d'autres animaux que j'étais, d'en arriver là où j'en suis aujourd'hui. Si j'ai pu m'engager dans un parcours de si longue haleine, c'est je pense pour beaucoup grâce à l'environnement dans lequel j'ai grandi. J'en profite donc pour faire un clin d'œil à mes sœurs et mes beaux-frères, mes cousins et cousines (les coulines se reconnaîtront), mes neveux, nièces et filleul, mes oncles, tantes et grands-parents, qui ont tous à leur échelle contribué à faire que je ne changerais de famille pour rien au monde.

Enfin, je terminerai ces remerciements par ceux que je destine à Léa Chalvin, qui a été à mes côtés pendant toutes ces années de thèse, et qui est même allée braver les fautes d'orthographe de mon manuscrit fraîchement rédigé. Merci d'avoir toujours été là pour moi, pour partager les victoires autant que pour me soutenir dans les écueils de la vie. Pour tout ça et pour tout le reste, merci du fond du cœur.

# Résumé

La capacité à produire du lait (i.e. la lactation) est un trait partagé par toutes les espèces de mammifères actuelles. Cette capacité est capitale pour le développement des juvéniles et constitue un facteur déterminant de l'écologie et des stratégies de reproduction des espèces mammaliennes. Toutefois, sur la base des méthodes conventionnelles et des indices fossiles disponibles, il est difficile d'ancrer évolutivement et temporellement l'origine précise de la lactation et de ses fonctions biologiques. Dans la présente thèse, j'ai exploré les possibilités offertes par l'étude des isotopes du calcium (Ca) contenus dans la structure minérale des os et des dents. Plusieurs études publiées en amont de cette thèse suggèrent que la composition en isotopes stables du Ca des tissus minéralisés ( $^{44}\text{Ca}$  et  $^{42}\text{Ca}$  notamment) est susceptible d'être modifiée par la consommation et la production de lait. Par ailleurs, d'autres publications suggèrent que la composition isotopique du Ca de l'émail dentaire est capable de se préserver dans l'émail fossilisé et de fournir des informations sur l'écologie et la physiologie d'espèces disparues. Toutefois, les effets de la consommation et de la production de lait sur ces compositions isotopiques étaient jusqu'ici documentés chez une poignée d'espèces seulement. En outre, des doutes planaient encore sur la responsabilité réelle de la lactation sur certains de ces changements isotopiques. Il était donc nécessaire d'étendre le spectre des mammifères chez qui ces changements isotopiques étaient documentés et d'identifier plus précisément les causes physiologiques derrière ces changements. Pour investiguer ces questions, j'ai réalisé un suivi temporel des compositions isotopiques du Ca organique d'une population de cochons domestiques (*Sus scrofa domesticus*) durant un cycle de reproduction complet. J'ai ensuite comparé ces données expérimentales avec des données de modélisations permettant d'identifier les facteurs en jeu dans les variations de compositions isotopiques observées expérimentalement. J'ai également étudié les compositions isotopiques du Ca des tissus minéralisés de différentes populations de mammifères actuels comprenant des cerfs élaphe (*Cervus elaphus*), des souris grises (*Mus musculus*), des wallabys de l'île Eugène (*Macropus eugenii*), des échidnés à nez court (*Tachyglossus aculeatus*) et des ornithorynques (*Ornithorhynchus anatinus*), ainsi qu'une population de rennes fossiles (*Rangifer*

*tarandus*). Les résultats de ces études soulignent le rôle majeur de la lactation dans l'apparition de différences inter-sexes de compositions isotopiques du Ca des tissus (e.g.  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  du sang modifié de +0,4 ‰ lors de l'allaitement), et ont permis de documenter l'hétérogénéité de ces différences isotopiques à l'échelle des mammifères placentaires, des marsupiaux et des monotrèmes (i.e. présentes chez certains et absences chez d'autres). Les résultats obtenus au cours de cette thèse permettent des avancées importantes dans la compréhension du cycle isotopique du Ca chez les mammifères, et offrent de nouvelles perspectives pour explorer l'histoire évolutive de la lactation. En outre, ces résultats offrent aussi des perspectives intéressantes dans les domaines du biomédical et de la paléoécologie.

**Mots-clés** : isotopes non-traditionnels, MC-ICP-MS, modélisation, sexe, lait, géochimie, physiologie, biomédical



# Chapitre I - Introduction

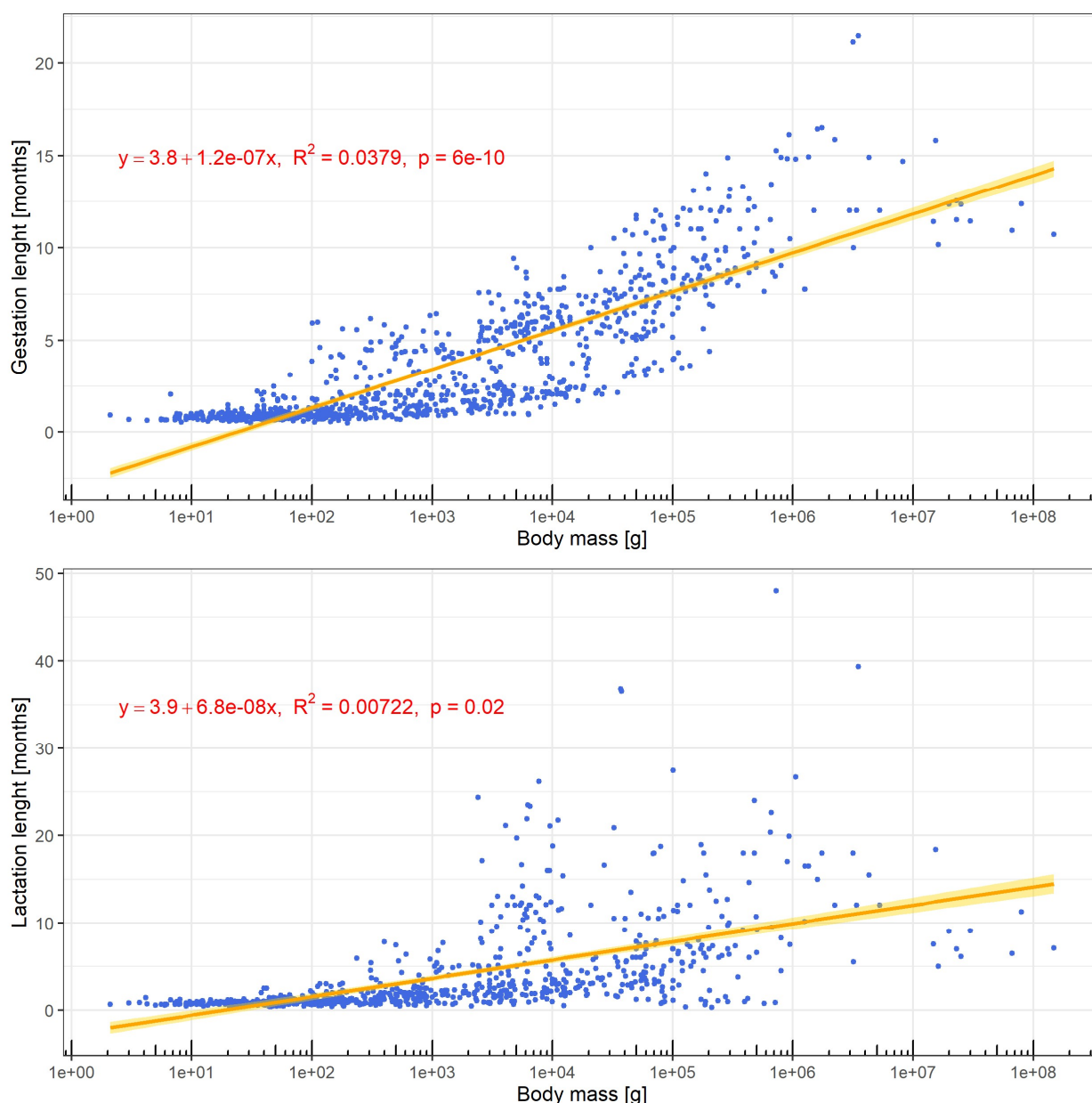
## *A. Histoire évolutive des mammifères et de la lactation*

### 1. Rôle de la lactation dans la biosphère actuelle

La Terre est peuplée de nombreuses espèces animales se distinguant entre autres par leur génétique, leur physiologie, leur anatomie et leur comportement. Parmi les plus de 40 000 espèces de Vertébrés vivantes décrites à ce jour, on compte près de 6 000 espèces de mammifères (classe : Mammalia), des animaux possédant un certain nombre de caractères reconnaissables tels que la présence d'un néocortex au niveau du cerveau antérieur, d'une mâchoire inférieure constituée d'un os unique (le dentaire), ainsi que de glandes mammaires permettant la production de lait (Benton, 2005 ; Kemp, 2005 ; Zachos et al., 2018 ; Roskov et al., 2019). En outre, la plupart des mammifères possèdent des poils sur leur peau ainsi qu'un certain degré d'endothermie et d'homéothermie. En d'autres termes, ce sont généralement des animaux à sang chaud dont la chaleur interne est produite et maintenue stable par un ensemble de mécanismes anatomiques et hormonaux, au même titre que les oiseaux par exemple. Un autre trait commun des mammifères tient dans leur stratégie de reproduction, que l'on identifie généralement comme une stratégie de type K. Par opposition aux stratégies dites « r », les stratégies K se caractérisent par un plus grand investissement des individus adultes dans le soin apporté à leur progéniture (Wilson et MacArthur, 1967 ; Pianka, 2017), maximisant ainsi les chances de survie de celle-ci, généralement au détriment du nombre de naissances. En pratique, la gamme des stratégies de reproduction est bien plus complexe car il existe un continuum entre les stratégies r et K (Pianka, 2017) et que le soin apporté à la progéniture peut se manifester par l'intermédiaire d'une large diversité de traits biologiques et comportementaux (e.g. poche marsupiale, lactation, surveillance des œufs, collecte de nourriture pour les juvéniles, maintien de la progéniture à des températures corporelles élevées). Ainsi, même si on classe les mammifères parmi les animaux adoptant plutôt une stratégie K (Pond, 1977 ; Pianka, 2017), on distingue chez eux un large panel de stratégies de reproduction avec, entre autre, différents degrés d'investissement parental (au sens biologique du terme), différentes fréquences de reproduction et des portées de tailles très différentes.



Quelques exemples et représentations graphiques permettent de mieux apprécier l'étendue de cette gamme. On peut par exemple citer la souris grise (*Mus musculus*), qui se reproduit en moyenne 4,5 fois par an, avec des portées de 5,5 individus en moyenne pour des durées de gestation et

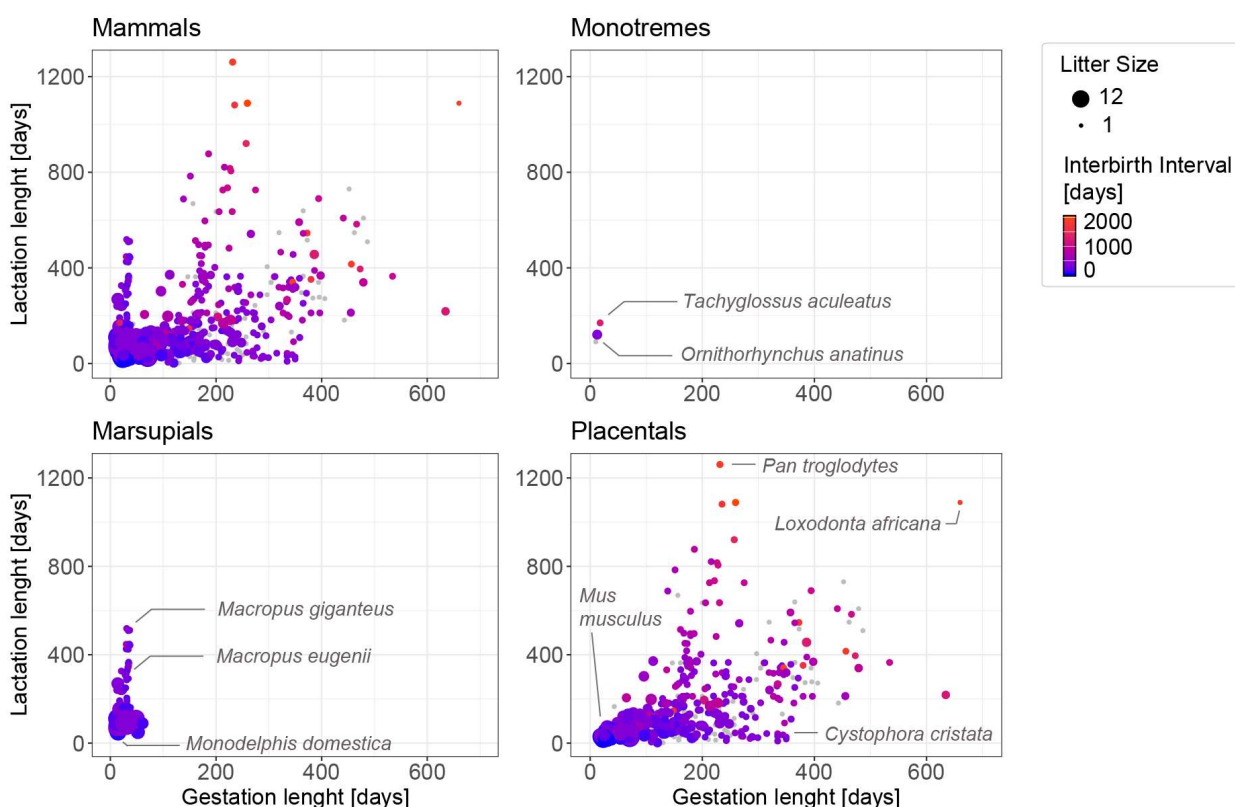


**Figure I.1 – Corrélation de la durée de gestation et de lactation avec la masse corporelle de différentes espèces de mammifères placentaires non-volants.** Les données de ces graphiques sont issues de l'archive écologique E084- 093 (Ernest, 2003). 991 et 802 espèces sont respectivement représentées dans les graphiques du haut et du bas. Ces corrélations sont statistiquement significatives ( $p$  value < 0,05), toutefois la masse corporelle ne permet pas de prédire efficacement les durées de gestation et de lactation à l'échelle des placentaires non-volants ou à plus grande échelle ( $R^2$  très faible). **Correlation of gestation and lactation lengths with the body mass of different nonvolant placental mammals.** Data from these graphs are retrieved from the ecological archive E084- 093 (Ernest, 2003). 991 and 802 species are presented in the top and bottom graphs, respectively. Correlations from these graphs are statistically significant ( $p$  value < 0.05), but body mass alone do not allow to efficiently predict gestation and lactation lengths at the scale of nonvolant placentals or at a wider scale (weak  $R^2$ ).

d'allaitement d'une vingtaine de jours chacune (Jones et al., 2009). A l'opposé, le phoque à capuchon (*Cystophora cristata*) se reproduit en moyenne 1 fois tous les 2 ans avec des portées de 1 individu, une durée de gestation de 11 mois et seulement 4 jours de lactation, quatre jours qui sont pourtant cruciaux pour permettre aux juvéniles d'acquérir la couche de graisse nécessaire à leur survie dans les eaux froides de l'Arctique (Ofstedal et al., 1993 ; Ernest, 2003 ; Jones et al., 2009). On voit par ces deux exemples que non seulement la gamme de ces paramètres est très large, en partie du fait de la grande différence de masse corporelle qui sépare les deux espèces citées (voir corrélations en Figure I.1), mais que les rapports entre ces paramètres sont eux aussi très variables (e.g. temps de lactation très court chez le phoque par rapport au temps de gestation). La gamme de variabilité de ces paramètres est illustrée en Figure I.2.

Une part importante de cette diversité des stratégies de reproduction mammaliennes est portée par la division des mammifères en trois grands groupes évolutivement et biologiquement distincts que sont les placentaires (euthériens), les marsupiaux (métathériens) et les monotrèmes (protothériens). La nuance entre les termes de placentaires, marsupiaux et monotrèmes d'une part, et les termes d'euthériens, métathériens et protothériens d'autre part, tient dans l'inclusion chez ces derniers de plusieurs taxons supplémentaires à la base des lignées évolutives des placentaires, marsupiaux et monotrèmes (Weisbecker et Beck, 2015). Phylogénétiquement parlant, le terme d'euthérien englobe ainsi celui de placentaire, le terme de métathérien englobe celui de marsupial, et celui de protothérien celui de monotrème, tandis que les termes de placentaires, marsupiaux et monotrèmes sont des groupes-couronnes (i.e. ils englobent tous les représentants de ces groupes depuis les espèces actuelles jusqu'à l'ancêtre commun le plus récent liant ces espèces). Bien que l'étymologie derrière les termes de placentaires, marsupiaux et monotrèmes soit discutable (voir Weisbecker et Beck, 2015), ceux-ci demeurent opérationnels et largement utilisés au sein de la communauté scientifique. Les placentaires, marsupiaux et monotrèmes se distinguent par des traits biologiques et comportementaux liés à la reproduction assez différents (Kemp, 2005 ; Weisbecker et Beck, 2015 ; Zachos et al., 2018). Les placentaires constituent environ 95 % de la diversité des espèces de mammifères actuels (Roskov et al., 2019). L'espèce humaine et la plupart des animaux domestiques

(e.g. chien, chat, cheval, vache) font notamment partie de ce groupe. Le groupe des euthériens dont les placentaires font partie diverge de celui des métathériens durant le Jurassique (Luo et al., 2011 ; Halliday et al., 2019). Les premières espèces du groupe-couronne des placentaires apparaissent vraisemblablement durant le Crétacé et connaissent des événements importants de diversification entre la fin du Crétacé et le début du Paléogène, période d'origine de la plupart des ordres de placentaires actuels qui intervient après la crise Crétacé/Paléogène et l'extinction des dinosaures non-aviens (Luo et al., 2011 ; Meredith et al., 2011 ; Halliday et al., 2019). Les placentaires ont une répartition géographique mondiale et occupent une large gamme de niches écologiques, notamment



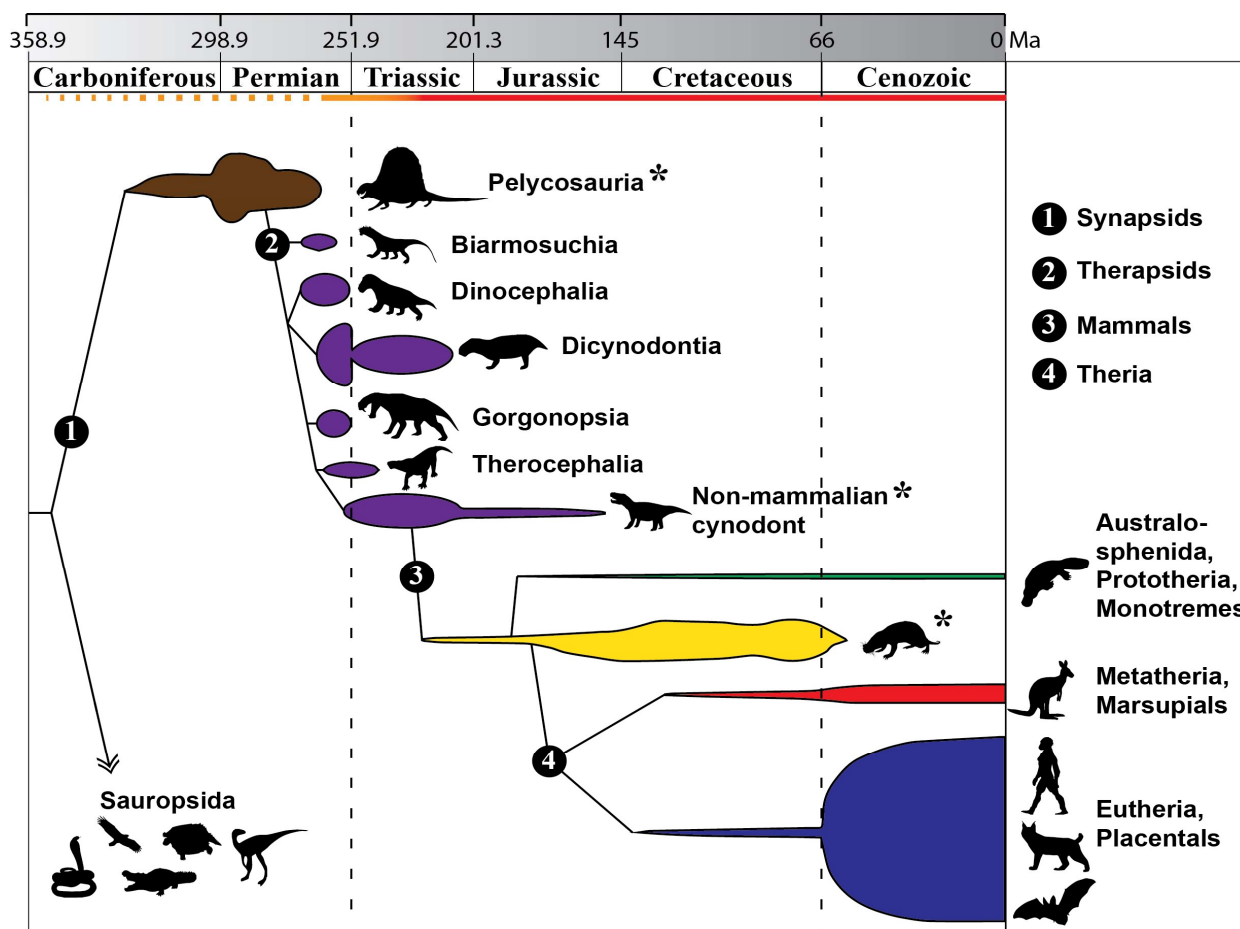
**Figure 1.2 – Variabilité des durées de gestation (abscisse), de lactation (ordonnée), d'intervalles entre naissances (couleur) et du nombre moyen d'individus par portée chez les mammifères actuels (taille des points).** Chaque point représente une espèce de mammifère actuelle dont les durées de gestation (incubation dans le cas des monotrèmes) et de lactation sont reportées dans la base de données PanTHERIA (Jones et al., 2009). Les points en gris représentent des espèces pour lesquelles l'intervalle entre naissances ou le nombre moyen d'individus par portée n'étaient pas reportés dans PanTHERIA. Le premier graphique (en haut à gauche) reporte les données de 990 espèces de mammifères actuels. Ces données sont subdivisées en 3 graphiques supplémentaires distinguant monotrèmes (3 espèces), marsupiaux (89 espèces) et placentaires (898 espèces). **Variability of gestation length (x axis), lactation length (y axis), interbirth interval (color) and litter size (point size) among modern mammals.** Each point represents a modern mammal species for which lactation and gestation lengths (or incubation lengths for monotremes) were recorded in the PanTHERIA database (Jones et al., 2009). Grey points represent species for which interbirth interval or litter size were not reported in PanTHERIA. The first graphic (top left) include the data of 990 modern mammal species. These data are divided in 3 additional graphics which distinguish monotremes (3 species), marsupials (89 species) and placentals (898 species).

aquatiques (e.g. siréniens, cétacés, pinnipèdes) et aériennes (e.g. chauve-souris) pour les plus dérivés. Ils se caractérisent par un mode de reproduction vivipare, ce qui signifie que les juvéniles initient leur développement au sein du corps de la mère et sans l'intermédiaire d'un œuf. Ce développement *in utero* est permis par le placenta, un organe permettant des échanges soutenus de dioxygène, de nutriments et d'autres molécules entre la mère et le juvénile (e.g. dioxyde de carbone, urée et autres déchets métaboliques). Le groupe tire d'ailleurs son nom de cet organe, bien que les mammifères non-placentaire et d'autres animaux tels que certains lézards et poissons possèdent des structures analogues (Weisbecker et Beck, 2015). Comparé aux autres mammifères, le temps de gestation long de certaines espèces (Figure I.2) et la présence du placenta permettent un développement avancé des juvéniles avant la naissance. Les juvéniles poursuivent ensuite un développement soutenu grâce à une période d'allaitement de durée variable (Figure I.2). Si les marsupiaux sont également vivipares, ils se distinguent des placentaires par des temps de gestation très courts au regard de leur taille adulte. On compte par exemple seulement 36 jours de gestation chez le kangourou géant (*Macropus giganteus*, Figure I.2). Les juvéniles marsupiaux naissent donc relativement immatures (on parle de larve marsupiale), et poursuivent leur développement en étant allaités par leur mère, le plus souvent au sein d'une poche ventrale appelé le marsupium (e.g. la poche des kangourous). Les marsupiaux représentent environ 5 % des espèces de mammifères actuels. Ils sont largement représentés dans les faunes australiennes, mais sont également présents dans les faunes des Amériques (Weisbecker et Beck, 2015). Leur registre fossile atteste cependant d'une diversité beaucoup plus large (Weisbecker et Beck, 2015 ; Eldridge et al., 2019). Le groupe des métathériens auquel les marsupiaux appartiennent est représenté dans le registre fossile dès le Crétacé inférieur, bien que la divergence entre métathériens et euthériens semble dater du Jurassique (Luo et al., 2011 ; Eldridge et al., 2019 ; Halliday et al., 2019). Comme pour les placentaires, on estime que le groupe-couronne des marsupiaux émerge durant la partie terminale du Crétacé et connaît un important épisode de diversification phylogénétique et morphologique au début du Paléogène, avec notamment des cas remarquables d'évolutions morphologiques convergentes entre placentaires et marsupiaux (Riggs, 1934 ; Kemp, 2005 ; Luo et al., 2011 ; Meredith et al., 2011 ; Weisbecker et Beck, 2015 ; Eldridge et al., 2019). Enfin,

le groupe des monotrèmes se distingue des deux groupes précédents par un mode de reproduction ovipare. Ces mammifères pondent des œufs puis allaitent leurs petits après l'éclosion, un mode de reproduction qui fût vraisemblablement la norme chez les premiers membres du groupe-couronne des mammifères actuels (Oftedal, 2002a). Leurs glandes mammaires se localisent au niveau d'une zone spécialisée de l'épiderme ventral des femelles. Le lait est sécrété à travers l'épiderme, notamment grâce à l'association de glandes mammaires et de poils spécialisés (Griffiths, 1978 ; Oftedal, 2002a). À cet égard, et contrairement aux marsupiaux et aux placentaires, les monotrèmes ne possèdent pas de mamelles. Actuellement, on ne compte dans l'ordre des monotrèmes que 5 espèces vivantes, réparties dans les familles des ornithorynques (*Ornithorynchus anatinus*) et des échidnés (*Tachyglossus aculeatus*, *Zaglossus bruijini*, *Zaglossus attenboroughi*, *Zaglossus bartoni*). Les monotrèmes actuels sont présents exclusivement en Océanie, bien que ce groupe fut jadis plus diversifié et étendu géographiquement (présence de protothériens fossiles à Madagascar et en Amérique du Sud notamment). Le registre fossile des protothériens, groupe auquel les monotrèmes sont apparentés, demeure assez lacunaire (Luo et al., 2001 ; Luo, 2007 ; Weisbecker et Beck, 2015). La théorie qui fait le plus consensus à ce jour suggère que ce groupe tire son origine de celui des australosphénidés, et que l'ancêtre commun le plus récent entre les monotrèmes et les thériens (i.e. le groupe phylogénétique incluant les placentaires et les marsupiaux) vivait au début du Jurassique (Luo et al., 2001 ; Luo, 2007 ; Weisbecker et Beck, 2015). Une représentation synthétique des connaissances actuelles sur l'histoire évolutive des mammifères et des groupes qui leur sont apparentés est proposée en figure I.3.

Malgré cette diversité des mammifères et de leurs modes de reproduction, la possession de glandes mammaires et le recours à l'allaitement pour appuyer le développement des juvéniles est un trait commun qui lie toutes les espèces de ce groupe. La composition et la quantité de lait produite pendant la lactation (i.e. la production du lait) varient beaucoup entre les espèces et peuvent même changer de manière importante au cours de la période d'allaitement d'un individu (Perrin, 1955 ; Arman et al., 1974 ; Nobrega et al., 1997 ; Oftedal, 2000 ; Gallego et al., 2006 ; Skibiél et al., 2013 ; Sharp et al., 2017). Toutefois, malgré un certain degré d'hétérogénéité génétique, les processus impliqués dans la

production du lait pour transférer lipides, sucres, aminoacides, phosphore (P) et calcium (Ca) aux juvéniles demeurent très similaires au sein des mammifères actuels (Oftedal, 2013, 2020). En effet, la



**Figure I.3 – Phylogénie et registre fossile des synapsides du Carbonifère à nos jours.** Cet arbre est une synthèse de ceux proposés par Benton, 2005 ; Kemp, 2005 ; Luo, 2007 ; Luo et al., 2011 ; Ruta et al., 2013 ; Weisbecker et Beck, 2015. L'âge des périodes géologiques est indiqué en millions d'années (Ma). Les connexions entre groupes matérialisent les relations phylogénétiques supposées. La taille des groupes (échelle verticale) représente leur diversité relative (estimation grossière). La racine de l'arbre (extrémité gauche de l'arbre) représente les premiers amniotes. Les groupes paraphylétiques sont marqués d'un astérisque. Code couleur des groupes : (marron) pélycosaures, (violet) thérapsides non-mammaliens, (jaune) mammifères à l'exclusion des australosphénidés et protothériens (vert) ainsi que des thériens, (rouge) métathériens, (bleu) euthériens. Le liseré accolé aux périodes de temps géologiques indique la probabilité que certains synapsides soit capable de pratiquer la lactation (rouge : certain, orange : possible). Le liseré en pointillés oranges symbolise l'existence supposée de formes de protolactation chez les synapsides telle que définie dans Oftedal 2002a et Oftedal 2020. Les lignes pointillées verticales marquent les crises Permo-Trias (gauche) et Crétacé-Paléogène (droite). **Phylogeny and fossil record of synapsids from Carboniferous to modern days.** This tree is a synthesis of those proposed by Benton, 2005 ; Kemp, 2005 ; Luo, 2007 ; Luo et al., 2011 ; Ruta et al., 2013 ; Weisbecker and Beck, 2015. The age of geologic periods is expressed in million years (Ma). Connections between groups represent postulated phylogenetic relationships, with group size (vertical scale) representing their relative diversity (rough estimation). The root of the tree (left extremity) represent early amniotes. Paraphyletic groups are marked with a star (\*). Group color code: (brown) pelycosaurs, (purple) non-mammalian therapsid, (yellow) mammals with the exclusion of australosphenidans and prototherians (green) as well as therians, (red) metatherians, (blue) eutherians. The color line below geologic periods represent the probability that synapsids were able to practice lactation (red: certain, orange: possible). The dashed orange line represent the supposed existence of protolactation forms, such as defined in Oftedal 2002a, and Oftedal 2020. Dashed vertical lines mark the Permo-Triassic (left) and Cretaceous-Paleogene (right) extinction events.

majorité des lipides du lait est encapsulée au sein de structures membranaires caractéristiques connues sous le terme de MFG (pour Milk Fat Globule) et que l'on retrouve dans le lait de l'ensemble des mammifères (Mather, 2011 ; Oftedal, 2020). Par ailleurs, lorsque le lait contient des sucres, il s'agit généralement de galactose et de glucose formant des oligosaccharides (monotrèmes, marsupiaux, placentaires caniformes) ou du lactose (majorité des placentaires), des sucres que l'on ne retrouve nulle part ailleurs dans la nature (Urashima et al., 2012, 2014 ; Oftedal, 2020). Enfin, le transport par le lait des aminoacides, du Ca et du P est principalement assuré par les  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ -, et  $\kappa$ -caséines, quatre familles de protéines au rôle essentiel et que l'on retrouve dans le lait de tous les mammifères (Kawasaki et al., 2011 ; Oftedal, 2020). Ces protéines caractéristiques du lait permettent la formation de micelles (des ensembles moléculaires sphériques) qui rendent possible le transport du Ca et du P en grande concentration dans le lait, un facteur crucial pour faciliter l'absorption de ces éléments par les juvéniles en quantité importante et assurer leur développement. C'est l'ensemble de ces caractéristiques qui fait du lait des mammifères une biosécrétion aux fonctions et à la composition uniques dans le monde animal.

## 2. L'origine évolutive des mammifères

La lactation étant un élément central du développement de tous les mammifères actuels, son origine évolutive s'est imposée comme une question centrale de biologie et de paléontologie dès l'aube de la théorie de l'évolution. Charles Darwin lui-même, ainsi que bien d'autres après lui, théorisèrent sur le sujet (Oftedal, 2002a, b, 2013, 2020 ; Rijnkels, 2002 ; Kawasaki et Weiss, 2003 ; Rijnkels et al., 2003 ; Darwin, 2004 ; Lefèvre et al., 2010 ; Zhou et al., 2021). Pour identifier comment et quand ce trait est apparu au cours de l'évolution, il est nécessaire de comprendre le contexte environnemental et biologique de cette innovation. Pour ce faire, un bref résumé des connaissances actuelles sur l'évolution des mammifères et de leurs proches parents s'impose.

Les mammifères sont l'une des classes d'animaux vertébrés tétrapodes actuels, à l'instar des oiseaux par exemple. À ce titre, ils possèdent un squelette osseux incluant 4 membres, un trait que certains tétrapodes ont perdu secondairement au cours de l'évolution (e.g. le cas des serpents). Les

mammifères font également partie du clade des amniotes (clade : ensemble d'espèces partageant un ancêtre commun et qui inclut tous les descendants de cet ancêtre), le groupe des vertébrés dont les embryons sont protégés par un sac amniotique permettant la survie des œufs en dehors du milieu aquatique (Benton, 2005 ; Kemp, 2005 ; Zachos et al., 2018). Il y a un peu plus de 300 Ma, au Carbonifère, un nouveau clade d'amniotes fait son apparition : celui des synapsides (Benton, 2005 ; Kemp, 2005 ; Zachos et al., 2018, voir Figure I.3). Ces derniers se distinguent du clade des reptiles (tel que définie par Modesto et Anderson, 2004), le clade qui inclut notamment les tortues, les lézards, les crocodiles et les dinosaures (dont les oiseaux). Les premiers synapsides présentent un certain nombre de caractères dit « reptiliens » (e.g. posture non érigée), et possèdent une fosse temporale unique de chaque côté du crâne (Benton, 2005 ; Kemp, 2005 ; Zachos et al., 2018). Les synapsides vont connaître plusieurs phases de diversification importante au cours de leur histoire. Le premier groupe remarquable est celui des pélycosaures (Figure I.3), un groupe qualifié de paraphylétique ou de grade (i.e. qui exclut une partie des descendants de l'ancêtre commun de ce groupe). L'animal le plus emblématique de ce groupe est sans doute *Dimetrodon*, un large prédateur doté d'une voile dorsale caractéristique et pouvant dépasser les 4 mètres de long (Romer et al., 1940 ; Huttenlocker et al., 2010). Le genre *Dimetrodon* demeure toutefois assez peu représentatif de la diversité des pélycosaures. En effet, ces animaux ont développé une variété remarquable de morphologies au cours de leur histoire, leur permettant ainsi d'occuper un large panel de niches écologiques (e.g. grands prédateurs, herbivores, insectivores : Kemp, 2005 ; Zachos et al., 2018). Les pélycosaures vont prospérer pendant le Carbonifère et le Permien, mais disparaissent durant cette dernière période après l'avènement des premiers thérapside (Kemp, 2005 ; Modesto et al., 2011 ; Zachos et al., 2018 ; voir Figure I.3).

Les thérapside sont un clade de synapsides évolutivement proche de certains pélycosaures (les sphénacodontidés). Ils apparaissent au Permien et se diversifient pendant la seconde moitié de cette période (Rubidge et Sidor, 2001 ; Ivakhnenko, 2003 ; Kemp, 2005 ; Zachos et al., 2018). Les thérapside du Permien sont des animaux aux écologies très variées qui comptent parmi eux des apex prédateurs, des herbivores spécialisés, des petits insectivores ou encore des animaux au mode de vie semi-



aquatique (Kemp, 1980, 2005 ; Kammerer, 2016 ; Zachos et al., 2018 ; Whitney et Sidor, 2019). La crise biologique majeure qui intervient à la fin du Permien il y a un peu plus de 251 Ma va toutefois profondément affecter les faunes de cette époque. À cette période, on enregistre la disparition de plus de 90 % des espèces vivantes, soit la plus grande crise biologique du Phanérozoïque dont on ait la trace (Chen et Benton, 2012). Les causes de cet évènement sont encore débattues (e.g. volcanisme intense enregistré en Sibérie, relargage d'hydrates de méthane gelés au fond des océans, production de méthane thermogénique ou combustion de charbon), mais les conséquences semblent avoir été une augmentation du CO<sub>2</sub> atmosphérique, une augmentation de la température globale, ainsi qu'une acidification et une anoxie généralisées des océans (Grice et al., 2005 ; Saunders et Reichow, 2009 ; Svensen et al., 2009 ; Korte et Kozur, 2010 ; Payne et al., 2010 ; Grasby et al., 2011 ; Sobolev et al., 2011 ; Chen et al., 2013). La résolution limitée des dépôts sédimentaires de l'époque et certaines lacunes dans l'enregistrement sédimentaire entretiennent les débats sur la temporalité de cette crise. Combien d'évènements ont eu lieu, quelle a été la rapidité des changements environnementaux et comment les faunes et les flores de l'époque ont-elles été affectées par la crise, sont autant de questions qui restent ouvertes (Lucas, 2017). Les trois groupes de thérapside ayant survécu à la crise sont les therocéphaliens, les dicynodontes et les cynodontes (Kemp, 2005 ; Lucas, 2017 ; Zachos et al., 2018 ; voir Figure I.3). Les therocéphaliens sont le groupe qui s'éteindra le plus vite après l'évènement, aux environs du début du Trias (Abdala et al., 2008). Les dicynodontes connaîtront quant à eux une diversification importante au cours du Trias après la baisse de diversité notable enregistrée à la fin du Permien. Ils s'éteindront toutefois vraisemblablement avant la fin du Trias (Figure I.3), à l'exception incertaine d'une lignée ayant potentiellement survécu jusqu'au Crétacé sur le continent australien (Thulborn et Turner, 2003 ; Rozefelds et al., 2011 ; Knutsen et Oerlemans, 2020). Parmi ces trois groupes de thérapside, seuls les cynodontes sont parvenus à maintenir une diversité importante au-delà de la fin du Trias (Rubidge et Sidor, 2001 ; Kemp, 2005 ; Ruta et al., 2013 ; Zachos et al., 2018). En tant que clade, le groupe des cynodontes inclut celui des mammifères (Figure I.3). Pour distinguer les mammifères des autres cynodontes on utilise généralement le terme de cynodontes non-mammaliens. Avant même l'apparition des premiers mammifères au sens strict, certains cynodontes

possédaient déjà un certain nombre de caractères semblables à ceux des mammifères (e.g. denture différenciée, posture érigée, endothermie), acquis au cours de l'évolution de leur clade ou plus antérieurement au cours de l'évolution des synapsides (Kemp, 2005 ; Ruta et al., 2013 ; Rey et al., 2017 ; Zachos et al., 2018). Entre autres caractéristiques morphologiques, les cynodontes non-mammaliens possédaient un palais secondaire ossifié (partiellement chez les cynodontes primitifs puis complètement chez les groupes plus dérivés), une colonne vertébrale différenciée en une région lombaire et thoracique, et une articulation de la mâchoire inférieure composée du carré et l'articulaire (comme les autres thérapsides non-mammaliens) mais présentant une taille réduite par rapport aux autres thérapsides (Kemp, 2005 ; Zachos et al., 2018). Les cynodontes du Permien-Trias occupaient vraisemblablement un panel de niches écologiques assez diversifiées avec des régimes alimentaires d'herbivores, de petits carnivores, ou d'insectivores (Kemp, 2005 ; Zachos et al., 2018). Par ailleurs, des preuves paléontologiques, sous la forme d'agrégations de fossiles conspécifiques d'âges différents, suggèrent que certains cynodontes (e.g. *Thrinaxodon*, *Galesaurus*) avaient développés un certain degré de soin parental (Kemp, 2005 ; Jasinowski et Abdala, 2017 ; Zachos et al., 2018). Enfin, il est également suggéré que certaines espèces de ce groupe adoptaient un mode de vie d'animal fouisseur (notamment *Thrinaxodon* et *Galesaurus* : Jasinowski et Abdala, 2017). Curieusement, les cynodontes partagent cette caractéristique avec d'autres groupes de thérapsides ayant survécu au-delà de la crise Permo-Trias (e.g. *Lystrosaurus*, *Diictodon* : Damiani et al., 2003 ; Kemp, 2005 ; Modesto et Botha-Brink, 2010 ; Zachos et al., 2018 ; Smith et al., 2021), un facteur qui pourrait donc avoir eu un rôle décisif dans leur survie lors de cette période au même titre que l'endothermie et les stratégie de soin parental (Jasinowski et Abdala, 2017 ; Rey et al., 2017 ; Smith et al., 2021). On ne retrouve plus de cynodontes non-mammaliens après la fin du Jurassique, les mammifères constituant depuis les seuls représentants des thérapsides et synapsides encore vivants (Benton, 2005 ; Kemp, 2005 ; Ruta et al., 2013 ; Zachos et al., 2018).

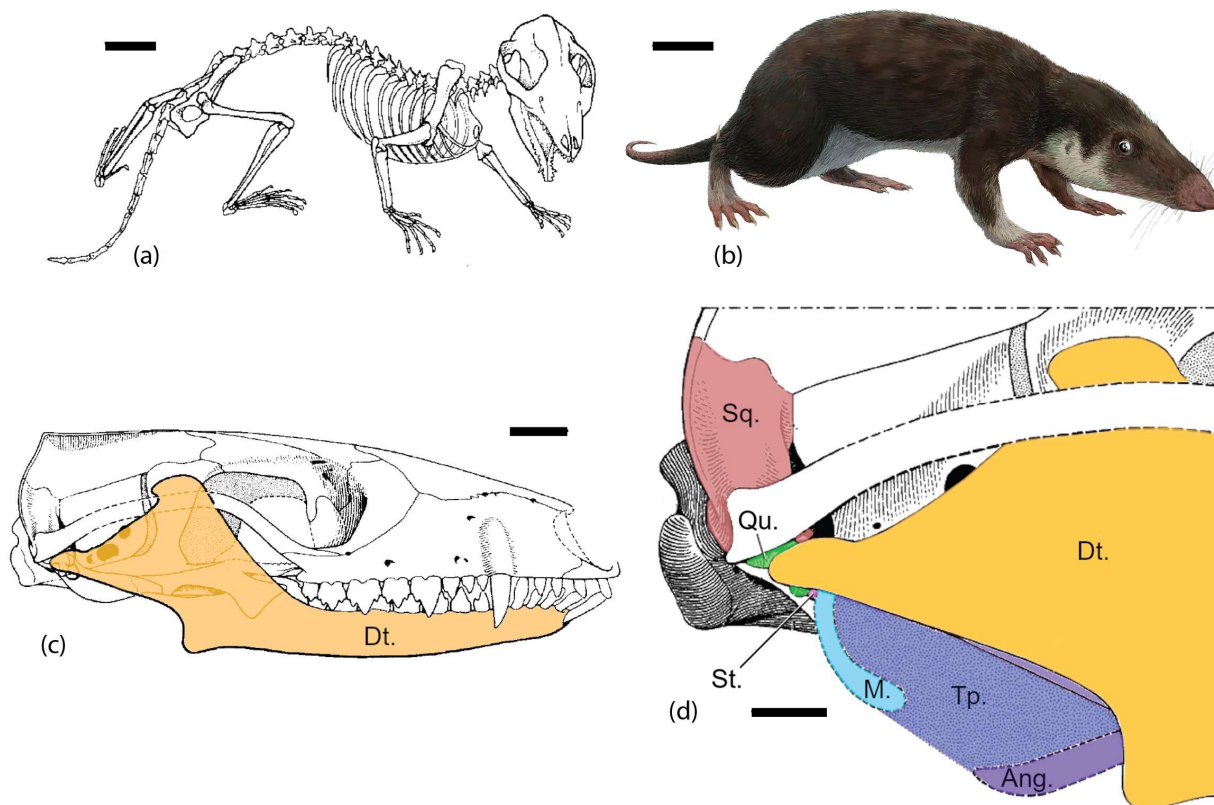
### 3. Premiers mammifères et diversifications du groupe

La communauté scientifique s'accorde à dire que les premiers fossiles de Mammalia *stricto sensu* apparaissent entre la fin du Trias et le début du Jurassique (Figure I.3). Placer une limite précise est

toutefois sujet à débat car certains cynodontes non-mammaliens partagent beaucoup de caractères morphologiques dérivés avec les mammifères (Kemp, 2005 ; Zacos et al., 2018). La limite entre cynodontes non-mammaliens et mammifères *stricto sensu* est donc en partie arbitraire car dépendante des caractères choisis pour définir le clade des mammifères (e.g. denture, mâchoire), ainsi que de la définition que l'on veut donner à ce terme (i.e. groupe-couronne ou clade plus étendu : Kemp, 2005 ; Zacos et al., 2018). Le terme de mammaliaforme est souvent utilisé pour regrouper les espèces les plus proches des mammifères, mais possédant certains caractères primitifs non-mammaliens (e.g. mandibule articulée au crâne par l'intermédiaire des os articulaires et carrés). Ayant vécu entre la fin du Trias et le tout début du Jurassique, le genre *Morganucodon* est assez typique de ces animaux classés en tant que mammifères ou en tant que mammaliaformes selon les écoles. La grande quantité de fossiles de *Morganucodon* ayant été mis au jour a permis une description extrêmement détaillée de ce genre (Kemp, 2005 ; Zacos et al., 2018). Il constitue par conséquent un point de départ de choix pour décrire la biologie générale des animaux à la base de l'arbre des mammifères.

Le genre *Morganucodon* inclut des espèces de petite taille (environ 10 cm du museau à la base de la queue), avec une apparence superficiellement semblable aux musaraignes actuelles (Figure I.4). Chez *Morganucodon*, l'os dentaire constitue l'essentiel de la mâchoire inférieure et s'articule directement avec l'os squamosal (condition typiquement mammalienne) tout en conservant l'articulation entre le carré et l'articulaire (à la manière des reptiles modernes et des thérapside plus basaux ; voir Figure I.4). Plus tard au cours de l'évolution des mammifères, ce complexe formé des os angulaire, articulaire, du carré et de l'étrier va migrer et s'isoler de la mâchoire. Ils formeront l'oreille moyenne des mammifères modernes (à ce stade les os articulaire et carré sont généralement nommés marteau et enclume), améliorant au passage la perception des sons, notamment dans les aigus (Allin, 1975 ; Luo et Crompton, 1994 ; Luo et al., 1995 ; Kemp, 2005). Encore au niveau de la mâchoire, on constate que la structure de cette dernière et du crâne permettent une occlusion concentrée sur un côté de la mâchoire, augmentant ainsi la force d'occlusion maximale. Cette capacité est convergente avec certains cynodontes non-mammaliens, mais tous les mammifères plus dérivés que *Morganucodon*

possèdent cette capacité (l'espèce humaine notamment) ou descendent de mammifères qui la possédaient (Kemp, 2005). La denture de *Morganucodon* est différenciée en canines, incisives et molariformes (dents prémolaires et molaires), ce qui est typique des mammifères et de certains cynodontes non-mammaliens (voir Figure I.4, Kermack et al., 1981 ; Kemp, 2005). Le nombre de



**Figure I.4 – Anatomie générale des Morganucodontidés.** (a) Squelette et posture générale de *Megazostrodon* (un genre proche de *Morganucodon*, Jenkins et Parrington, 1976), barre d'échelle 10 mm ; (b) Reconstitution de *Morganucodon*, barre d'échelle 10 mm, (artiste : [Michel B. H./Funkmonk](#)) ; (c) Reconstitution du crâne et de la mâchoire inférieure de *Morganucodon* en vue latérale, l'os dentaire est représenté en orange (Dt.), barre d'échelle 2 mm (modifié d'après Kermack et al., 1981) ; (d) Zoom sur l'articulation entre le crâne et la mâchoire inférieure de *Morganucodon*, hybride de l'articulation mammalienne entre os dentaire et squamosal (dentaire : Dt., orange ; squamosal : Sq., rouge) et de l'articulation « reptilienne » entre os articulaire (i.e. malleus) et carré (articulaire/malleus : M., cyan ; carré : Qu., vert). Plus tard, l'articulaire, le carré, l'angulaire (Ang., violet), et l'étrier (St., rose) formeront l'oreille moyenne des mammifères (position supposée du tympan : Tp., bleu), (Allin, 1975 ; image modifiée d'après Kermack et al., 1981) ; documentation supplémentaire : (Benton, 2005 ; Kemp, 2005). **General anatomy of Morganucodontia.** (a) Skeleton and general posture of *Megazostrodon* (a close relative of *Morganucodon*, Jenkins and Parrington, 1976), scale bar 10 mm ; (b) Reconstruction of *Morganucodon*, scale bar 10 mm, (artist: [Michel B. H./Funkmonk](#)) ; (c) Reconstruction of skull and lower jaw of *Morganucodon* in lateral view, the dentary bone is highlighted in orange (Dt.), scale bar 2 mm (modified from Kermack et al., 1981) ; (d) Focus on the skull and lower jaw joint of *Morganucodon*, hybrid between the typically mammalian dentary and squamosal bone joint (dentary: Dt., orange ; squamosal: Sq., red) and the "reptilian" joint between articular (i.e. malleus) and quadrate bones (articular/malleus: M., cyan ; quadrate: Qu., green). Later, the articular, quadrate, angular (Ang., purple), and stapes (St., pink) will constitute the middle ear of mammals (supposed eardrum position: Tp., blue), (Allin, 1975 ; picture modified from Kermack et al., 1981) ; additional documentation : (Benton, 2005 ; Kemp, 2005).

renouvellements dentaires est réduit chez *Morganucodon* (Crompton et Luo, 1993) et tend vers le mode de renouvellement diphyodonte que l'on retrouve chez la plupart des mammifères (i.e. remplacement unique de la denture, matérialisé par la perte des dents de lait au profit des dents définitives). Ce mode de renouvellement se distingue du renouvellement polyphyodonte (i.e. nombreux renouvellements dentaires) qui constitue la condition primitive des thérapside. Un grand nombre de fossiles de *Morganucodon* morts à des stades de croissance différents ont été décrit, ce qui a permis d'identifier chez ce groupe un développement corporel dit « déterminé » (Parrington, 1971 ; Kemp, 2005 ; O'Meara et Asher, 2016). Ce développement « déterminé » se définit par une croissance juvénile rapide suivie d'un arrêt de la croissance au stade adulte (i.e. les adultes ne grandissent plus et tous ont une taille similaire). A l'inverse, les animaux au développement « indéterminé » (e.g. les thérapside basaux et reptiles actuels) se développent en général plus lentement aux stades juvéniles et sans limite stricte (i.e. pas d'arrêt de croissance au stade adulte ; O'Meara et Asher, 2016). Les *Morganucodon* adoptaient une posture érigée sur leurs membres antérieurs et postérieurs (Figure I.4), ces derniers fournissant l'essentiel de la propulsion lors de la locomotion (Jenkins et Parrington, 1976 ; Kemp, 2005). Ce mode de locomotion, que l'on retrouve chez les mammifères actuels, dérive vraisemblablement d'une évolution complexe de la morphologie du squelette axial et appendiculaire des synapsides, et se distingue du mode de locomotion que l'on peut observer chez les reptiles et salamandres actuels basé sur des ondulations latérales du corps (Jones et al., 2021). Si les deux modes de locomotion se valent en terme de vitesse maximale de course, le mode de locomotion mammalien permet un meilleur maintien de la respiration pendant la course (i.e. diminution des contraintes sur les poumons générées par les ondulations latérales) et donc une meilleure endurance (Bakker et Galton, 1974 ; Carrier, 1987 ; Kemp, 2005). Les côtes lombaires de *Morganucodon* sont réduites et la transition abrupte avec les côtés du thorax suggère la présence d'un diaphragme. Cette observation ainsi que la posture érigée, la présence d'un palais secondaire et les indices de présence d'un maxillo-turbinal non ossifié (structure limitant les pertes de chaleur et d'humidité lors de la respiration) sont des arguments suggérant une respiration soutenue et un métabolisme élevé (Hillenius et Ruben, 2004 ; Kemp, 2005). Les capacités avancées de mastication et de traitement de la nourriture (e.g. denture

différenciée, occlusion dentaire ciblée) vont aussi dans ce sens. Cette question du métabolisme est par ailleurs liée à la question de l'acquisition de l'endothermie (i.e. capacité à produire de la chaleur interne en quantité importante), elle-même liée à l'acquisition de l'homéothermie (i.e. capacité à maintenir une température corporelle stable), deux caractères au cœur de la biologie des mammifères. La question de l'endothermie est une question très débattue dans la lignée des synapsides car les éléments permettant d'attester qu'une espèce fossile était endotherme sont rares et indirects. Les arguments anatomiques en faveur d'un métabolisme élevé (e.g. capacités de respiration et de nutrition avancées) sont souvent utilisés pour supposer des capacités d'endothermie (Hillenius et Ruben, 2004 ; Kemp, 2005). Certaines études font également le lien entre le développement d'un cerveau plus large et complexe et l'acquisition d'une endothermie et homéothermie avancées chez certains thérapside et mammifères (Kemp, 1979, 2005 ; Benoit et al., 2017), l'un des arguments étant que le fonctionnement du cerveau relativement large des mammifères actuels est dépendant d'un maintien fin de la température corporelle. Conjointement, les observations suggérant la présence de fourrure chez certains cynodontes et mammaliaformes soutiennent aussi l'acquisition d'un certain degré d'endothermie et d'homéothermie. La capacité à produire de la chaleur interne est en effet une condition indispensable à la survie d'un animal possédant une fourrure (ajouter une couche d'isolant thermique sur un animal au sang-froid mène généralement à l'hypothermie). La présence de poils est difficile à identifier en tant que telle car, à l'exception de certains contextes de préservation exceptionnelles (e.g. Rougier et al., 2010), les poils sont rarement préservés lors de la fossilisation. Cependant, les indices de présence de vibrisses (i.e. poils sensoriels ; voir Benoit et al., 2016) et la possession des briques génétiques nécessaires à la formation des poils (Eckhart et al., 2008) suggèrent la présence de poils chez *Morganucodon* et d'autres thérapside. Un nouvel argument, d'ordre géochimique cette fois, est récemment venu étayer notre compréhension de l'origine de l'endothermie (Rey et al., 2017). En utilisant la composition isotopique de l'oxygène des phosphates de l'apatite de l'os et de l'émail dentaire comme traceur de la température corporelle, les auteurs suggèrent que les cynodontes du début du Trias étaient déjà endothermes avant les premiers mammifères, de même que certains dicynodontes de la même époque. Cependant, une nouvelle

étude basée cette fois sur des critères d'histologie a récemment proposé que les premiers mammaliaformes (dont *Morganucodon*) ne possédaient pas un métabolisme élevé, et que l'histoire évolutive de l'endothermie chez les cynodontes et les premiers mammaliaformes était sans doute le résultat d'une mosaïque évolutive complexe (Newham et al., 2020). Bien que de nouvelles méthodes permettent d'apporter de plus en plus d'éléments de discussion sur cette question, il semble donc être encore trop tôt pour qu'un consensus émerge concernant l'évolution de l'endothermie chez ces groupes.

Une des dernières questions centrales sur la biologie de *Morganucodon* est celle de la lactation. L'anatomie des fossiles fournit malheureusement très peu de preuves directes pour juger de la capacité d'un animal à produire du lait. La cause de ce problème majeur est simple : le siège de la lactation se trouve dans les glandes mammaires, un organe qui a une probabilité extrêmement faible d'être préservé lors de la fossilisation car rapidement dégradé à la mort de l'animal (au même titre que la plupart des tissus mous). Plusieurs éléments indirects suggèrent néanmoins que *Morganucodon* pouvait allaiter ses petits. La croissance rapide et « déterminée » des *Morganucodon* implique que les jeunes *Morganucodon* devaient être efficacement nourris par leurs parents, particulièrement si on considère que ces animaux avaient un métabolisme élevé (Pond, 1977 ; Kemp, 2005 ; O'Meara et Asher, 2016 ; Rey et al., 2017). La lactation est un candidat idéal pour expliquer cette observation, même si un transfert de nourriture ordinaire par les parents reste techniquement envisageable à cette étape du raisonnement (à l'image de certains oiseaux par exemple). Un des arguments allant dans le sens de la lactation est que les juvéniles *Morganucodon* sont de très petite taille et ne possèdent pas tout de suite de denture pleinement fonctionnelle. Ceci limite donc les possibilités de nutrition en dehors du recours à l'allaitement (Pond, 1977 ; Kemp, 2005). Une autre série d'arguments provient de la présence supposée de poils à la surface de la peau des *Morganucodon* et de certains thérapsides plus basaux. En effet, les glandes mammaires ont primitivement été associées aux poils lors de leur évolution (condition visible chez les monotrèmes actuels et au cours du développement des glandes mammaires marsupiales ; voir Oftedal, 2002a et Oftedal, 2020), suggérant donc que la lactation est apparue chez des animaux possédant des poils. La présence de poils chez *Morganucodon* et d'autres

thérapsides est soutenue par les indices de présence de vibrisses (Benoit et al., 2016), par des indices génétiques (Eckhart et al., 2008) et par le faisceau d'indices indépendants suggérant l'endothermie de ces animaux (Kemp, 1979 ; Hillenius et Ruben, 2004 ; Kemp, 2005 ; Benoit et al., 2016, 2017 ; Rey et al., 2017). Ceci constitue donc un indice supplémentaire que ces animaux avaient pu développer une forme de lactation. Considérées dans leur ensemble, ces observations suggèrent donc de manière assez robuste que *Morganucodon* avait recours à la lactation. Au-delà du cas de *Morganucodon*, les similitudes physiologiques et génétiques de la lactation chez les mammifères actuels suggèrent d'ailleurs que la lactation est apparue avant les divergences entre les clades de mammifères actuels, voire même avant l'apparition des mammifères, chez les thérapsides non-mammaliens (voir section suivante ; Oftedal, 2002a et Oftedal, 2020).

Cette mosaïque de caractères dresse un tableau plutôt complet de *Morganucodon*. Si certains caractères évolueront encore vers des conditions « plus mammaliennes » au cours du Mésozoïque (e.g. articulation crâne/mandibule et oreille moyenne), ce petit insectivore (d'après sa denture et sa taille) au mode de vie supposément nocturne est assez représentatif de ce que seront une bonne partie des premiers mammifères du Mésozoïque (Kemp, 2005). La tendance généralisée des petites tailles corporelles chez les mammifères du Mésozoïque est souvent interprétée comme la conséquence de la domination des dinosaures dans les niches écologiques impliquant de grandes tailles, de contraintes environnementales (i.e. contraintes liées à l'écologie des insectivores nocturne) ou de contraintes développementales (Kemp, 2005 ; Codron et al., 2012). Toutefois, les dernières décennies ont été riches en découvertes de fossiles de mammifères mésozoïques, découvertes qui ont su révéler une diversité jusqu'alors insoupçonnée chez ces animaux (Luo, 2007 ; Luo et al., 2011). Ainsi, en plus des petits mammifères insectivores de la taille d'une souris, certains mammifères de cette ère pouvaient atteindre la taille d'un chien et se nourrissaient de petits dinosaures (Hu et al., 2005 ; Luo, 2007). D'autres encore adoptaient vraisemblablement un mode de vie semi-aquatique ou d'arboricole planeur (Luo, 2007). Cette impressionnante diversité s'est sans aucun doute accompagnée d'une variété de stratégies de reproductions et de pratiques d'allaitement associées, avec des combinaisons



de traits d'histoire de vie sans équivalents actuels qu'il serait particulièrement intéressant de documenter (Hoffman et Rowe, 2018).

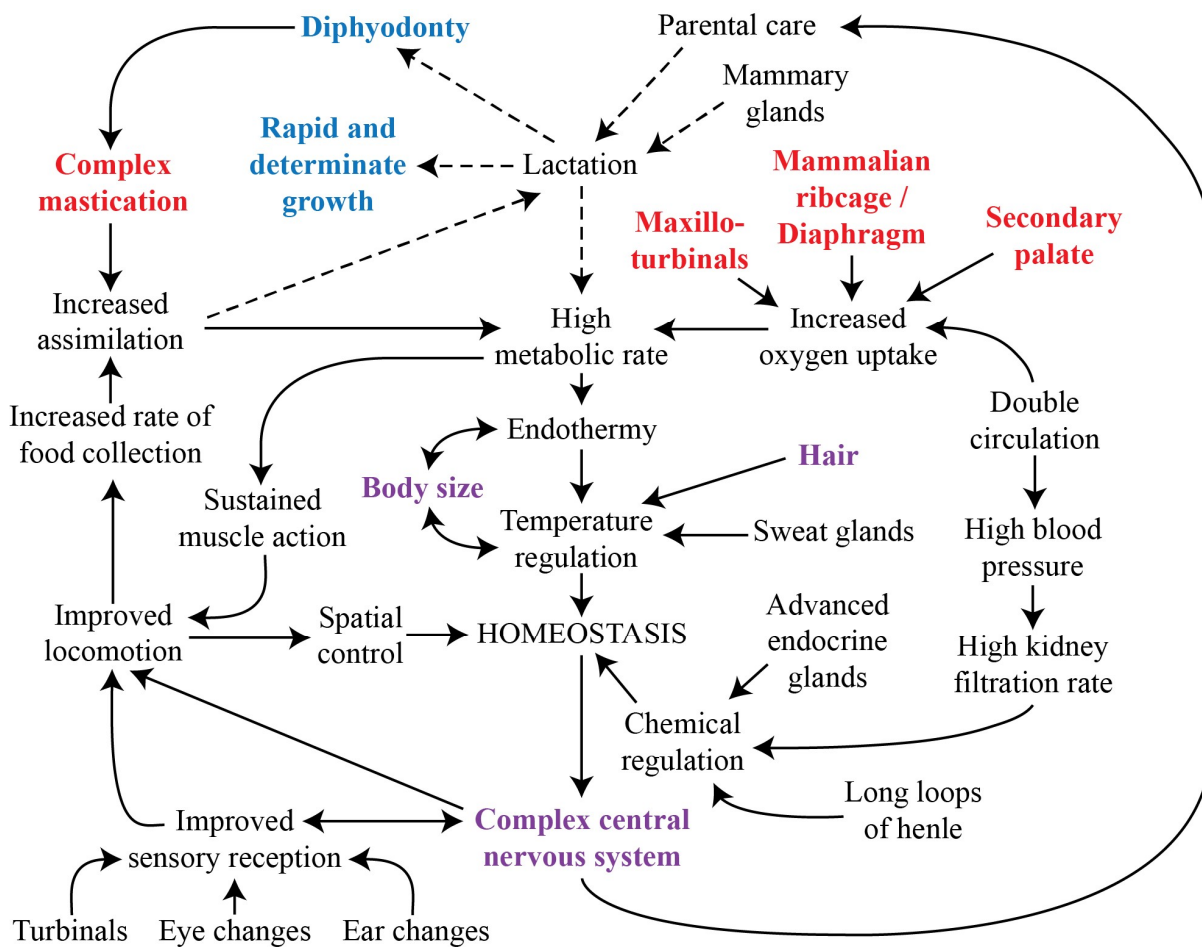
Le Mésozoïque est aussi le berceau des lignées des protothériens, métathériens et euthériens (i.e. clades élargis des monotrèmes, marsupiaux et placentaires : Kemp, 2005 ; Luo, 2007 ; Luo et al., 2011 ; Zachos et al., 2018 ; Halliday et al., 2019). Les données moléculaires (génétiques) et fossiles sont désormais assez unanimes sur le fait que les monotrèmes sont phylogénétiquement plus éloignés des marsupiaux et placentaires que ces derniers ne le sont entre eux (voir figure I.3, Springer et al., 2003 ; Bininda-Emonds et al., 2007 ; Luo, 2007 ; Luo et al., 2011 ; Weisbecker et Beck, 2015 ; Eldridge et al., 2019 ; Halliday et al., 2019). On regroupe ainsi le clade des marsupiaux et placentaires (métathériens et euthériens) au sein du clade des thériens (Figure I.3). Les origines évolutives des monotrèmes (protothériens) ont longtemps été une source importante de débats, en grande partie du fait d'un registre fossile très limité. Actuellement, le courant de pensée dominant sur le sujet postule que les monotrèmes dérivent du groupe des australosphénidés (Luo et al., 2001, 2011 ; Luo, 2007 ; Weisbecker et Beck, 2015). Les données moléculaires (basées sur l'ADN des espèces modernes) et morphologiques (basées sur les espèces actuelles et fossiles) sont en partie contradictoires, les premières suggérant généralement des dates plus précoces d'apparition des placentaires, marsupiaux et monotrèmes durant le Mésozoïque (Springer et al., 2003 ; Bininda-Emonds et al., 2007 ; Wible et al., 2007 ; Halliday et al., 2019). Cependant, les récentes découvertes de fossiles de mammifères mésozoïques et le développement de méthodes associant données fossiles et moléculaires tendent à gommer une partie de ces différences (Asher et al., 2004 ; Luo, 2007 ; Luo et al., 2011 ; Weisbecker et Beck, 2015 ; Beck et Baillie, 2018 ; Halliday et al., 2019). Considérées ensemble, les données moléculaires (Murphy et al., 2001 ; Springer et al., 2003 ; Nilsson et al., 2004 ; Bininda-Emonds et al., 2007 ; Hallström et Janke, 2010 ; Halliday et al., 2019) et morphologiques (Rougier et al., 1998 ; Luo et al., 2003, 2011 ; Asher et al., 2004, 2005 ; Luo et Wible, 2005 ; Luo, 2007 ; Wible et al., 2007 ; Weisbecker et Beck, 2015 ; Eldridge et al., 2019) suggèrent que les australosphénidés et thériens ont évolués distinctement des autres lignées de mammifères à partir du Jurassique (Figure I.3). Les métathériens et les euthériens se seraient quant à eux séparés entre la fin du Jurassique et le début du Crétacé (Figure I.3).

À la fin du Crétacé, l'action combinée d'un impact météoritique géant au Yucatan (Chicxulub) et d'un volcanisme intense dont les coulées de lave sont encore visibles en Inde (Trapps du Deccan), va causer une nouvelle extinction de masse au cours de laquelle on estime qu'environ 50 % des familles d'amniotes disparaîtront (Benton, 2005 ; Kemp, 2005). Cette crise du Crétacé-Paléogène (K/Pg) va durablement affecter la biodiversité terrestre en entraînant notamment la disparition des dinosaures non-aviens, des ptérosaures et de plusieurs groupes de reptiles marins (e.g. plésiosaures). Les mammifères ont vraisemblablement été moins affectés et comptent dans leurs rangs plusieurs groupes de survivants parmi lesquels des placentaires, des marsupiaux et des monotrèmes (environ 23 % d'extinction des familles de mammifères à la crise K/Pg ; Benton, 2005). La grande variété des niches écologiques vacantes au sortir de la crise K/Pg a sans doute contribué à la diversification intense des mammifères à cette époque (Wing et al., 1995 ; Alroy, 1999 ; Springer et al., 2003 ; Benton, 2005 ; Kemp, 2005 ; Meredith et al., 2011), diversification particulièrement marquée pour les placentaires (Figure I.3). Cette diversification majeure des mammifères durant le Cénozoïque a en grande partie façonné la diversité morphologique, écologique et l'abondance des mammifères dans les faunes actuelles.

#### 4. Origine anatomique, génétique et fonctionnelle de la lactation

Comme précédemment évoqué, le déroulement de la fossilisation implique des probabilités extrêmement faibles de préserver des glandes mammaires ou tout autre type de tissus mous dans le registre fossile. Les informations que l'on peut avoir sur la capacité des espèces fossiles à produire du lait s'en trouvent très réduites et sont en général obtenues de manière indirectes. Ainsi, s'il est largement accepté que les premiers mammifères étaient capables de produire du lait (voir section précédente), il reste en revanche un certain degré d'incertitude concernant l'époque et le groupe de thérapside chez qui ce trait est apparu pour la première fois (Figure I.3). Ceci pose un problème majeur dans la compréhension de l'évolution des thérapsides si l'on considère le rôle vraisemblablement central de la lactation dans la biologie, le développement et l'écologie de ces animaux (Pond, 1977 ; Kemp, 2005 ; Oftedal, 2020). En effet, être capable de subvenir aux besoins des juvéniles par l'allaitement implique de mobiliser des quantités importantes de nutriments et minéraux chez l'adulte

(e.g. calcium, phosphore), conditionne le développement des juvéniles en permettant une croissance rapide malgré de forts besoins métaboliques et peu d'autonomie (réduisant ainsi la fenêtre de vulnérabilité maximale face aux prédateurs), et permet d'accompagner les juvéniles directement vers la niche écologique des adultes avec peu ou pas de niches intermédiaires (Kemp, 2005 ; Codron et al., 2012 ; Zachos et al., 2018). Tout ceci constitue une mosaïque complexe de comportements et de contraintes physio-écologiques qui ont pu jouer un rôle déterminant dans l'évolution des thérapsides



**Figure 1.5 – Synthèse qualitative des liens entre processus, paramètres et traits biologiques caractérisant les mammifères.** Les éléments pointés par des flèches dépendent des éléments d'où proviennent ces flèches pour exister ou fonctionner (e.g. les poils participent à la régulation de la température, la taille corporelle et les capacités d'endothermie dépendent l'une de l'autre). Les flèches pointillées marquent les interactions relatives aux juvéniles. Les termes en gras indiquent les marqueurs traditionnellement utilisés pour identifier la capacité des espèces fossiles à être endothermes (rouge), pratiquer la lactation (bleu) ou les deux (violet). Modifié d'après Kemp, 1982. **Qualitative synthesis of the links between mammalian biological processes, parameters and traits.** Items pointed by arrows depend of the items at the base of these arrows to exist or function (e.g. hairs help temperature regulation, body size and endothermy capacities are influenced by each other). Dashed arrows indicate interactions relative to juveniles. Words in bold indicate traditional proxies used to identify clues of endothermy (red), lactation (blue), or both (purple) in fossil species. Modified from Kemp, 1982.

et le fonctionnement des écosystèmes du Permien-Trias, et dont la mise en place pourrait être mieux comprise si l'origine et l'évolution de la lactation étaient mieux documentées.

Deux approches traditionnelles se complètent pour étudier l'origine de la lactation : l'étude de l'anatomie des fossiles d'une part, et l'étude des espèces actuelles par l'intermédiaire de leur anatomie, de leur comportement et de leur génome d'autre part. En l'absence de glandes mammaires fossilisées, les paléontologues font appel à d'autres traits anatomiques pour discuter de cette question (voir section précédente I.A.3). En effet, les traits qui caractérisent la biologie des mammifères sont le plus souvent dépendants d'autres traits pour assurer leur fonctionnement, et remplissent eux-mêmes des fonctions nécessaires au fonctionnement d'autres traits. C'est ce constat qui justifie d'utiliser la présence d'un trait biologique donné comme preuve indirecte de l'acquisition d'un autre trait. Cette démarche est largement développée dans les sections précédentes discutant des capacités d'endothermie et de lactation de *Morganucodon* (section I.A.3). Une synthèse des liens existant entre certaines caractéristiques mammaliennes majeures a été réalisée par Kemp en 1982 (une version modifiée est présentée en Figure I.5). Comme indiqué en Figure I.5 et détaillé dans la section dédiée à *Morganucodon* (section I.A.3), ce sont la diphyodontie, la croissance rapide et « déterminée » des juvéniles, les indices de présence de fourrure, les petites tailles juvéniles (suggérant un comportement nidicole) ainsi que la structure du crâne et du cerveau qui permettent traditionnellement de discuter des capacités de lactation des espèces fossiles (Pond, 1977 ; Oftedal, 2002a ; Kemp, 2005 ; Benoit et al., 2016 ; O'Meara et Asher, 2016). Cette approche a toutefois ses limites. D'une part, le registre fossile ne permet pas toujours d'avoir accès à ces preuves indirectes. D'autre part, remonter l'histoire évolutive des thérapside revient aussi à s'éloigner de la biologie des mammifères, ce qui implique des changements difficiles à apprécier dans le schéma de fonctionnement des espèces tel que présenté en figure I.5.

La lactation des mammifères modernes remplit de nombreuses fonctions (e.g. apports caloriques, apports en minéraux, protection antimicrobienne). Ceci contribue à faire de la lactation un phénomène très complexe au cœur de nombreux aspects de la vie mammalienne (Figure I.5). Le niveau de compréhension actuel des mécanismes de l'évolution suggère qu'il est très peu probable qu'un tel trait

soit apparu à la suite d'un seul évènement évolutif (Oftedal, 2002a). Il est donc largement admis que la lactation telle qu'on l'appréhende chez les mammifères actuels est le résultat d'une complexification progressive au cours de l'évolution (Oftedal, 2002a, 2020). Des formes primitives de lactation (protolactation) auraient ainsi rempli un nombre croissant de fonctions au cours de l'évolution, en passant avec succès le filtre de la sélection naturelle et de la dérive génétique (Oftedal, 2002a, 2020). À son époque, Charles Darwin avança l'idée que la lactation des mammifères modernes pouvait dériver de sécrétions cutanées nutritives qui se déroulaient au sein d'une poche analogue à celle des marsupiaux (Darwin, 2004). Cette hypothèse, en partie invalidée par la suite, ouvra la marche à de nombreuses autres théories ayant pour but de décrire la succession des caractéristiques et fonctions passées des formes de protolactation. Synthétisées pour la plupart par Oftedal en 2002 (Oftedal, 2002a), ces théories proposent qu'avant d'assurer les apports nutritifs des juvéniles après leur naissance, les formes primitives de la lactation remplissaient plutôt des fonctions destinées à favoriser le développement des œufs ou à apporter un soutien non-nutritif aux juvéniles. En effet, il est largement admis que les premiers mammifères et les synapsides non-mammaliens pondaient des œufs, à l'instar des monotrèmes actuels (Oftedal, 2002a). De ce fait, il a notamment été proposé que certaines formes de protolactation permettaient de réguler la température des œufs (Oftedal, 2002a), d'hydrater des œufs non-calcifiés (Long, 1969, 1972 ; Hopson, 1973 ; Oftedal, 2002a, b, 2012), de protéger les œufs et les nouveaux-nés contre les infections microbiennes (Hayssen et Blackburn, 1985 ; Blackburn et al., 1989 ; Oftedal, 2002a, 2012), voire de transférer du Ca ou des éléments nutritifs destinés aux œufs (Long, 1969, 1972 ; Kawasaki et al., 2011 ; Oftedal, 2020). Ces théories s'appuient pour la plupart sur les similitudes structurelles, développementales, cellulaires et génétiques qui lient glandes cutanées et glandes mammaires, et fondent leur interprétation fonctionnelle sur des comparaisons faites avec les monotrèmes, les oiseaux, les reptiles, les amphibiens et même les poissons (Oftedal, 2002a).

Dans son article de 2002, Oftedal décrit en détail les points de comparaison anatomique et physiologique entre les glandes mammaires et les autres types de glandes cutanées. A l'échelle de leur structure tissulaire, de par leur mode d'excrétion par exocytose et du fait de leur association avec le

poil mammalien (observable chez les monotrèmes et au cours du développement chez les marsupiaux), les glandes mammaires partagent de nombreuses similarités avec les glandes apocrines, des glandes épidermiques remplissant diverses fonctions chez les mammifères (Oftedal, 2002a). Par conséquent, le scénario qui semble le plus largement accepté à ce jour suggère que les glandes mammaires et les glandes apocrines des mammifères actuels dérivent toutes deux de l'évolution d'une glande apocrine épidermique primitive. Le fait que les glandes apocrines des mammifères modernes remplissent des fonction d'hydratation et de protection antimicrobienne de la peau, soutient l'hypothèse d'une protolactation qui rempliraient les mêmes fonctions vis-à-vis des œufs et/ou des juvéniles (Oftedal, 2002a, 2013, 2020).

La génétique gouvernant la lactation est complexe, avec des centaines de gènes codant les protéines du lait et plusieurs milliers de gènes impliqués dans le fonctionnement des glandes mammaires (Lemay et al., 2009). Toutefois, l'étude de ces gènes a fourni des pistes précieuses pour étudier l'origine génétique de la lactation et les fonctions probables des formes de protolactation. Tout d'abord, on observe que les gènes codant les protéines du lait évoluent selon des contraintes bien distinctes, dépendantes de la fonction des protéines codées et des lignées de mammifères concernées (Rijnkels, 2002 ; Kawasaki et Weiss, 2003 ; Rijnkels et al., 2003 ; Vorbach et al., 2006 ; Sharp et al., 2007 ; McClellan et al., 2008 ; Lemay et al., 2009 ; Kawasaki et al., 2011). Chez certains placentaires par exemple (humains, vaches, chèvre, mouton), les gènes des protéines WAP (Whey Acidic Protein) ont disparu au cours de l'évolution et semblent facultatifs au bon déroulement du développement des juvéniles (Triplett et al., 2005 ; Sharp et al., 2007). Ceci souligne un relâchement des pressions de sélection naturelle sur ces gènes pour certains taxons, là où les monotrèmes, les marsupiaux et d'autres placentaires tels que la souris sont toujours dépendants de ces gènes pour assurer une lactation pleinement opérationnelle (Triplett et al., 2005 ; Sharp et al., 2007). Chez tous les mammifères actuels, les gènes codant pour les  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ -caséines se sont quant à eux beaucoup diversifiés en terme de séquences ADN (Rijnkels, 2002 ; Rijnkels et al., 2003 ; Lemay et al., 2009). Ces quatre caséines sont toutefois restées fonctionnellement similaires à l'échelle de l'ensemble des mammifères actuels (Oftedal, 2020), potentiellement grâce à la conservation de l'organisation de ces

gènes au sein du génome et de séquences d'ADN non-codantes régulant l'expression de ces derniers (Rijnkels et al., 2003). À l'inverse des gènes WAP et des gènes codant les caséines, les autres gènes impliqués dans la lactation demeurent en moyenne plus conservés et plus similaires que les autres gènes du génome des mammifères (Lemay et al., 2009). En conclusion, il semble que les gènes codant pour des protéines à fonction antimicrobienne ou nutritionnelle (e.g. WAP ;  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ -caséines) sont moins contraints dans leur évolution que les autres gènes impliqués dans la lactation (Rijnkels, 2002). Ceci est particulièrement vrai pour les gènes impliqués dans les fonctions de sécrétion, tels que les gènes MFG (Milk Fat Globule) par exemple, qui en moyenne accumulent peu de mutations au cours de l'évolution (Lemay et al., 2009). Ces différentes sections du génome ont donc des histoires évolutives différentes, notamment en terme de contraintes évolutives ou de taux d'évolution.

Comparer les gènes de la lactation avec le reste du génome, ou comparer le génome des mammifères avec celui des autres vertébrés (e.g. amphibiens, reptiles, oiseaux), fournit des informations intéressantes quant aux fonctions potentielles des formes de protolactation. Essentiellement, deux scénarios non exclusifs sont soutenus par la génétique. D'une part, plusieurs gènes codant des protéines du lait (e.g. xanthine oxydoréductase, lysozyme) dérivent de gènes inféodés au système immunitaire, certaines des protéines du lait conservant par ailleurs des vertus antimicrobiennes (Rijnkels, 2002 ; Vorbach et al., 2006 ; McClellan et al., 2008 ; Lemay et al., 2009). Ces observations soutiennent donc là aussi l'idée d'une protolactation ayant pour fonction de protéger des œufs et/ou des juvéniles des infections microbiennes. D'autre part, les données recueillies sur les gènes des caséines soulignent une parenté génétique entre ces gènes et certains gènes codant pour des phosphoprotéines lieuses de calcium (SCPP), des protéines impliquées dans la minéralisation des dents et dont l'origine génétique pourrait pré-dater la divergence entre synapsides et sauropsides (Kawasaki et Weiss, 2003 ; Kawasaki et al., 2011). En plus de ces origines précoces, il a été démontré que les caséines apparues le plus précocement au cours de l'évolution (les  $\kappa$ -caséines) permettent à elles seules un transport accru de calcium et de phosphore dans le lait. Les petites micelles formées dans ce contexte restent moins efficaces pour le transport du Ca et du P que les complexes de  $\alpha_s$ ,  $\beta$ , et  $\kappa$ -caséines que l'on retrouve dans le lait des mammifères actuels. Cependant, elles ont

vraisemblablement permis d'assurer ces fonctions plus tôt au cours de l'évolution et de manière potentiellement plus compatible avec le transport à travers les membranes d'œufs non-calcifiés (Kumar et al., 1994 ; Chanat et al., 1999 ; Kawasaki et al., 2011). Ceci soutient donc le scénario d'une protolactation ayant pour fonction d'assurer des apports en Ca et P aux œufs ou aux juvéniles (avant ou après l'éclosion).

Si les observations mentionnées ci-dessus permettent de théoriser sur les pistes de l'origine fonctionnelle et évolutive de la lactation, elles demeurent en revanche peu précises pour dater l'apparition de ces fonctions et des innovations évolutives associées. Le fait qu'aucune espèce de synapside non-mammalienne ne soit parvenue vivante jusqu'à notre époque crée un fossé de plusieurs centaines de millions d'années sans possibilité de comparer finement l'évolution du génome des synapsides (entre l'ancêtre commun des mammifères et celui des amniotes). Une partie des informations que l'on peut tirer de la génétique est donc restreinte à l'histoire des gènes de la lactation après l'apparition des premiers mammifères (e.g. disparition des gènes WAP dans certaines lignées). La précision des méthodes d'horloges moléculaires étant elle aussi limitée par ce genre de lacunes, les informations temporelles sur l'évolution de la lactation accessibles grâce à ces méthodes restent limitées.

## *B. L'approche géochimique*

### **1. Contexte général**

Comme cela vient d'être souligné dans les sections précédentes, on constate que les informations sur l'évolution de la lactation sont limitées par l'absence de preuves fossiles directes (fossilisation peu probable des glandes mammaires) et par la disparition des synapsides non-mammaliens au cours de l'histoire de la Terre (avec les données génétiques et anatomiques qu'ils auraient pu fournir). En l'absence d'une datation précise de l'origine de la lactation et d'un suivi temporel de l'évolution de ce trait (i.e. suivi temporel des formes de protolactation et de leurs fonctions), le rôle de la lactation dans l'évolution des thérapsides reste assez énigmatique. C'est notamment vrai pour la crise Permo-Trias, où lactation et protolactation ont pu jouer un rôle important dans la survie des quelques groupes de



thérapsides qui ont survécu à la crise. Compte tenu de ces limites et des questions scientifiques en jeu, il semble nécessaire de disposer de nouveaux outils pour pouvoir comprendre l'évolution de la lactation et son impact sur l'histoire de la vie. L'approche que nous avons décidé d'explorer avec cette thèse est celle de la géochimie.

De manière générale, la nature des atomes qui nous composent dépend de notre environnement (biotique et abiotique), de nos interactions avec celui-ci (i.e. notre comportement), et de la manière dont notre organisme fonctionne chimiquement parlant (i.e. notre physiologie et notre métabolisme). Lorsqu'un marqueur chimique permet d'obtenir des informations indirectes sur un phénomène que l'on souhaite étudier, on qualifie ce marqueur de proxy du phénomène. Par exemple, si la concentration d'un élément chimique dans un organe dépend de l'alimentation (exemple : la concentration en mercure dans les cheveux dépend de la consommation en poisson dans certaines zones du globe, Petrova et al., 2020), il devient possible d'utiliser la mesure de la concentration de cet élément comme un proxy du régime alimentaire (exemple : mesurer la concentration en mercure dans les cheveux pour connaître l'alimentation de la population d'étude). Un chercheur en géochimie qui s'intéresse au vivant (i.e. à la biosphère), ou à ce qui fut vivant par le passé (i.e. la paléobiosphère et les fossiles qui en résultent), s'attache à démêler les signaux environnementaux, comportementaux et physiologiques afin d'extraire des informations interprétables du ou des éléments qu'il étudie. Pour ce faire, les géochimistes peuvent combiner plusieurs proxys ayant un champ d'investigation complémentaire (approche multi-proxys), ou bien identifier des marqueurs influencés par un petit nombre de facteurs et sensibles à ces derniers. Les deux approches sont complémentaires.

Le but de cette thèse est de développer un outil qui, à partir de la composition chimique ou isotopique des tissus minéralisés fossiles (i.e. os ou dents), permettrait de détecter si un animal a produit ou consommé du lait (ou protolait) au cours de sa vie (i.e. un proxy des périodes d'allaitement). Pour plusieurs raisons détaillées dans la suite de cette introduction, mes efforts se sont concentrés sur le calcium (Ca) contenu dans les os et l'émail dentaire. Les sections suivantes de cette introduction proposent une vue d'ensemble sur différentes méthodes et concepts de géochimie dans le but de contextualiser le choix de l'utilisation du Ca dans un contexte géochimique large.

## 2. Bases de géochimie élémentaire

La matière qui nous entoure et avec laquelle nous interagissons au quotidien est principalement composée d'atomes, un assemblage de particules formé d'un noyau de neutrons et de protons ainsi que d'un nuage d'électrons. La manière dont les atomes interagissent avec les autres atomes en dehors des réactions nucléaires (i.e. leurs propriétés chimiques) dépend des protons du noyau (chargés positivement) et des électrons qui y sont associés (chargés négativement). En conséquence, on classe les atomes en fonction du nombre de protons qui les composent afin d'identifier des catégories d'atomes partageant les mêmes propriétés chimiques. Ces catégories sont ce qu'on appelle les éléments chimiques (e.g. hydrogène, hélium, oxygène, carbone, calcium ... etc.), éléments classiquement répertoriés dans le tableau périodique des éléments (i.e. tableau de Mendeleïev) qui à ce jour compte 118 éléments chimiques formellement identifiés dont 94 trouvés dans le milieu naturel (les autres étant des éléments radioactifs synthétisables en laboratoire mais se désintégrant rapidement, raison de leur absence dans la nature). Toutefois, pour un même nombre de protons, les atomes peuvent être constitués d'un nombre de neutrons différents. Changer le nombre de neutrons d'un atome n'impacte pas ses propriétés chimiques au premier ordre, mais change sa masse (i.e. les atomes sont plus ou moins lourds en fonction de leur nombre de neutrons) et définit si un atome est stable ou radioactif (i.e. capable de se désintégrer spontanément pour former d'autres atomes et particules). Pour faire la distinction entre les atomes de masse différente au sein d'un même élément chimique on parle d'isotopes. Chaque isotope d'un élément chimique est donc constitué du même nombre de protons, mais d'un nombre de neutrons différent. On identifie ces isotopes par la somme de neutrons et de protons qui composent leur noyau. Par exemple, le  $^{40}\text{Ca}$  (ou calcium 40) est composé de 20 protons pour 20 neutrons, à la différence du  $^{44}\text{Ca}$  (ou calcium 44) qui est composé de 20 protons pour 24 neutrons, les deux étant des isotopes du calcium.

La géochimie est la discipline scientifique qui documente les compositions élémentaires et isotopiques du monde qui nous entoure (i.e. les portions des différents éléments chimiques et isotopes dans la matière) et qui discute de l'origine de ces proportions. Historiquement, cette science s'est d'abord consacrée à l'étude des processus géologiques et cosmologiques (e.g. conditions de formation de la

Terre, du système solaire et de l'univers), mais trouve de plus en plus d'applications dans d'autres champs disciplinaires tels que la biologie, l'archéologie et la paléontologie.

### 3. L'approche géochimique en paléontologie : diagenèse et choix du proxy

Lorsqu'on s'intéresse à du matériel fossile, des contraintes spécifiques limitent le champ des méthodes de géochimie utilisables. D'une part, le matériel fossile est disponible en quantité limitée, tandis que beaucoup de méthodes d'analyse nécessitent la destruction d'une partie du matériel à analyser (par dissolution ou vaporisation notamment). On parle de méthodes destructives. Afin de préserver les informations non-géochimiques que contiennent les fossiles (forme, structure) et de préserver le matériel fossile pour les questions scientifiques et les technologies de demain, il convient de limiter ces destructions au minimum nécessaire pour faire avancer les questions scientifiques d'aujourd'hui (un équilibre généralement arbitré par les conservateurs des collections paléontologiques). En pratique, les méthodes les moins destructives possibles sont favorisées lorsque la qualité de l'information est comparable, et les méthodes les plus destructives (nécessitant le plus de matière) sont en général réservées au matériel le moins précieux et le plus abondant. En complément, un maximum d'informations peut être recueilli avant le prélèvement sur le fossile (e.g. photographies, scan 3D).

La seconde limite vient des fossiles et de leur histoire. En effet, même si toutes les conditions sont réunies pour qu'un animal se fossilise après sa mort (un phénomène exceptionnellement rare qui ne concerne qu'une infime partie des organismes ayant vécu un jour à la surface de notre planète), de nombreux processus peuvent altérer la chimie d'origine des tissus de l'animal entre son enfouissement dans le sédiment et sa découverte en tant que fossile. On regroupe l'ensemble de ces processus d'altération sous le terme de diagenèse, processus qui peuvent être abiotiques (e.g. dissolution d'un minéral) ou catalysés par l'activité biologique (e.g. activité microbienne). La diagenèse peut se manifester par : l'absorption d'éléments chimiques du milieu par le fossile (i.e. depuis les sédiments qui l'entourent et les fluides qui y circulent), la substitution d'éléments chimiques du fossile par ceux du milieu, la dissolution d'une partie du fossile ou encore la formation de nouveaux minéraux à partir

des éléments présents dans le milieu (Kohn et al., 1999 ; Reynard et Balter, 2014). Ces processus peuvent se combiner à différents degrés. On parle notamment de reminéralisation lorsque les tissus d'origine du fossile sont dissous et remplacés par de nouveaux minéraux, un phénomène qui peut avoir lieu à une échelle très fine en préservant la forme d'origine du fossile. L'intensité de ces processus d'altération dépend de la stabilité des liaisons chimiques liant les atomes et les molécules constitutifs du fossile, de la structure minérale dans laquelle ces atomes sont intégrés, de la composition chimique du milieu (e.g. sédiments et fluides), des conditions de pression et température qui règnent dans le milieu, ainsi que du temps d'enfouissement. Un autre élément déterminant est la structure du tissu fossilisé. En effet, plus le tissu aura un rapport surface/volume élevé et plus ce dernier sera susceptible d'échanger avec le milieu. En outre, un tissu poreux (e.g. dentine, os) sera aussi plus susceptible d'accueillir la précipitation de minéraux diagénétiques dont il sera potentiellement difficile de se séparer pour réaliser échantillonnages et analyses (Kohn et al., 1999).

Il est indispensable de savoir si les données extraites de l'analyse d'un fossile sont représentatives des conditions de la vie passée de l'animal (i.e. signaux enregistrés *in vivo*) ou de l'altération (i.e. signaux diagénétiques). Plusieurs approches complémentaires permettent de déterminer si des signaux *in vivo* ont pu être préservés. Un point clef est que la diagenèse n'est pas homogène à l'échelle des différents tissus et des molécules qui composent un fossile. En pratique, plus on souhaite étudier des fossiles anciens et plus la liste des tissus et molécules étant capables de résister au passage du temps se réduit. Le plus généralement, les tissus mous sont les premiers dégradés (décomposition et diagenèse précoces), la forme de ces tissus ne se préservant que dans les rares cas où ces derniers sont minéralisés au cours de la diagenèse, ce qui se fait au détriment de leur chimie d'origine (Thomas et Taylor, 2019). Dans de rares conditions encore mal comprises, certaines molécules organiques (e.g. collagène) peuvent se préserver, au moins partiellement, et traverser les âges (Cénozoïque, Mésozoïque, Paléozoïque, voire Précambrien ; Thomas et Taylor, 2019). Toutefois, dans la large majorité des cas, ce sont les tissus minéralisés qui ont le meilleur potentiel de préservation. Pour remonter loin dans le temps (plusieurs millions d'années), les méthodes se basant sur l'analyse de

composés organiques se heurtent donc souvent au problème de la préservation des molécules cibles, les tissus minéralisés restant l'un des seuls supports disponibles pour la géochimie.

Parmi les différents tissus fossilisés, les dents et les os font partie du matériel le plus communément trouvé. L'os, ainsi que la dentine et l'émail qui composent les dents, sont tous composés en grande partie de nano-cristaux d'hydroxylapatite ou d'apatite à la composition chimique proche (Wopenka et Pasteris, 2005 ; Pasteris et al., 2008), apatites que l'on peut regrouper sous le terme de bioapatite. Parmi ces tissus, l'émail dentaire se distingue par la possession de nano-cristaux d'apatite de taille cinq à dix fois supérieure à ceux de l'os ou de la dentine (rapport surface/volume plus faible), ainsi que par une très faible proportion (< 5 %) de matière non minérale (Wopenka et Pasteris, 2005 ; Pasteris et al., 2008). L'émail constitue donc un matériau très peu poreux qui échangera donc peu avec le milieu une fois enfoui, même après la dégradation de sa fraction organique. Il serait exagéré de considérer l'hydroxylapatite de l'émail comme complètement inerte et insensible à la diagenèse (Kohn et al., 1999). Toutefois, l'émail dentaire résiste globalement mieux à la diagenèse que l'os ou la dentine (plus poreux et formés de cristaux plus petits), avec la possibilité de préserver certains signaux géochimiques pendant des dizaines voire des centaines de millions d'années (Wang et Cerling, 1994 ; Sharp et al., 2000 ; Zazzo et al., 2004 ; Goedert et al., 2016 ; Martin et al., 2017b ; Rey et al., 2017 ; Hassler et al., 2018).

Si l'intensité de la diagenèse n'est pas homogène à l'échelle d'un tissu, elle ne l'est pas non plus à l'échelle du minéral. En effet, tous les éléments chimiques constitutifs d'un minéral ne sont pas aussi stables dans la structure du minéral en question, et les conditions du milieu peuvent favoriser ou défavoriser certains processus diagénétiques ciblant spécifiquement une partie du minéral (Kohn et al., 1999 ; Zazzo et al., 2004 ; Wopenka et Pasteris, 2005 ; Reynard et Balter, 2014 ; Martin et al., 2017b). En résumé, certains éléments chimiques ainsi que les proxys qu'ils peuvent constituer seront plus sensibles à l'altération diagénétique que d'autres en fonction : des conditions biotiques et physico-chimiques du milieu (présence de certaines bactéries, conditions oxydo-réductrices, pH, pression, température, éléments chimiques et molécules en présence), de leur place dans la structure moléculaire du minéral, et de leur concentration dans le fossile (Kohn et al., 1999 ; Zazzo et al., 2004 ;

Wopenka et Pasteris, 2005 ; Reynard et Balter, 2014 ; Martin et al., 2017b). De manière générale, un proxy géochimique sera plus résistant à l'effet de la diagenèse si l'élément chimique sur lequel il se base est contenu dans une molécule chimiquement stable dans les conditions physico-chimiques du milieu, que cet élément est solidement ancré dans la molécule qui l'accueille (i.e. liaisons chimiques fortes), et que celui-ci est présent en grande quantité dans le fossile et peu dans le milieu (surtout vrai pour les proxys isotopiques ; Kohn et al., 1999 ; Zazzo et al., 2004 ; Wopenka et Pasteris, 2005 ; Reynard et Balter, 2014 ; Martin et al., 2017b).

Enfin, en parallèle d'un choix de tissu et de méthodes robustes face aux effets de la diagenèse, il existe des méthodes permettant de qualifier l'intensité de la diagenèse subie par un fossile. L'un des points clés de ces méthodes réside dans le fait que les minéraux formés en conditions diagénétiques sont généralement de nature ou de taille différentes de ceux formés *in vivo*. Ces différences peuvent être détectées afin de qualifier l'intensité des processus de diagenèse ayant affecté un fossile, notamment par l'intermédiaire de méthodes non destructives (e.g. microscopie, spectroscopie Raman et infrarouge ; Shemesh, 1990 ; Stuart-Williams et al., 1996). En parallèle de ces informations minéralogiques, certains éléments chimiques rares dans les tissus vivants sont incorporés dans les fossiles par la diagenèse (e.g. les terres rares). Ces éléments nous informent sur les événements intervenus entre la mort de l'animal et la découverte du fossile (on parle de taphonomie), et donc sur l'histoire diagénétique du fossile (Reynard et al., 1999 ; Trueman, 1999, 2013 ; Metzger et al., 2004 ; Trueman et al., 2004, 2006 ; Suarez et al., 2007 ; Reynard et Balter, 2014 ; Knutsen et Oerlemans, 2020). Grâce à ces éléments, il est possible d'identifier les processus diagénétiques ayant affecté le fossile (Reynard et al., 1999 ; Reynard et Balter, 2014). Toutefois, la portée de ces différentes méthodes se heurte à l'hétérogénéité de l'intensité diagénétique aux échelles moléculaire et élémentaire (cf. paragraphes précédents). Quantifier la proportion des signaux d'origine diagénétique et *in vivo* n'est donc possible que pour les éléments chimiques dont on connaît déjà le signal *in vivo* d'origine. Corriger des données géochimiques de l'influence diagénétique est donc souvent impossible en pratique, à l'exception d'une poignée d'éléments chimiques et de contextes bien particuliers (e.g. les éléments chimiques absents ou quasi-absents *in vivo*). Ces méthodes de qualification de la diagenèse sont donc

avant tout complémentaires d'un choix avisé de méthode et de proxy géochimique, et permettent d'orienter ou d'appuyer la légitimité de ce choix vis-à-vis des processus diagénétiques ayant affecté le fossile.

#### 4. Éléments traces et lactation

Dans la littérature géochimique, l'une des approches qui a été proposée pour obtenir des informations sur les comportements d'allaitement et de sevrage se base sur la concentration de certains éléments traces dans les tissus biologiques. Le terme d'élément trace regroupe les éléments chimiques présents en petite quantité dans un système (par opposition aux éléments majeurs). La définition exacte de ce terme varie cependant quelque peu selon les disciplines. En géochimie, le terme d'élément trace englobe généralement les éléments représentant moins de 0,1 % de la masse d'une roche ou de la croûte terrestre. La définition de ce terme en biologie conserve le concept de la rareté des éléments traces, mais en les considérant à l'échelle de l'organisme. La biologie introduit également la distinction entre les éléments traces bio-essentiels (i.e. nécessaires au fonctionnement normal de l'organisme : fer et cuivre par exemple) et non-essentiels (i.e. non-nécessaires au fonctionnement de l'organisme : plomb et mercure par exemple), les deux catégories pouvant être toxiques pour l'organisme à certaines concentrations.

Les deux éléments traces qui ont concentré le plus d'attention au sujet de l'étude de la lactation sont le strontium (Sr) et le baryum (Ba) contenus dans les tissus minéralisés (os et dents). Ces deux éléments non-essentiels ont des propriétés chimiques très proches du Ca (famille des métaux alcalino-terreux), ce qui contribue à leur incorporation dans l'apatite des os et des dents (Balter, 2004 ; Reynard et Balter, 2014). Toutefois, les processus physiologiques impliquant le Ca (e.g. absorption intestinale, excrétion urinaire) ont tendance à favoriser ce dernier plutôt que le Sr ou le Ba. En conséquence, lorsqu'on compare les ratios d'abondance (molaires ou massiques) de Sr/Ca et de Ba/Ca des tissus d'un mammifère, ces derniers seront plus bas que ceux de la nourriture de l'animal (la source principale de ces éléments pour un mammifère terrestre). Ce phénomène, appelé bio-purification, a notamment été identifié en comparant les rapports Sr/Ca et Ba/Ca des os, des dents et de la nourriture de plusieurs

espèces de mammifères, notamment de primates (Schroeder et al., 1972 ; Elias et al., 1982 ; Gilbert et al., 1994 ; Burton et al., 1999 ; Balter, 2004 ; Sponheimer et Lee-Thorp, 2006 ; Austin et al., 2013 ; Reynard et Balter, 2014 ; Martin et al., 2014). Les effets de cette bio-purification se propagent et s'additionnent en avançant dans la chaîne alimentaire, et par conséquent les ratios Sr/Ca et Ba/Ca dans le squelette des mammifères seront d'autant plus bas que l'individu sera haut dans la chaîne alimentaire (i.e. top prédateur, consommateur tertiaire).

En suivant la même logique de bio-purification, le lait produit par un mammifère sera lui aussi plus appauvri en Sr et en Ba (relativement au Ca) que sa propre nourriture. Durant l'allaitement, le juvénile sera donc alimenté par une source aux ratios Sr/Ca et Ba/Ca plus faibles que l'alimentation de l'individu adulte (Comar et al., 1957 ; Sillen et Kavanagh, 1982 ; Krachler et al., 1999 ; Humphrey et al., 2007 ; Rossipal et al., 2007). Cette différence affecte tout l'organisme et la transition d'un régime composé de lait maternel vers un régime alimentaire post-sevrage est préservée dans les tissus minéralisant à cette période (e.g. émail et cément dentaire ; Humphrey et al., 2008b ; Austin et al., 2013 ; Humphrey, 2014 ; Tsutaya et Yoneda, 2015 ; Smith et al., 2017 ; Clark et al., 2020). Ces signaux de sevrage sont complexifiés par le développement du système digestif et rénal du juvénile au cours de sa croissance (qui modifient l'intensité de la bio-purification du Sr et du Ba par rapport au Ca à l'échelle de l'individu), ainsi que par la faible biodisponibilité du Ba dans l'alimentation en dehors du lait maternel (Lough et al., 1963 ; Sillen et Smith, 1984 ; Clark et al., 2020). Toutefois, des avancées dans la compréhension de ces facteurs confondants permettent, dans une certaine mesure, de remonter aux Sr/Ca et Ba/Ca alimentaires, et donc d'identifier des âges et des pratiques de sevrage chez les groupes étudiés (Sillen et Smith, 1984 ; Humphrey et al., 2008a, b ; Austin et al., 2013 ; Tsutaya et Yoneda, 2015 ; Smith et al., 2017).

L'étude du Sr/Ca et Ba/Ca des tissus minéralisés est donc très prometteuse pour l'étude des pratiques d'allaitement et de sevrage chez les mammifères, notamment chez les primates et les populations humaines passées autour desquels la littérature s'est beaucoup concentrée jusqu'à présent (e.g. Sillen et Smith, 1984 ; Austin et al., 2013 ; Smith et al., 2017). Cependant, plusieurs paramètres viennent limiter la portée de ces méthodes pour étudier la lactation à ses origines. Tout d'abord, l'identification



précise des périodes d'allaitement et de sevrage passe par la reconstitution des Sr/Ca et Ba/Ca alimentaires (Sillen et Smith, 1984 ; Humphrey, 2014 ; Tsutaya et Yoneda, 2015 ; Clark et al., 2020). Or, ceci n'est possible que si la biodisponibilité du Sr et du Ba dans l'alimentation sont bien contraints, et s'il est possible d'évaluer l'évolution des capacités du juvénile à ségréguer le Sr et le Ba de son alimentation (changements liés au développement du système digestif et rénal notamment). Ces paramètres sont difficiles à contraindre pour les espèces fossiles sans analogues actuels, au même titre d'ailleurs que l'âge de minéralisation des tissus dentaires (ou l'âge des spécimens dont on analyserait les os), un autre élément important pour l'établissement d'âges de sevrage.

Sans chercher des informations aussi précises que des âges de sevrage, la simple détection de périodes d'allaitement par le biais des ratios Sr/Ca et Ba/Ca se complexifie lorsqu'on s'intéresse à des fossiles vieux de plusieurs millions d'années. En effet, la majorité des processus diagénétiques (e.g. absorption élémentaire, substitution élémentaire, minéralisation de nouvelles phases, reminéralisation) sont susceptibles de modifier les ratios Sr/Ca et Ba/Ca d'un fossile. En outre, avec des ratios Sr/Ca et Ba/Ca sensiblement plus élevés dans le milieu que dans les tissus minéralisés (e.g. Sr/Ca et Ba/Ca des sols  $\approx$  0,09 contre environ 0,002 maximum dans l'os et l'émail : Burton et al., 1999 ; Sponheimer et Lee-Thorp, 2006), les ratios Sr/Ca et Ba/Ca des fossiles sont très sensibles aux apports de Sr, de Ba et de Ca du milieu (incorporés dans le fossile par minéralisation de carbonates ou par diffusion dans l'apatite).

Plusieurs études rapportent des cas de Sr/Ca ou Ba/Ca supposément diagénétiques dans des ossements datés du Quaternaire seulement (Sillen, 1981 ; Lambert et al., 1984, 1985 ; Nelson et al., 1986 ; Price et al., 1992). Des méthodes telles que les lavages acides ont été proposées pour corriger les effets de la diagenèse lorsque celle-ci se manifeste par la minéralisation de carbonates, ou que l'altération se cantonne aux apatites les plus directement exposées au milieu (Sillen et LeGeros, 1991 ; Price et al., 1992). Toutefois, les fortes concentrations en Sr et Ba rapportées dans certains fossiles mésozoïques (e.g. Sr = 1593 ppm, Ba = 770 ppm : Hassler et al., 2018 ; Sr = 714 ppm : Terrill et al., 2020) ainsi que leurs ratios Sr/Ca et Ba/Ca élevés (e.g. Sr/Ca (x1000) = 4,7, Ba/Ca (x1000) = 2,4 : Hassler et al., 2018 ; généralement  $< 1,5$  dans les ossements quaternaires diagénétisés ou non : Sillen, 1981 ; Lambert et al., 1985 ; Price et al., 1992 ; Burton et al., 1999) suggèrent une diagenèse plus poussée

dont il est potentiellement difficile de corriger les effets par de simples lavages acides (e.g. incorporation profonde de Sr et Ba dans l'apatite). Ce constat pousse à développer d'autres méthodes, isotopiques notamment, qui seraient sensibles à moins de processus diagénétiques et qui permettraient de remonter assez loin dans le temps pour étudier les origines de la lactation.

## C. *Géochimie isotopique*

### 1. Bases conceptuelles

La géochimie isotopique est la science qui, comme son nom l'indique, s'intéresse aux compositions isotopiques de la matière. Dans ce domaine, on peut faire la distinction entre la géochimie des isotopes radioactifs d'une part, et la géochimie des isotopes stables d'autre part. Les isotopes radioactifs ont un noyau instable car constitué d'un nombre de neutrons trop faible ou trop élevé par rapport au nombre de protons. Ils possèdent une probabilité de se désintégrer au fil du temps, c'est-à-dire de se transformer en un atome différent en émettant des particules lors de la transformation (e.g. neutrino, électron, positron). Un exemple classique d'isotope radioactif est le carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ). Contrairement au carbone 12 ( $^{12}\text{C}$ ) qui contient 6 protons pour 6 neutrons et qui est stable (i.e. non-radioactif), le  $^{14}\text{C}$  contient 6 protons pour 8 neutrons. Cette configuration est instable et le  $^{14}\text{C}$  tend donc à se désintégrer pour former de l'azote 14 ( $^{14}\text{N}$ ) en émettant au passage un électron et un antineutrino électronique (le plus souvent). Le taux de désintégration des atomes radioactifs peut être mesuré et est souvent représenté sous forme de temps de demi-vie. Si un isotope a un temps de demi-vie de 1 an, cela signifie qu'en 1 an la moitié de la population de cet isotope qui existait à l'an 0 se sera désintégrée. Ce temps de demi-vie est constant pour un isotope donné, ce qui a permis de développer des méthodes de datation de roches et de restes organiques à partir des isotopes radioactifs et de leurs produits de désintégration (e.g. méthodes  $^{14}\text{C}$ ,  $^{40}\text{K}/^{40}\text{Ar}$ ,  $^{238}\text{U}/^{206}\text{Pb}$  ; voir Allègre, 2008 pour une introduction). D'autres éléments radioactifs, tels que le  $^{41}\text{Ca}$ , le  $^{45}\text{Ca}$ , le  $^{46}\text{Ca}$ , ou plus couramment le  $^{123}\text{I}$  ou le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  sont utilisés pour des applications biomédicales. La détection des désintégrations radioactives par l'intermédiaire des particules et rayonnements qu'elles émettent est utilisée dans des méthodes d'imagerie médicale et permet de suivre en direct le destin des éléments chimiques dans l'organisme (Pecher, 1941 ; Kamen,

1951 ; Hansard et al., 1966 ; Itoh et al., 1967 ; Devine et al., 2002 ; Lee et al., 2011). Les radio-traceurs sont donc des outils puissants pour le diagnostic de certaines pathologies et l'étude des processus physiologiques en général.

La géochimie des isotopes stables s'intéresse quant à elle aux isotopes non-radioactifs et a donc un champ d'application différent mais parfois complémentaire de celui des isotopes radioactifs. Beaucoup d'éléments chimiques existent sous la forme de plusieurs isotopes stables (i.e. non-radioactifs), présents dans la nature dans différentes proportions. Ces proportions isotopiques résultent de l'histoire des processus de nucléosynthèse primordiale (immédiatement après le Big Bang), stellaire (au cœur des étoiles) et autres (durant les évènements de supernovas par exemple), puis des conditions de formation du système solaire et de la Terre (Taylor et Sheppard, 1986 ; Zinner, 1998 ; Hoppe et Zinner, 2000 ; Hoefs, 2009). A l'échelle de la Terre, moyenner les proportions de chaque isotope d'un élément chimique donné revient à quantifier ce que l'on nomme l'abondance naturelle des isotopes de l'élément (généralement exprimée en %). L'oxygène de l'atmosphère par exemple est constitué d'un mélange de trois isotopes stables : le  $^{16}\text{O}$  (99,75 %), le  $^{17}\text{O}$  (0,04 %) et le  $^{18}\text{O}$  (0,21 %). Si les isotopes stables d'un même élément ont des propriétés chimiques quasi-identiques (car possédant le même nombre de protons), leurs différences de masse modulent leur réactivité lors des réactions chimiques ou d'échanges isotopiques. Lorsqu'un phénomène génère un changement de proportions d'isotopes entre plusieurs réservoirs d'un élément chimique, on dit qu'il se produit un fractionnement isotopique. Lors des fractionnements entre isotopes stables, rien ne se perd, rien ne se crée, seules les proportions entre isotopes changent entre les réservoirs (i.e. la quantité totale de chaque isotope dans le système reste la même).

Les premières détections de fractionnements isotopiques datent des années 50, une détection relativement tardive qui s'explique par les infimes changements d'abondances isotopiques qu'ils génèrent, et par la complexité des méthodes nécessaires à leur détection (Hoefs, 2009). Les deux familles principales de processus de fractionnements isotopiques sont : (1) les processus d'échanges isotopiques à l'équilibre thermodynamique et (2) les processus de fractionnements cinétiques (Hoefs, 2009). Dans le premier cas, la quantité d'éléments chimiques dans chaque réservoir en interaction

reste identique au cours de l'échange, seules changent les proportions isotopiques au sein des réservoirs de cet élément chimique. Ce phénomène a lieu car les molécules formées d'isotopes différents auront des énergies de liaisons différentes (surtout en terme d'énergie vibrationnelle). La plupart des processus cinétiques impliquent quant à eux des réactions chimiques (e.g. dissociations de molécules, réaction chimique biologiques) ou des changements de phase (e.g. évaporation) au cours desquels la quantité d'élément chimique des réservoirs en présence évolue au cours du temps. Dans de tels cas, les différences de masse entre isotopes génèrent des différences de réactivité à la réaction en cours. Ces différences génèrent alors un fractionnement en favorisant généralement les isotopes légers dans la réaction. Le plus communément, ces deux familles de processus génèrent des fractionnements dits « dépendants de la masse ». Ces fractionnements seront d'autant plus marqués que la différence de masse entre isotopes sera grande, et que la masse totale des isotopes sera faible (Hoefs, 2009 ; Gussone et al., 2016). Les températures élevées tendront quant à elle à diminuer l'intensité de ces fractionnements, bien que les différents processus de fractionnements isotopiques n'aient pas tous la même sensibilité à ce paramètre (Hoefs, 2009 ; Gussone et al., 2016). Il existe aussi des phénomènes de fractionnements indépendants de la masse, mais ceux-ci n'ont jusqu'ici été détectés que pour une poignée d'éléments chimiques dont le Ca ne fait pas partie (Hoefs, 2009 ; Gussone et al., 2016).

## 2. Notations et formalisme

Mesurer précisément des abondances isotopiques absolues est difficile à réaliser. Ce sont donc plutôt des rapports d'abondances isotopiques qui sont mesurés en pratique, ce qui équivaut au rapport entre le nombre d'atomes de deux isotopes. Par convention, ces rapports d'abondances sont toujours calculés avec l'isotope le plus lourd du couple isotopique placé au numérateur (e.g.  $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$  ou  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ). Cependant, la mesure de ces rapports isotopiques se heurte à la précision des instruments de détection et aux différents biais de mesures affectant ce type d'analyse (qui varient entre les protocoles analytiques, le type d'échantillon, et les éléments chimiques étudiés). Pour pallier à ces problèmes, l'utilisation de la notation delta ( $\delta$ ) consiste à normaliser le rapport isotopique mesuré sur celui d'un matériau de référence (e.g. roche, matériel biologique, matériel synthétique) qui constitue

alors un standard isotopique. C'est ce qui permet la reproductibilité et la comparabilité des mesures entre laboratoires (Albarède, 2009 ; Hoefs, 2009 ; Coplen, 2011). Pour un couple isotopique donné, le  $\delta$  se calcule en selon la formule suivante :

$$\delta^{a/b}X_{\text{standard}} = \left( \frac{({}^aX / {}^bX)_{\text{échantillon}}}{({}^aX / {}^bX)_{\text{standard}}} - 1 \right)$$

Où X est un élément chimique donné, a et b sont le nombre de masse (protons + neutrons) de deux isotopes de l'élément X, avec par convention  $a > b$  (i.e. l'isotope lourd est au numérateur). Le  $\delta$  est classiquement exprimé en ‰ pour générer des valeurs plus tangibles (i.e. multiplié par un facteur 1000 par rapport au résultat brut de l'équation), les fractionnements isotopiques naturels générant des différences détectables de  $\delta$  entre réservoirs élémentaires de l'ordre de 0,1 à 100 ‰. A titre d'exemple, mesurer la composition isotopique  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  d'un échantillon en fonction du standard « ICP Ca Lyon » (le standard isotopique de Ca le plus utilisé au Laboratoire de Géologie de Lyon) revient donc à appliquer la formule suivante :

$$\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}(\text{échantillon}) = \left( \frac{({}^{44}\text{Ca} / {}^{42}\text{Ca})_{\text{échantillon}}}{({}^{44}\text{Ca} / {}^{42}\text{Ca})_{\text{ICP Ca Lyon}}} - 1 \right)$$

Sous réserve que les mesures soient réalisées avec le même standard, le  $\delta$  permet de comparer les mesures réalisées entre différents laboratoires. Les méthodes de mesure des  $\delta$  étant destructives (la fraction de l'échantillon analysée est détruite lors de l'analyse), il est important que le matériau de référence existe en quantité importante (pour permettre son utilisation par différents laboratoires sur le long terme), et que sa composition isotopique soit homogène et constante au cours du temps (un critère indispensable à la reproductibilité et à la comparabilité des mesures). Pour des raisons historiques (e.g. épuisement du matériau de référence) ou pratiques (e.g. sélection d'un standard de nature proche de l'échantillon, un standard de carbonate pour analyser des carbonates par exemple), beaucoup de systèmes isotopiques sont étudiés par l'intermédiaire de plusieurs standards isotopiques de nature et de composition isotopique différentes. Pour comparer des résultats exprimés selon des standards différents, il est nécessaire de convertir en amont les valeurs de  $\delta$  selon un même standard

isotopique, opération qui nécessite de connaître le  $\delta$  des standards normalisés au ( $^aX/^bX$ ) des autres standards.

Exprimer des différences de composition isotopique entre échantillons, standards ou valeurs de référence se fait par l'intermédiaire de la notation « grand delta » ( $\Delta$ ). Pour un couple isotopique donné,  $\Delta$  se calcule comme suit :

$$\Delta^{a/b}X_{Y-Z} = \delta^{a/b}X_Y - \delta^{a/b}X_Z$$

Où X est un élément chimique donné, a et b sont le nombre de masse de deux isotopes de l'élément X avec  $a > b$ , et où Y et Z sont des échantillons différents, des standards différents, ou de manière plus générale des réservoirs de l'élément X avec une certaine composition isotopique. Les  $\Delta$  et  $\delta$  sont généralement exprimés en ‰. Pour l'exemple, comparer la composition isotopique en  $^{44}\text{Ca}$  et  $^{42}\text{Ca}$  des standards « ICP Ca Lyon » et « SRM915a » (respectivement le standard isotopique de Ca utilisé au Laboratoire de Géologie de Lyon et un standard isotopique courant dans la littérature des isotopes du Ca) revient à appliquer la formule suivante :

$$\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon-SRM915a}} = \delta^{44/42}\text{Ca}_A - \delta^{44/42}\text{Ca}_B$$

Où :

$$\delta^{44/42}\text{Ca}_A = \left( \frac{(^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca})_{\text{ICP Ca Lyon}}}{(^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca})_{\text{standard}}} - 1 \right)$$

Et :

$$\delta^{44/42}\text{Ca}_B = \left( \frac{(^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca})_{\text{SRM915a}}}{(^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca})_{\text{standard}}} - 1 \right)$$

Calculer le  $\delta$  d'un échantillon en fonction de lui-même donne un  $\delta$  de 0 ‰. Pour revenir sur le même exemple on aurait donc :

$$\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon-SRM915a}} (\text{‰}) = \left( \frac{(^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca})_{\text{ICP Ca Lyon}}}{(^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca})_{\text{SRM915a}}} - 1 \right) \times 1000$$

Ou :

$$\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon-SRM915a}} (\text{‰}) = - \left( \frac{(^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca})_{\text{SRM915a}}}{(^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca})_{\text{ICP Ca Lyon}}} - 1 \right) \times 1000$$

Pour conclure sur cet exemple, compiler différentes données d'ICP Ca Lyon, de SRM915a et d'autres standards (n = 71 mesures) a permis de calculer que  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon-SRM915a}} = 0,518 \pm 0,025 \text{ ‰}$  (2 sd, Martin et al., 2018). Une telle donnée permet de comparer les mesures de  $\delta$  acquises avec les deux

standards et donc de discuter de données provenant de différentes études utilisant ces standards. Ce type de démarche est capital, particulièrement dans le domaine des isotopes du Ca où un grand nombre de standards différents est utilisé.

L'intensité d'un fractionnement isotopique est généralement caractérisée par un facteur de fractionnement isotopique  $\alpha$ . Pour un fractionnement isotopique donné entre un réservoir élémentaire de réactif Z et un réservoir élémentaire de produit Y, le coefficient de fractionnement  $\alpha$  de Z vers Y (i.e.  $\alpha_{Y-Z}$  par convention) est calculé comme ceci :

$$\alpha_{Y-Z} = \frac{({}^aX / {}^bX)_Y}{({}^aX / {}^bX)_Z}$$

Où X est un élément chimique donné, et où a et b sont le nombre de masse de deux isotopes de l'élément X, avec  $a > b$ . On l'a vu, on manipule plus généralement des  $\delta$  que des rapports isotopiques bruts. La relation qui lie  $\alpha$  et  $\delta$  est la suivante :

$$\alpha_{Y-Z} = \frac{\delta^{a/b}X_Y (\text{‰}) + 1000}{\delta^{a/b}X_Z (\text{‰}) + 1000}$$

Lorsque l'écart entre  $\delta^{a/b}X_Y$  et  $\delta^{a/b}X_Z$  est faible (e.g.  $< 5 \text{‰}$ ) et que ces  $\delta$  sont proches de 0 (e.g. compris entre  $-5$  et  $5 \text{‰}$ ), on peut faire l'approximation suivante sans perte majeure de précision :

$$\Delta^{a/b}X_{Y-Z} (\text{‰}) = \delta^{a/b}X_Y (\text{‰}) - \delta^{a/b}X_Z (\text{‰}) \approx 1000 \times \ln(\alpha_{Y-Z})$$

Un  $\alpha_{Y-Z} = 1$  signifie qu'il n'y a pas de fractionnement isotopique entre Y et Z,  $\alpha_{Y-Z} < 1$  signifie que Y s'appauvrit en isotopes lourds ( ${}^aX$ ) par rapport à Z, et  $\alpha_{Y-Z} > 1$  signifie que Y s'enrichit en isotopes lourds ( ${}^aX$ ) par rapport à Z.

### 3. Isotopes légers et paléobiologie

Durant les premières décennies suivant la naissance de la géochimie des isotopes stables, c'est l'étude de certains éléments légers, à savoir l'hydrogène, le carbone, l'azote, l'oxygène et le soufre, qui a attiré l'essentiel de l'attention des géochimistes. On fait souvent référence au terme d'isotopes traditionnels pour parler du champ d'étude qui concerne ces 5 éléments. Cet historique s'explique par le fait que

les éléments légers sont par nature plus sensibles aux fractionnements isotopiques dépendants de la masse, la différence de masse entre leurs isotopes étant proportionnellement plus grande que les éléments lourds au regard de leur masse totale. Les fractionnements isotopiques affectant ces éléments peuvent ainsi atteindre plusieurs dizaines de ‰ d'amplitude, contre en général quelques ‰ ou dixièmes de ‰ pour l'essentiel des éléments plus lourds. L'étude des systèmes isotopiques traditionnels a été une révolution dans notre compréhension de l'histoire de la vie et de la Terre (voir Lee-Thorp, 2008 ; Hoefs, 2009 et Clementz, 2012 pour une synthèse), avec par exemple des découvertes pionnières dans les domaines de la paléoclimatologie des cycles glaciaires et interglaciaires (Dansgaard et al., 1993 ; Waelbroeck et al., 2002 ; Lisiecki et Raymo, 2005), de la formation du système solaire (Clayton, 1993), de la géologie de la Terre (Drake et Richter, 2002), ou dans le déroulement de certaines extinctions de masse (Zachos et al., 1989 ; Ward et al., 2001).

Dans le domaine de la paléobiologie, les isotopes stables de l'oxygène, du carbone, de l'azote et du soufre ont aussi permis des avancées remarquables (Koch, 2007 ; LEE-THORP, 2008 ; Clementz, 2012 ; Tsutaya et Yoneda, 2015). Les isotopes de l'oxygène pour commencer (principalement  $^{18}\text{O}$  et  $^{16}\text{O}$ ), fournissent des informations sur l'environnement des espèces fossiles, et plus particulièrement sur les températures, les précipitations et la saisonnalité qui caractérisaient l'environnement de ces espèces. En mesurant le  $\delta^{18}\text{O}$  de l'apatite des os et des dents, il est en effet possible de remonter à la valeur de  $\delta^{18}\text{O}$  de l'eau consommée par les animaux, elle-même dépendante des précipitations, de la température, de la latitude et de l'altitude dans le cas des animaux terrestres (Longinelli, 1984 ; Koch et al., 1989 ; Bryant et al., 1996 ; Amiot et al., 2004, 2011). En plus de ces facteurs, le  $\delta^{18}\text{O}$  de l'apatite des os et des dents dépend aussi de la température corporelle des espèces. C'est ce facteur qui a permis d'utiliser le  $\delta^{18}\text{O}$  pour identifier des capacités d'endothermie et d'homéothermie chez certains thérapside (Rey et al., 2017), mais aussi chez certains dinosaures (Barrick et Showers, 1994 ; Amiot et al., 2006) et reptiles marins (Bernard et al., 2010). Sur le volet de la lactation, il a été montré que les enfants allaités par leur mère avaient des valeurs plus élevées de  $\delta^{18}\text{O}$  dans leurs urines que les enfants ayant une alimentation différente (Roberts et al., 1988). Ceci suggère un enrichissement du lait maternel en  $^{18}\text{O}$  par rapport aux eaux de boisson disponibles pour la mère et l'enfant. Cette différence



isotopique se répercutant dans l'oxygène des dents ou des os (i.e. oxygène contenu dans les groupes carbonates et phosphates de l'apatite), il devient possible d'utiliser ces changements de  $\delta^{18}\text{O}$  pour déterminer des âges de sevrage. Dans ce contexte, la transition depuis des valeurs hautes de  $\delta^{18}\text{O}$  vers des valeurs plus basses de  $\delta^{18}\text{O}$  peut s'interpréter comme le résultat d'un changement alimentaire associé au sevrage (i.e. consommation d'eau en dehors du lait maternel ; Wright et Schwarcz, 1998 ; White et al., 2000 ; White et al., 2004 ; Williams et al., 2005). Toutefois, ce type d'interprétation est difficile à réaliser, même en se cantonnant à l'étude des mammifères modernes. En effet, le  $\delta^{18}\text{O}$  du squelette dépend de nombreux autres facteurs que la consommation de lait maternel (variabilité saisonnière du  $\delta^{18}\text{O}$  des eaux de pluie par exemple), un constat qui s'illustre par une gamme de variation naturelle dix fois plus étendue que les changements de  $\delta^{18}\text{O}$  générés par le sevrage et la consommation de lait maternel (Tsutaya et Yoneda, 2015). Ainsi, même si le  $\delta^{18}\text{O}$  des phosphates de l'apatite de l'émail dentaire est susceptible de résister suffisamment à la diagenèse pour permettre l'étude de fossiles du Trias ou du Permien (Kohn et al., 1999 ; Zazzo et al., 2004 ; Rey et al., 2017), le  $\delta^{18}\text{O}$  demeure un outil individuellement peu puissant pour discuter de sevrage et de capacités de lactation.

Du côté des isotopes du carbone, l'application la plus répandue en paléobiologie consiste à mesurer le  $\delta^{13}\text{C}$  du collagène ou des carbonates de l'apatite de l'os et des dents pour remonter à la consommation de plantes C4 (principalement certaines poacées et cypéracées), C3 (la plupart des autres familles de plantes), ou de proies consommant ces plantes (Vogel, 1978 ; van der Merwe, 1982 ; Cerling et al., 1997 ; LEE-THORP, 2008 ; Tsutaya et Yoneda, 2015 ; Martin et al., 2017b, 2018). En effet, les plantes C3 et C4 ont des valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  différentes dans leurs tissus du fait de leurs différents métabolismes photosynthétiques (Smith et Epstein, 1971 ; O'Leary, 1988 ; Farquhar et al., 1989), une différence qui se propage ensuite dans la chaîne alimentaire moyennant un décalage entre source et consommateur qui dépend de la masse corporelle et du type de système digestif de l'animal ( $\Delta^{13}\text{C}_{\text{os-alimentation}} \approx +9$  à  $+15$  ‰, Tejada-Lara et al., 2018). Ce décalage peut impacter le  $\delta^{13}\text{C}$  du lait maternel, générant ainsi un écart de  $\delta^{13}\text{C}$  entre la nourriture de la mère allaitante et son lait. Toutefois, ce décalage est très variable en fonction des espèces (tantôt positif, négatif ou nul), et semble varier en fonction de la composition

en lipides, protéines et glucides du lait (Jenkins et al., 2001 ; Tsutaya et Yoneda, 2015). En se basant sur cette méthode, il est par conséquent délicat d'identifier des périodes de sevrage dans l'émail dentaire lorsque les espèces étudiées n'ont pas d'analogues actuels proches, ou qu'elles font partie des espèces ne présentant pas de différence de  $\delta^{13}\text{C}$  entre le lait maternel et l'alimentation adulte. Ceci limite donc la portée de cette méthode pour étudier les pratiques d'allaitement et les capacités de lactation des thérapside du Trias et du Permien, malgré le potentiel de préservation du  $\delta^{13}\text{C}$  de l'émail dentaire vis-à-vis de la diagenèse (Wang et Cerling, 1994 ; Koch et al., 1997 ; Zazzo et al., 2004 ; Amiot et al., 2014).

Les isotopes de l'azote fournissent eux aussi des informations sur l'alimentation, le  $\delta^{15}\text{N}$  des tissus ayant tendance à être plus élevé pour les animaux situés haut dans la chaîne alimentaire (DeNiro et Epstein, 1981 ; Minagawa et Wada, 1984 ; Schoeninger et DeNiro, 1984 ; Bocherens et Drucker, 2003 ; LEE-THORP, 2008 ; Britton et al., 2012 ; Jaouen et al., 2019). Ce mécanisme d'enrichissement trophique en isotopes lourds de l'azote est décrit comme une conséquence de l'excrétion d'urines appauvries en  $^{15}\text{N}$  qui augmenteraient le  $\delta^{15}\text{N}$  de l'organisme par rapport au  $\delta^{15}\text{N}$  de l'alimentation ( $\Delta^{15}\text{N}_{\text{os-alimentation}} \approx +2 \text{ à } +6 \text{ ‰}$  ; Ambrose, 1991 ; Balter et al., 2006 ; Hedges et Reynard, 2007 ; Lee-Thorp, 2008 ; Reynard et Tuross, 2015). L'intensité de cet enrichissement dépend cependant des espèces et des environnements étudiés (Ambrose, 1991 ; Balter et al., 2006 ; Hedges et Reynard, 2007 ; LEE-THORP, 2008 ; Reynard et Tuross, 2015). Du côté des pratiques d'allaitement, le  $\delta^{15}\text{N}$  est un outil qui a beaucoup été utilisé pour déterminer des âges de sevrage dans les populations humaines et animales (Richards et al., 2002 ; Balasse et Tresset, 2002 ; Fuller et al., 2003, 2006 ; Tsutaya et Yoneda, 2013). Ces études suggèrent que le lait maternel est enrichi en  $^{15}\text{N}$  par rapport à l'alimentation de la mère, ce qui augmente les valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  des enfants nourris au sein (e.g. environ +2 à 3 ‰ de  $\delta^{15}\text{N}$  dans le collagène de l'os, de la dentine, des ongles et des cheveux), le  $\delta^{15}\text{N}$  rejoignant les valeurs adultes avec le sevrage. Bien que ce décalage mère-enfant soit généralement moins prononcé qu'entre des animaux séparés d'un niveau trophique (LEE-THORP, 2008 ; Tsutaya et Yoneda, 2015), et semble être encore moins marqué en dehors des espèces humaines (Jenkins et al., 2001), le phénomène semble s'observer de manière plutôt généralisée (Jenkins et al., 2001 ; Tsutaya et Yoneda, 2015).

Toutefois, jusqu'à très récemment, l'étude des valeurs de  $\delta^{15}\text{N}$  des tissus fossiles se basait essentiellement sur le collagène des os et de la dentine des dents, le contenu azoté de l'émail et des phases minéralisées de ces tissus étant présents en quantité trop infime (LEE-THORP, 2008 ; Tsutaya et Yoneda, 2015 ; Rinaldi, 2018 ; Kast, 2020 ; Leichliter et al., 2021). Or, ce support organique ne se préserve que rarement au-delà de quelques centaines de milliers d'années (Rinaldi, 2018 ; Kast, 2020 ; Leichliter et al., 2021). Cette limite est toutefois peut-être en passe d'être dépassée avec la mise au point de méthodes permettant d'analyser la fraction azotée de l'émail dentaire (Rinaldi, 2018 ; Kast, 2020 ; Leichliter et al., 2021).

Enfin, à la différence du carbone et de l'azote, les isotopes du soufre fractionnent peu d'un niveau trophique à un autre (i.e.  $\pm 1$  ‰ de différence de  $\delta^{34}\text{S}$  entre proies et prédateurs : González-Martín et al., 2001 ; Richards et al., 2003 ; Tanz et Schmidt, 2010 ; Tsutaya et Yoneda, 2015). En revanche, les différences qui existent au sein des écosystèmes terrestres d'une part (Peterson et Fry, 1987), et entre les écosystèmes terrestres et marins d'autre part (Peterson et Fry, 1987), permettent d'identifier certaines sources spécifiques de nourriture introduites dans l'alimentation au moment du sevrage (Nehlich et al., 2011 ; Howcroft et al., 2012 ; Tsutaya et Yoneda, 2015). Toutefois, la portée de ce système isotopique pour discuter d'allaitement et de sevrage semble se limiter aux cas où les sources alimentaires et leurs valeurs de  $\delta^{34}\text{S}$  sont bien contraintes (généralement pour l'étude de populations humaines). Par ailleurs, l'identification du sevrage ne repose généralement pas directement sur le  $\delta^{34}\text{S}$  (recours au  $\delta^{13}\text{C}$  et au  $\delta^{15}\text{N}$  par exemple). Enfin, à l'instar du  $\delta^{15}\text{N}$ , l'étude du  $\delta^{34}\text{S}$  se base généralement sur le collagène de l'os et de la dentine (Nehlich et al., 2011 ; Howcroft et al., 2012 ; Tsutaya et Yoneda, 2015). Ceci a pour effet de limiter la portée temporelle de cet outil, bien que des études récentes suggèrent que la composition isotopique du soufre pourrait se préserver durant plusieurs centaines de millions d'années, par l'intermédiaire de sulfates substitués aux phosphates de l'apatite (Goedert et al., 2018).

En conclusion, si l'étude des systèmes isotopiques traditionnels ( $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{34}\text{S}$ ) permet de fournir des informations intéressantes quant à l'existence et la durée des périodes d'allaitement et de sevrage, ce type d'étude est limité lorsque la question porte sur des périodes dépassant le cadre du Cénozoïque et des espèces mammaliennes de cette époque (informations synthétisées dans le tableau I.1). En effet, que ce soit à cause du faible potentiel de préservation des molécules portant certains de ces éléments (e.g. collagène de l'os), ou du fait de la faible sensibilité de certains de ces systèmes

**Tableau I.1 – Principes et limites des principaux proxys (hors isotopes du calcium) permettant de documenter des comportements d'allaitement chez des espèces fossiles.** Les supports d'analyses notés entre parenthèse constituent des supports possibles mais encore peu documentés. 1 : fait référence à la fraction minérale des tissus (apatite). **Concepts and limits of main proxies (excluding Ca isotopes) allowing to document nursing behaviors in fossil species.** Analytical supports in brackets indicate possible but uncommon supports. 1: referring to the apatite fraction of the tissue.

	Sr/Ca & Ba/Ca	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{34}\text{S}$
<b>Common analytical supports</b>	- Enamel <sup>1</sup> - Dentine <sup>1</sup> - Bone <sup>1</sup>	- Enamel <sup>1</sup> - Dentine <sup>1</sup> - Bone <sup>1</sup>	- Enamel <sup>1</sup> - Dentine <sup>1</sup> - Bone <sup>1</sup> - Collagen - Keratin	- Collagen - Keratin - (enamel, dentine, bone) <sup>1</sup>	- Collagen - Keratin - (enamel, dentine, bone) <sup>1</sup>
<b>Main information</b>	- Trophic	- Temperature - Precipitations - Thermo-physiology	- Trophic	- Trophic	- Trophic - Marine setting
	- Breastfed and weaning periods	- Breastfed and weaning periods	- Breastfed and weaning periods	- Breastfed and weaning periods	- Consumption of certain weaning food
<b>Main limits for the study of ancient lactations</b>	- Sensitive to many diagenetic processes - Variable reactions to nursing and weaning depending of the species - Require enamel formed during breastfed and weaning periods	- Weakly sensitive to nursing and weaning - Require enamel formed during breastfed and weaning periods	- Highly variable reactions to nursing and weaning depending of the species - Require enamel formed during breastfed and weaning periods	- Commonly rely on tissues and molecules which are rarely preserved beyond few hundreds of thousand years	- Commonly rely on tissues and molecules which are rarely preserved beyond few hundreds of thousand years - Allows to identify weaning only if associated with the consumption of specific food items (e.g. fish consumption)

isotopiques aux effets de l'allaitement (e.g.  $\delta^{18}\text{O}$  et  $\delta^{34}\text{S}$ ), l'étude des pratiques de lactation des mammifères basaux ou des thérapsides non-mammaliens semble demeurer hors de portée de ces outils. En outre, un autre point problématique vient de la nature de l'information fournie par ces systèmes. En effet, identifier des périodes d'allaitement et de sevrage avec ces outils implique de disposer d'un tissu qui a minéralisé à cette période et qui ne s'est pas ou peu reminéralisé depuis. En tenant compte de la diagenèse qui pousse à privilégier l'émail plutôt que l'os ou la dentine, il est donc nécessaire de disposer de dents minéralisant avant et après le sevrage qui seraient conservées jusqu'à la mort de l'individu (e.g. dents définitives minéralisant aux étapes clés, individus morts précocement). Une autre solution serait de disposer de spécimens de plusieurs tranches d'âge et possédant des dents minéralisant à différentes étapes de l'allaitement et du sevrage. Ces conditions sont difficiles à remplir, d'autant plus pour des animaux avec des âges de minéralisation dentaire souvent peu documentés, caractérisés par des renouvellements dentaires parfois polyphyodontes (les dents de la plupart des thérapsides non-mammaliens se remplaçaient de multiples fois au cours de leur vie), et dans un contexte où établir des classes d'âge pour des spécimens fossiles est délicat (il est parfois difficile de faire la distinction entre des spécimens d'espèces proches mais de tailles différentes et des spécimens de même espèce mais d'âges différents). Ceci pousse à envisager d'autres méthodes, notamment des méthodes qui permettraient de s'affranchir des tissus minéralisant aux stades juvéniles pour réaliser les analyses.

#### 4. Applications des isotopes du Ca

Vers la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, la mise au point de nouveaux spectromètres adaptés à l'étude des isotopes non-traditionnels a créé de nouvelles perspectives d'études. Parmi ces isotopes non-traditionnels, les isotopes stables du Ca ont reçu une attention grandissante depuis la deuxième moitié des années 90, à mesure de l'ouverture de nouveaux champs d'investigations autour de cet élément (voir reviews par : Gussone et al., 2016 ; Martin et al., 2017b ; Tacail et al., 2020). Tout d'abord considéré principalement dans les domaines de la géologie et des paléo-environnements, un champ de recherche qui demeure toujours l'un des plus actifs concernant les isotopes du Ca (Russell et al., 1978 ; Marshall

et DePaolo, 1989 ; Skulan et al., 1997 ; Farkaš et al., 2007 ; Simon et al., 2009 ; Payne et al., 2010 ; Blättler et al., 2011 ; Hinojosa et al., 2012 ; Fantle et Tipper, 2014 ; Brazier et al., 2015 ; Gussone et al., 2016, 2020 ; Oelkers et al., 2019 ; Akhtar et al., 2020 ; Druhan et al., 2020 ; Griffith et al., 2020 ; Zhu et al., 2020a, b ; Brown et al., 2020), l'étude de la composition isotopique du Ca de matériaux biologiques a ouvert la voie à de nouvelles applications : en archéologie (Chu et al., 2006 ; Reynard et al., 2010, 2013 ; Wright, 2014 ; Tacail et al., 2017, 2019 ; Martin et al., 2020 ; Tacail et al., 2020 ; Li et al., 2020), en paléoécologie (Clementz et al., 2003 ; Reynard et al., 2010 ; Clementz, 2012 ; Melin et al., 2014 ; Martin et al., 2015, 2017b, a, 2018, 2020 ; Hassler et al., 2018 ; Balter et al., 2019 ; Tacail et al., 2020) et dans le biomédical (Moser-Veillon et al., 2001 ; Skulan et al., 2007 ; Hirata et al., 2008 ; Heuser et Eisenhauer, 2010 ; Morgan et al., 2012 ; Channon et al., 2015 ; Heuser, 2016 ; Eisenhauer et al., 2019 ; Heuser et al., 2019 ; Mahan et al., 2020 ; Tacail et al., 2020 ; Shroff et al., 2020, 2021).

Le calcium (Ca) existe sous la forme de six isotopes stables ou substables (i.e. radioactifs à demi-vie très longue). Environ 96,941 % du Ca retrouvé sur Terre est sous forme de calcium 40 ( $^{40}\text{Ca}$ ), tandis que le calcium 46 ( $^{46}\text{Ca}$ ), le plus rare parmi ces six, ne constitue que 0,004 % du Ca terrestre environ (Table I.2). Traditionnellement, les changements de composition isotopique du Ca sont étudiés à la lumière des rapports  $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$  ou  $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$ . Les fractionnements isotopiques gouvernant les changements de ces rapports dans la nature étant jusqu'à présent décrits comme dépendants de la masse (Gussone et

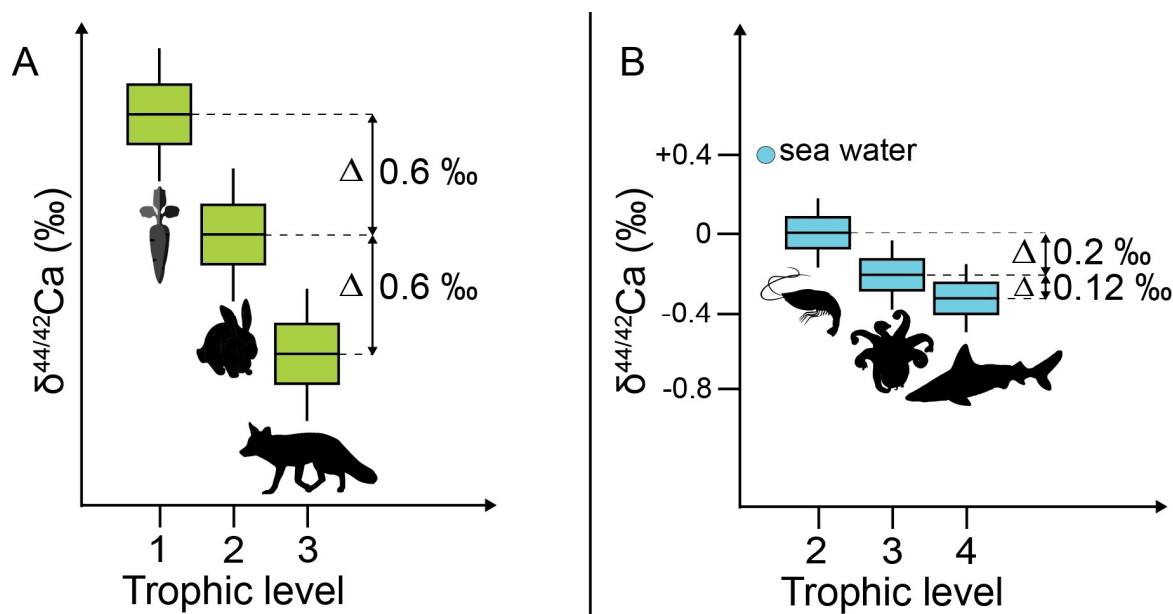
**Tableau I.2 – Isotopes stables ou substables du Ca.** Les isotopes marqués d'un astérisque (\*) sont instables en théorie, mais leur taux de désintégration spontanée est si faible que le phénomène n'a pas encore été quantifié (Arnold et al., 2016 ; Gussone et al., 2016 ; Meija et al., 2016). **Stable and substable Ca isotopes.** Isotopes marked with a star (\*) are theoretically unstable but with such a low decay rate that it hasn't been quantified yet (Arnold et al., 2016 ; Gussone et al., 2016 ; Meija et al., 2016)

	$^{40}\text{Ca}$	$^{42}\text{Ca}$	$^{43}\text{Ca}$	$^{44}\text{Ca}$	$^{46}\text{Ca}$	$^{48}\text{Ca}$
<b>Natural abundances (%)</b>	96.941	0.647	0.135	2.086	0.004	0.187
<b>Atomic mass (u.m.a)</b>	39.96259	41.95861	42.95876	43.95548	45.95368	47.95252
<b>Half-life (year)</b>	stable*	stable	stable	stable	stable*	$6.4 \times 10^{19}$

al., 2016), ces deux rapports renseignent la même information. Toutefois, comme l'écart de masse entre le  $^{44}\text{Ca}$  et le  $^{42}\text{Ca}$  est environ 2,048 fois plus petit qu'entre le  $^{44}\text{Ca}$  et le  $^{40}\text{Ca}$ , le  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  sera lui aussi 2,048 fois plus petit que le  $\delta^{44/40}\text{Ca}$  (pour un même standard isotopique de référence). La cohabitation entre  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  et  $\delta^{44/40}\text{Ca}$  dans la littérature (notés  $\delta^{44}\text{Ca}$  lorsque considérés ensembles) découle essentiellement de l'utilisation de différents types de spectromètres. Les études mentionnant des données de  $\delta^{44/40}\text{Ca}$  emploient généralement des spectromètres de masse à ionisation thermique (communément appelés TIMS). Comme les différences d'abondance entre isotopes lourds et légers du Ca sont amplifiées avec le  $\delta^{44/40}\text{Ca}$  par rapport au  $\delta^{44/42}\text{Ca}$ , ce type d'analyse est en théorie plus fine pour décrire les compositions isotopiques du Ca. En revanche, cette méthode est généralement beaucoup plus chronophage que certaines autres méthodes disponibles pour mesurer des valeurs de  $\delta^{44}\text{Ca}$ , raison pour laquelle les mesures de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  peuvent être privilégiées. Les études basées sur des données de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  emploient généralement des spectromètres de masse à plasma à couplage inductif et multi-collecteur pour leurs mesures (plus communément appelés MC-ICP-MS), une méthode généralement moins chronophage que les analyses par TIMS pour leur préparation et leur réalisation. Cependant, ces instruments employant généralement de l'argon ( $^{40}\text{Ar}$ ) pour servir de base au plasma et de vecteur pour l'échantillon analysé, l'interférence sur la masse 40 empêche les mesures sur le  $^{40}\text{Ca}$  à moins d'avoir recours à des méthodes empêchant l'argon de parvenir jusqu'aux détecteurs (e.g. chambre de collision ; Li et al., 2016). Ce type d'instrumentation étant relativement récent sur le marché, il est probable que la littérature continue d'associer des données de  $\delta^{44/40}\text{Ca}$  et de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  dans un avenir à moyen terme (ce qui n'est pas un problème majeur dans la mesure où ces deux types de données peuvent être convertis facilement de l'un vers l'autre pour être comparés).

L'observation de différences de composition isotopique du Ca entre organismes et tissus a ouvert la voie à plusieurs champs d'applications dans le domaine de la paléobiologie. A l'instar du  $\delta^{13}\text{C}$  et du  $\delta^{15}\text{N}$ , on observe un décalage entre les valeurs de  $\delta^{44}\text{Ca}$  des os et de l'alimentation des animaux étudiés, et ce pour une large gamme d'espèces de vertébrés incluant des poissons, oiseaux, artiodactyles, rongeurs et pinnipèdes (Skulan et DePaolo, 1999 ; DePaolo, 2004 ; Chu et al., 2006 ; Reynard et al., 2010 ; Heuser et al., 2011, 2016b). A l'inverse du  $\delta^{13}\text{C}$  et du  $\delta^{15}\text{N}$  cependant, le

consommateur est systématiquement appauvri en isotopes lourds du Ca et présente donc des valeurs de  $\delta^{44}\text{Ca}$  plus basses que son alimentation ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{os-alimentation}}$  de  $-0,57 \pm 0,10 \text{ ‰}$  en moyenne ; synthèse par Tacail et al., 2020). Ce décalage isotopique s'exprime aussi entre l'alimentation et l'émail dentaire du consommateur (Martin et al., 2017b, 2018), et a la particularité d'être d'amplitude relativement similaire entre les différentes espèces de vertébrés étudiées jusqu'ici (Skulan et DePaolo, 1999 ;



**Figure 1.6 – Modèle théorique simplifié des fractionnements isotopiques du Ca le long des chaînes alimentaires terrestres (A) et marines (B).** Niveaux trophiques : (1) producteur primaire, (2) consommateur primaire, (3) consommateur secondaire et (4) consommateur tertiaire. Dans ce modèle, le  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{os-alimentation}}$  a été arrondi à  $-0,6 \text{ ‰}$  (Tacail et al., 2020) et chaque organisme de niveau trophique  $>1$  se nourrit exclusivement à partir de l'organisme situé au niveau trophique précédent. En A, les animaux tirent 100 % de leur Ca de leur alimentation, en B les animaux tirent 60 % de leur Ca de leur alimentation et 40 % de l'eau de mer. Le  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'eau de mer a été fixé à  $0,4 \text{ ‰}$  pour se rapprocher des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  publiées (Martin et al., 2015). Le  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de la crevette a été fixé arbitrairement à  $0 \text{ ‰}$  afin de correspondre aux données recueillies sur les invertébrés marins (Blättler et al., 2011 ; Martin et al., 2015) et de simplifier les estimations pour les niveaux trophiques supérieurs. Cette figure a pour but de présenter les cas théoriques les plus simples des changements  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  dans les écosystèmes. En réalité, les observations réalisées dans les faunes sauvages sont bien plus complexes que ce que suggèrent ces deux modèles simplistes (e.g. mélange de plusieurs sources alimentaires, variabilité des compositions isotopiques au niveau trophique 1 qui se propage dans la chaîne alimentaire ; Melin et al., 2014 ; Martin et al., 2015, 2017a, 2018 ; Dodat et al., 2021). **Simplified theoretical model of Ca isotopic fractionations along terrestrial (A) and marine food chains (B).** Trophic levels: (1) primary producer, (2) primary consumer, (3) secondary consumer and (4) tertiary consumer. In this model, the  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{os-alimentation}}$  offset is rounded to  $-0.6 \text{ ‰}$  (Tacail et al., 2020) and each organism with a trophic level higher than 1 feeds exclusively on the organism which precedes. In A, animals take their Ca exclusively from their diet. In B, animals take 60 % of their Ca intakes from their diet and 40 % from sea water. The sea water  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value has been fixed to  $0.4 \text{ ‰}$  to match published  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  values of sea water (Martin et al., 2015). The shrimp  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value has been arbitrary fixed to  $0 \text{ ‰}$  to match published data on marine invertebrates (Blättler et al., 2011 ; Martin et al., 2015) and to simplify the estimations for higher trophic levels. The aim of this figure is to present the simplest theoretical cases of Ca isotopic fractionation in ecosystems. In reality, observations in wild faunas are a lot more complex than these two simplistic models (e.g. mixing of different diet sources, isotopic variability within primary producers which propagate in food chains ; Melin et al., 2014 ; Martin et al., 2015, 2017a, 2018 ; Dodat et al., 2021).



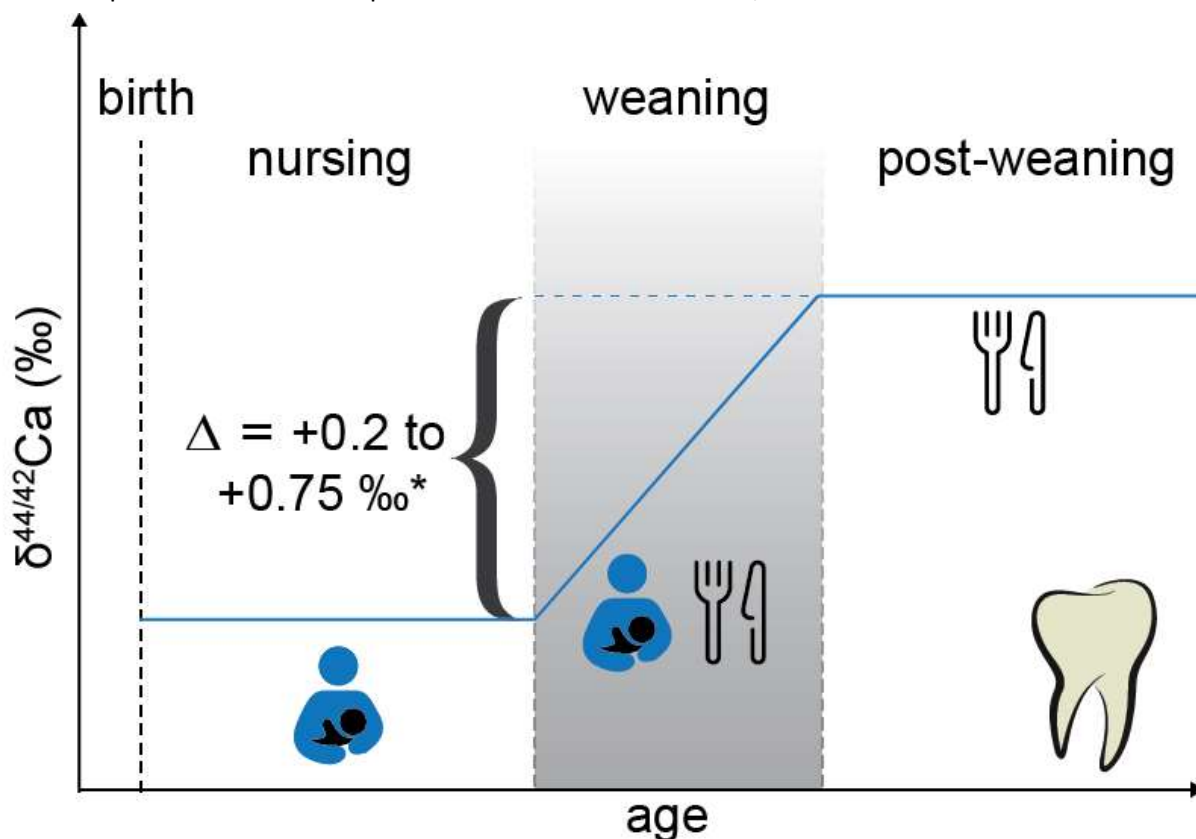
DePaolo, 2004 ; Chu et al., 2006 ; Reynard et al., 2010 ; Heuser et al., 2011, 2016b). Dans la mesure où la nourriture constitue la source principale d'apport en Ca chez les vertébrés, ce décalage entre alimentation et tissus du consommateur se propage dans la chaîne alimentaire (figure I.6A ; Clementz et al., 2003 ; Clementz, 2012 ; Martin et al., 2015, 2017a, b, 2018, 2020 ; Hassler et al., 2018 ; Balter et al., 2019 ; Tacaïl et al., 2020 ; Dodat et al., 2021), bien que le Ca de l'eau de mer puisse jouer un rôle tampon entre niveaux trophiques dans le milieu marin (figure I.6B ; Martin et al., 2015). En outre, le Ca présente l'avantage de pouvoir préserver durablement sa composition isotopique dans l'émail dentaire (depuis des âges mésozoïques voire au-delà : Heuser et al., 2011 ; Martin et al., 2017a, b ; Hassler et al., 2018), notamment du fait de sa forte concentration initiale dans l'émail (*in vivo* le Ca représente environ 40 % de la masse de l'émail). Cette forte concentration en Ca (bien plus élevée que les concentrations en Ca des fluides qui peuvent circuler dans les sédiments) permet de limiter la sensibilité du  $\delta^{44}\text{Ca}$  à la diagenèse en dehors du cadre de minéralisations secondaires, de reminéralisations ou de substitutions massives du Ca de l'émail par du Ca exogène (Heuser et al., 2011 ; Martin et al., 2017b). Cette forte concentration permet par ailleurs de limiter les quantités de matière à prélever pour réaliser des analyses (au minimum 100  $\mu\text{g}$  d'émail), ce qui place les prélèvements pour les analyses de composition isotopique du Ca parmi les méthodes d'analyse de composition isotopique les moins destructives (Martin et al., 2017b). L'utilisation du  $\delta^{44}\text{Ca}$  de l'émail comme proxy alimentaire demeure toutefois un domaine encore très exploratoire, avec des observations rapportant des décalages entre niveau trophique (i.e. place dans la chaîne alimentaire) et valeurs de  $\delta^{44}\text{Ca}$  de l'émail ou de l'os (Reynard et al., 2010 ; Martin et al., 2017b, 2018 ; Dodat et al., 2021), ou bien des valeurs de  $\delta^{44}\text{Ca}$  qui ne permettent pas d'obtenir d'informations trophiques détaillées pour certaines niches écologiques (Reynard et al., 2010 ; Melin et al., 2014). Pour avancer dans ce domaine, il convient de mieux documenter les signaux environnementaux, comportementaux et physiologiques affectant secondairement le  $\delta^{44}\text{Ca}$  de l'émail en parallèle des différentes sources alimentaires.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le décalage entre le  $\delta^{44}\text{Ca}$  des os et de l'alimentation. La première postule que la minéralisation des os fixe préférentiellement le Ca léger contenu dans le sang (Skulan et DePaolo, 1999 ; DePaolo, 2004 ; Chu et al., 2006 ; Reynard et al., 2010

; Heuser et al., 2011, 2016b). Plus récemment, il a aussi été montré que la réabsorption du Ca depuis les urines primaires par le rein réintérait préférentiellement du Ca léger dans le sang (Heuser et Eisenhauer, 2010 ; Morgan et al., 2012 ; Tacail et al., 2014 ; Channon et al., 2015 ; Heuser et al., 2016b, 2019). Ce phénomène génère des urines aux valeurs de  $\delta^{44}\text{Ca}$  élevées et abaisse les valeurs de  $\delta^{44}\text{Ca}$  du sang, ainsi que des os et des dents qui minéralisent à partir de ce dernier ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{urine-sang}} = +1,15 \pm 0,06 \text{ ‰}$ ,  $n = 29$  ; Morgan et al., 2012 ; Channon et al., 2015 ; Heuser et al., 2016 ; Tacail, 2017). De ces deux phénomènes, le fractionnement isotopique à la minéralisation de l'os a longtemps été perçu comme la cause principale des différences de  $\delta^{44}\text{Ca}$  entre alimentation et os (Skulan et DePaolo, 1999 ; DePaolo, 2004 ; Chu et al., 2006 ; Reynard et al., 2010 ; Heuser et al., 2011, 2016b). Cependant, les dernières données d'expérimentation et de modélisation sur le sujet semblent montrer que ce phénomène est secondaire au regard de l'enrichissement du sang en isotopes légers du Ca qui a lieu dans le rein (Tacail, 2017 ; Tacail et al., 2020).

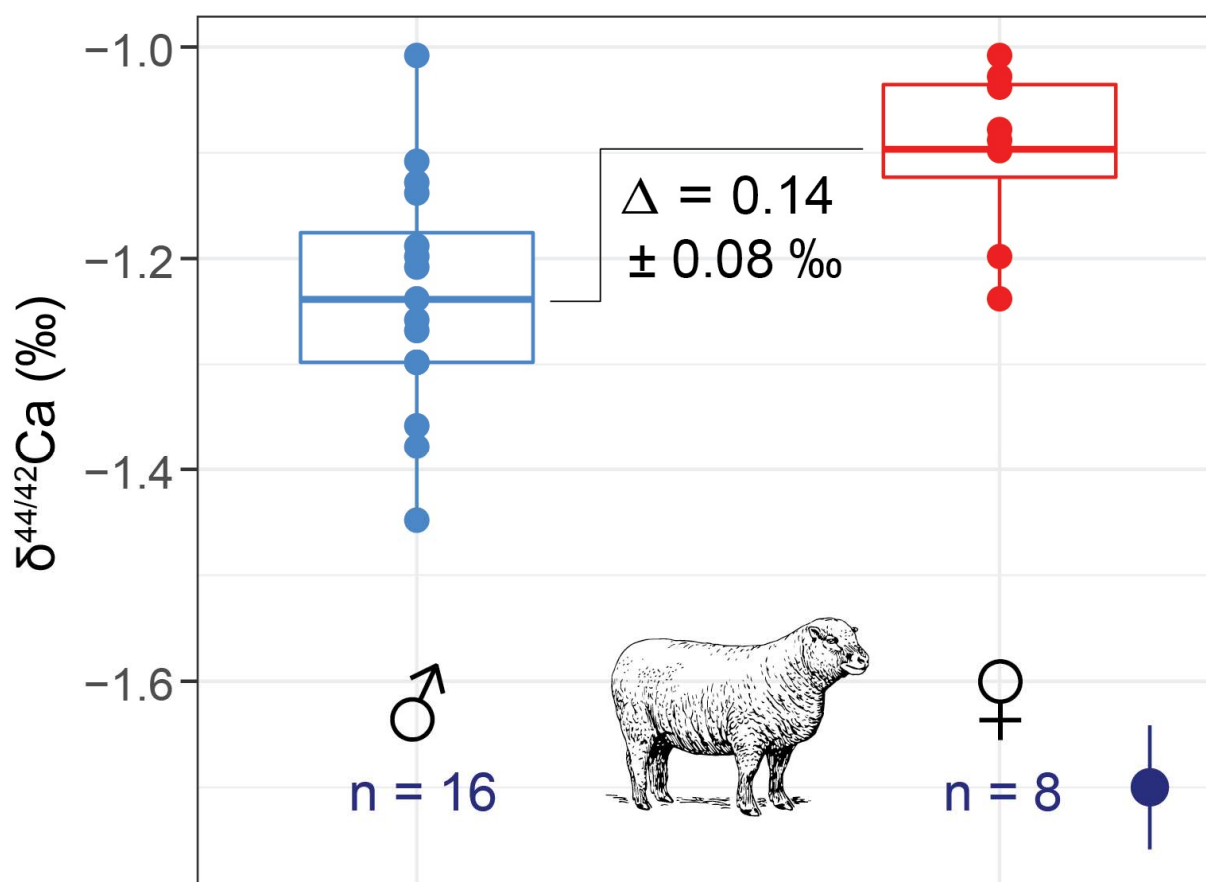
Les isotopes du Ca permettent aussi d'obtenir des informations sur les pratiques d'allaitement à partir des ossements et des dents. A l'instar du Sr/Ca, du Ba/Ca et du  $\delta^{15}\text{N}$ , les valeurs de  $\delta^{44}\text{Ca}$  de l'émail dentaire permettent de contribuer à l'identification de périodes de consommation de lait maternel et d'âges de sevrage (Wright, 2014 ; Tacail, 2017 ; Tacail et al., 2017, 2019 ; Li et al., 2020). En effet, le lait des mammifères étant appauvri en isotopes lourds du Ca par rapport à leur alimentation ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{lait-alimentation}} \approx -0,5 \text{ à } -0,6 \text{ ‰}$  ; Chu et al., 2006 ; Heuser, 2016 ; Tacail, 2017), les juvéniles allaités pendant plusieurs mois après la naissance présentent une transition de l'ordre de  $+0,2 \text{ à } +0,75 \text{ ‰}$  des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'émail dentaire, entre l'émail minéralisant pendant l'allaitement et l'émail minéralisant après le sevrage (figure I.7, Wright, 2014 ; Tacail, 2017 ; Tacail et al., 2017, 2019 ; Li et al., 2020). Il faut cependant noter que la distinction entre la consommation de lait maternel et de produits laitiers d'autres animaux peut s'avérer difficile sur la base des seules données de  $\delta^{44}\text{Ca}$  (Chu et al., 2006 ; Reynard et al., 2010 ; Li et al., 2020), et que cette transition isotopique entre allaitement et période post-sevrage n'est pas observée en comparant les os d'individus d'âges juvéniles et adultes (Reynard et al., 2010, 2013).

Outre ces changements isotopiques liés à l'alimentation, la composition en isotopes du Ca des tissus minéralisés est également affectée par des facteurs d'ordre physiologique. Ce constat est notamment porté par la détection de différences de composition isotopique du Ca de l'os entre mâles et femelles d'un même troupeau de moutons domestiques (figure I.8 ; Reynard et al., 2010). Dans cette étude, il est proposé que la minéralisation accrue d'os pendant la gestation, ou bien la production de lait par les femelles durant l'allaitement, sont susceptibles d'être à l'origine de ces différences isotopiques entre mâles et femelles. Si cette deuxième hypothèse se confirmait, ces différences entre mâles et femelles au sein d'une même population pourraient donc constituer un nouveau moyen d'identifier des populations animales capables d'allaiter leurs petits. Plusieurs obstacles restent cependant à franchir pour faire de cette option une réalité. Tout d'abord, il est nécessaire de déterminer si la



**Figure 1.7 – Changements postpartum de composition isotopique du Ca de l'émail dentaire des mammifères juvéniles.** \* : Le plus souvent, la différence de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  entre l'émail qui minéralise pendant l'allaitement et l'émail qui minéralise après le sevrage est de l'ordre de +0,2 à +0,75 ‰ en fonction des individus (Wright, 2014 ; Tacail et al., 2017, 2019 ; Li et al., 2020). En pratique, il est souvent nécessaire de combiner les données de plusieurs dents minéralisant à des moments différents pour pouvoir reconstituer la totalité de la période qui sépare la naissance du sevrage. **Postnatal changes in enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values for juvenile mammals.** \* : Depending of the individuals, the difference of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value between the enamel mineralizing during nursing and the enamel mineralizing after weaning is commonly within the range of +0.2 to +0.75 ‰ (Wright, 2014 ; Tacail et al., 2017, 2019 ; Li et al., 2020). In practice, it is common to rely on several teeth mineralizing at different ages in order to be able to obtain a complete record of enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values from birth to weaning.

lactation est bien à l'origine de ces différences isotopiques entre mâles et femelles et quels sont les facteurs pouvant moduler ces différences. De plus, il est nécessaire de documenter l'existence ou l'absence de ces différences isotopiques chez d'autres espèces de mammifères que le mouton domestique. En effet, pour que ce type d'observation puisse être un marqueur efficace de la possession ou de l'absence de capacités de lactation, il est nécessaire que les différences de composition isotopiques du Ca entre mâles et femelles puissent être observables chez une large gamme d'espèces de mammifères à l'écologie et à l'histoire évolutive différentes.



**Figure I.8 – Différences inter-sexes de composition isotopique du Ca de l'os chez le mouton.** Les données présentées ici sont exprimées en  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$ , converties d'après les données de  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{SRM915a}}$  de l'étude de Reynard et al. en 2010. Cette conversion suit les recommandations de l'étude de Martin et al. 2018 tel que décrit en section I.C.2. Mâles et femelles de cette population de moutons ont des compositions isotopiques du Ca proches, qui se recoupent en partie, mais les femelles sont en moyenne significativement plus enrichies en isotopes lourds du Ca par rapport aux mâles, de l'ordre de de  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{femelles-mâles}} = +0,14 \pm 0,08 \text{ ‰}$ . Le marqueur bleu et les barres d'erreur en bas à droite du graphique indiquent le 2SD moyen des mesures ayant été répliquées à  $n = 2$  ou plus. **Inter-sex differences in bone Ca isotopic compositions in a sheep population.** Data presented here are expressed as  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$ , converted from the  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{SRM915a}}$  data of Reynard et al. 2010. This data conversion is based on the study of Martin et al. 2018, such as described in section I.C.2. Males and females from this population share overlapping bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values, but females remain more enriched in heavy Ca isotopes than males in average:  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{females-male}} = +0.14 \pm 0.08 \text{ ‰}$ . The blue dot and error bars in the bottom right of the graph indicate the mean 2SD of measures which have been replicated to  $n = 2$  or more.

## *D. Résumé de problématique et plan de thèse*

L'histoire évolutive des mammifères et des thérapsides non-mammaliens qui les ont précédés est riche et complexe. Dans cette histoire, la lactation et les comportements qui en découlent ont vraisemblablement joué un rôle de premier plan, mais dans des modalités qui restent encore à préciser.

Comme détaillé dans les sections précédentes, la finalité de cette thèse est la mise au point d'une méthode permettant de déterminer si des espèces fossiles étaient capables de produire du lait, le but étant de pouvoir décrire finement l'apparition et l'évolution de la lactation au cours de l'histoire de la vie. Pour ce faire, nous avons décidé de porter notre attention sur les opportunités offertes par la géochimie, en particulier sur les perspectives portées par l'étude des compositions isotopiques du Ca dans les tissus biologiques. En effet, le fonctionnement du cycle isotopique du Ca dans l'organisme, et le potentiel de préservation de la composition isotopique de cet élément dans l'émail dentaire au cours du temps, présentent des perspectives intéressantes pour le développement d'un outil de détection d'évènements passés de lactations. A la différence d'autres méthodes géochimiques envisageables pour étudier cette question, les isotopes du Ca semblent pouvoir fournir des informations à la fois sur la consommation de lait par les juvéniles et sur la production de lait par les adultes, un atout décisif pour mener des investigations dans un registre fossile où la détermination de tranches d'âges et de l'obtention de tissus d'origine juvénile est complexe. Au regard des hypothèses dominantes sur l'évolution de la lactation et des fonctions que les formes de lactation primitives (i.e. protolactation) ont pu remplir, il est important de préciser que les isotopes du Ca sont uniquement susceptibles de fournir des informations sur l'apparition des fonctions de transport accrue de Ca par les sécrétions mammaires primitives. La portée de cette méthode ne concerne donc que l'origine de cette fonction précise, et l'origine des autres fonctions de la lactation ou des formes de protolactation (e.g. protection antimicrobienne, hydratation... etc.) sont donc hors de portée de la méthode discutée ici.

Aux premiers jours de cette thèse plusieurs questions restaient encore ouvertes quant à la portée réelle de l'utilisation des isotopes du Ca pour étudier la lactation, en particulier en ce qui concerne les effets de la production de lait sur la composition isotopique du Ca des tissus de l'adulte. Dans ce

contexte, la priorité pour aboutir à une méthode opérationnelle de détection d'évènements passés de lactation par l'intermédiaire des isotopes du Ca était : (1) de déterminer quels facteurs physiologiques et comportementaux génèrent et modulent les différences de composition isotopique du Ca entre mâles et femelles de mêmes populations, et (2) de documenter la distribution de ces différences isotopiques mâle/femelle à l'échelle de mammifères éloignés phylogénétiquement et écologiquement, notamment pour pouvoir déterminer la probabilité de retrouver ces signaux isotopiques chez des espèces fossiles à la physiologie et aux comportements divers.

Ma thèse s'est donc articulée selon trois axes principaux. Le premier axe (chapitre II) a visé à améliorer le recul acquis sur la méthode de mesure des compositions isotopiques du Ca des échantillons biologiques et paléontologiques en place au Laboratoire de Géologie de Lyon. Les deux axes suivants ont porté sur la quantification des fractionnements isotopiques du Ca associés à la production du lait chez l'adulte, et sur la caractérisation des différences sexuelles de  $\delta^{44}\text{Ca}$  des os à l'échelle des mammifères actuels (respectivement en chapitres III et IV), la finalité de ces axes étant de poser les bases d'une approche isotopique de détection de la lactation chez les espèces fossiles (discuté en chapitre V).



# Chapitre II - Méthodes de préparation des échantillons et d'analyse

## *A. Extraction et purification du Ca*

### 1. Diversité des méthodes de préparation

Actuellement, il existe une diversité de méthodes permettant de documenter la composition isotopique du Ca de matériaux biologiques et fossiles, et ces méthodes s'accompagnent de presque autant de procédures de préparation des échantillons. Dans la littérature, les échantillons à analyser sont le plus souvent dissous dans une solution acide, avant de subir des étapes de purification permettant de séparer le Ca des éléments pouvant interférer avec les mesures de rapports isotopiques du Ca (e.g. Skulan et al., 1997 ; Skulan et DePaolo, 1999 ; Chu et al., 2006 ; Tacail et al., 2014 ; Martin et al., 2015, 2017, 2018 ; Heuser, 2016 ; Li et al., 2016, 2020 ; Eisenhauer et al., 2019). Les procédures de purification sont diverses, constituées de une à quatre étapes et se basent généralement sur le principe de la chromatographie sur colonne à résine échangeuse d'ions (Skulan et al., 1997 ; Skulan et DePaolo, 1999 ; Heuser et al., 2002 ; Wieser et al., 2004 ; Chu et al., 2006 ; Heuser et al., 2011 ; Morgan et al., 2011 ; Tacail et al., 2014 ; Romaniello et al., 2015 ; Lanping et al., 2018 ; He et al., 2019 ; Bao et al., 2020 ; Grigoryan et al., 2020 ; Guan et al., 2020). Parmi les résines les plus couramment utilisées dans ces protocoles on trouve : l'AG50W-X8 ou X12 (Biorad®) permettant d'isoler le Ca de la plupart des éléments de la matrice minérale ou non minérale de l'échantillon (e.g. K, Mg, Na, P : Wieser et al., 2004 ; Chu et al., 2006 ; Heuser et Eisenhauer, 2008 ; Hirata et al., 2008 ; Morgan et al., 2011 ; Tacail et al., 2014 ; Le Goff et al., 2021), la Sr-spec (Eichrom®) permettant de séparer le Sr du Ca (Chu et al., 2006 ; Morgan et al., 2011 ; Tacail et al., 2014), les résines DGA permettant de faire les deux (Romaniello et al., 2015 ; Li et al., 2018 ; Bao et al., 2020 ; Grigoryan et al., 2020) et l'AG1-X8 (Biorad®), parfois utilisée pour éliminer certains éléments problématiques en forte concentration tel que le Fe



(Tacail et al., 2014). La diversité de ces méthodes s'explique par la diversité des compositions élémentaires des matériaux à analyser (les éléments à dissocier du Ca ne sont pas toujours les mêmes et ne sont pas présents dans les mêmes proportions), par la disponibilité des résines dans les laboratoires (le coût des résines est très variable), par les différentes sensibilités aux interférences des méthodes de spectrométrie utilisées, et par les questions scientifiques qui se posent autour des échantillons (certaines méthodes permettent ainsi d'isoler simultanément plusieurs éléments pour différentes analyses isotopiques : Tacail et al., 2014 ; Lanping et al., 2018 ; Bao et al., 2020 ; Le Goff et al., 2021). Sous certaines conditions, il est possible de se passer de purification, ce qui permet un gain de temps considérable. C'est notamment le cas pour l'analyse de carbonates faiblement concentrés en strontium (He et al., 2019), en recourant à des méthodes limitant la formation de strontium doublement chargé  $Sr^{2+}$  interférant avec la détection de plusieurs isotopes du Ca (Li et al., 2016, 2020), ou lorsque les échantillons sont directement vaporisés par ablation laser (Li et al., 2016 ; Tacail et al., 2016 ; Zhang et al., 2019). Ces méthodes sont toutefois assez peu adaptées à l'étude de panels d'échantillons aux compositions chimiques ou minéralogiques variées. Pour le cas de l'ablation laser par exemple, il est nécessaire d'analyser en parallèle de l'échantillon un matériau de référence à la composition élémentaire et minéralogique très proche de celle des échantillons (i.e. méthode de normalisation par matrix-match : Li et al., 2016 ; Tacail et al., 2016 ; Zhang et al., 2019). Or, ce prérequis est difficile à satisfaire étant donné la diversité des compositions chimiques et minéralogiques des matériaux biologiques et fossiles, ces dernières pouvant notamment changer spatialement à l'échelle des tissus à analyser. En conséquence, ce sont les méthodes impliquant la dissolution des échantillons et leur purification qui ont été privilégiées au cours de cette thèse.

## 2. Réactifs et matériel de laboratoire

Afin de mener à bien les différentes opérations chimiques réalisées au cours de cette thèse, les réactifs suivants ont été utilisés : acide chlorhydrique (HCl) à 10 M (Fisher Scientific®, laboratory reagent grade, redistillé en laboratoire), acide nitrique ( $HNO_3$ ) 15M (Fisher Scientific®, Primar plus®, trace analyses grade, redistillé en laboratoire), eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) stabilisée à 30 % (Fisher Chemical®, suprapur, Hampton, NH, USA). Ces solutions sont parfois diluées à différents degrés pour les besoins des

opérations, dilutions qui se font par ajout d'eau distillée MilliQ (Millipore®, résistivité = 18 MΩ.cm à 25 °C). La mention de ces termes dans les sections suivantes fait référence à ces réactifs. Les consommables de laboratoire utilisés pour les différentes opérations de routine incluent des gants sans poudre en vinyl (Semperlt® 3000001446, Semperguard®) ou nitrile bleu (G10, Kimberly-Clark Professional® 57373, KleenGuard®), des embouts de pipette en polypropylène (epT.I.P.S.®, Eppendorf quality®), ainsi que des flacons et tubes en propylène de différents fournisseurs (e.g. SymaLab®, Teledyne CETAC Technologies®, Falcon®). Enfin, les béchers utilisés pour stocker les échantillons lors des opérations chimiques sont des béchers en téflon (PFA), ou bien des bombes en téflon (PTFE) pour le cas des opérations en micro-ondes haute pression. Les protocoles de nettoyage et de conditionnement de routine du matériel en contact avec les échantillons sont décrits en détail en annexe de (Hassler et al., 2021b). Ils consistent en des rinçages à l'eau MilliQ et des bains d'HNO<sub>3</sub> et/ou d'HCl dilués.

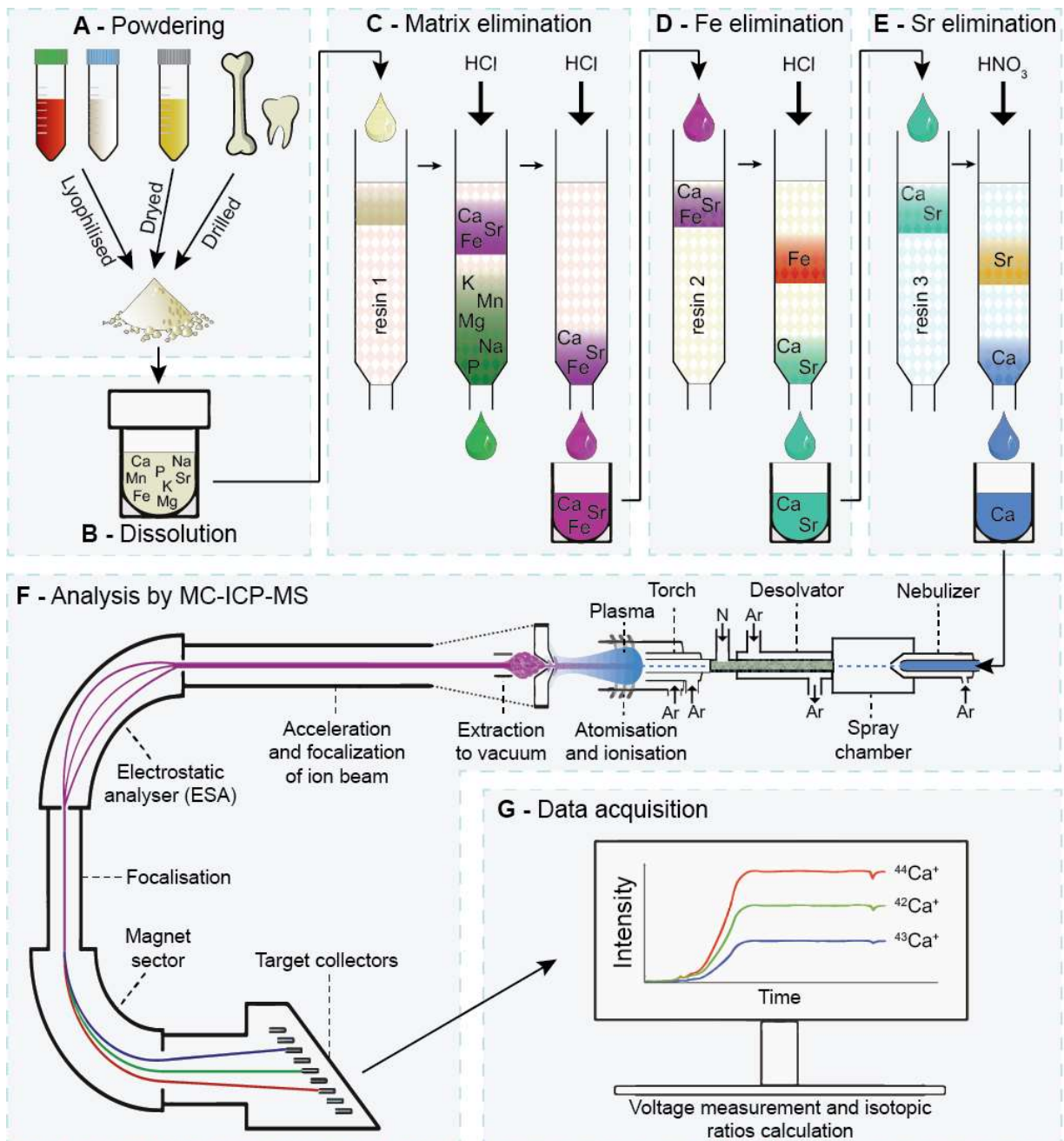
### 3. Dissolution des échantillons et digestion de la matière organique

Cette section décrit les protocoles de préparation des échantillons avant les étapes de chromatographie sur colonne à résine échangeuse d'ion. Après que les échantillons (e.g. sang, lait, urine, os, émail dentaire) aient été réduits en poudre par lyophilisation, séchage ou broyage (figure II.1A), ces derniers sont placés dans un bécher en téflon PFA (figure II.1B). Toutes les opérations chimiques subséquentes ont lieu en salle blanche (atmosphère filtrée), sous sorbonne dans le cas des opérations impliquant des acides concentrés et sous hotte à flux laminaire pour les autres. Les échantillons sous forme de poudre sont dissous (figure II.1B) avec une méthode de dissolution qui varie quelque peu selon la nature de l'échantillon. Pour les échantillons à faible teneur en matière organique (e.g. émail dentaire), les poudres sont dissoutes dans plusieurs millilitres d'HNO<sub>3</sub> à 15 M (1 à 3 ml en fonction des quantités) complétés de 100 µl à 500 µL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %. Ce mélange corrosif à très fort pouvoir oxydant est efficace pour dissoudre les matrices bio-minérales et oxyder la matière organique. Cette préparation est laissée à température ambiante pendant 1h, la surpression des béchers en téflon (générée par les réactions d'oxydation entre l'HNO<sub>3</sub>, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la matière organique) étant limitée par dégazage régulier des béchers sous hotte. La solution est ensuite scellée, placée pendant au moins 12

h sur plaque chauffante de 130 à 160°C, puis évaporée à 70-90°C. La dissolution et la digestion des échantillons à forte teneur en matière organique (e.g. sang, lait, tissus mous) peut s'opérer de deux manières différentes. La première méthode consiste à réitérer plusieurs fois la méthode d'attaque acide décrite pour les échantillons à faible teneur en matière organique en augmentant les volumes de HNO<sub>3</sub> et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (typiquement 5 à 10 ml de HNO<sub>3</sub> pour 0,5 à 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ce protocole peut s'étaler sur plusieurs jours/semaines jusqu'à digestion complète de la matière organique (détectable par une effervescence réduite de l'échantillon en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Une alternative moins chronophage consiste à recourir à un micro-ondes haute pression (Milestone® Ethos® microwave, Sorisole, Italie) après la première séquence d'attaque acide. Les échantillons sont alors dissous dans 4 ml de HNO<sub>3</sub> 15 M, puis placés dans des réservoirs en téflon PTFE auxquels sont ajoutés 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %. Les réservoirs sont scellés et placés dans le micro-ondes afin d'être maintenus à 180°C pendant 40 minutes après une phase de chauffage progressive de 20 minutes. Les solutions ainsi obtenues sont évaporées à 70-90°C sur plaque chauffante, puis passent éventuellement par une nouvelle étape de dissolution sur plaque chauffante si une effervescence importante en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est encore détectée. Les solutions ainsi débarrassées des composants organiques sont évaporées à 70-90°C sur plaque chauffante puis dissoutes dans l'acide adéquat afin d'initier le protocole de purification.

#### 4. Élimination de la matrice

Durant cette thèse, la méthode de purification principale à laquelle j'ai eu recours consiste en deux à trois étapes de chromatographie sur colonne à résine échangeuse d'ions, l'une de ces étapes étant optionnelle et dépendante du contenu en fer des échantillons. Une étape obligatoire consiste à éliminer les éléments de la matrice de l'échantillon (e.g. P, K, Mg, Na dans le cas des os ou de l'émail) par l'intermédiaire d'une élution sur la résine cationique AG50W-X12 (200-400 mesh, Biorad®), dans le but d'extraire une solution contenant essentiellement du Ca, du Sr et éventuellement du Fe (Figure II.1C). Dans le cas des échantillons contenant peu de Ca au regard des autres éléments (e.g. sang, urine, tissus mous), cette étape intervient généralement dans un second temps, après l'élimination du contenu en Fe, Cu et Zn de l'échantillon (section II.A.5). En revanche, pour les échantillons constitués



**Figure II.1 – Synthèse des étapes depuis la collecte des échantillons jusqu'à l'acquisition des données de composition isotopique.** Dans l'ordre, les échantillons sont (A) réduits en poudre, (B) dissous et digérés dans une solution acide, (C) chargés sur une colonne remplie de résine échangeuse d'ions afin d'éliminer les éléments de la matrice par élution, (D) d'éliminer le contenu en Fe, Zn et Cu et (E) de séparer le Ca du Sr. (F) Les solutions de Ca purifiées sont préparées puis injectées dans l'MC-ICP-MS où elles seront nébulisées, séchées, atomisées et ionisées. Le faisceau d'ions résultant est ensuite dirigé par un jeu de lentilles électromagnétiques jusqu'au secteur magnétique, où ce dernier sera divisé en plusieurs faisceaux porteurs d'ions partageant le même rapport masse/charge. Les ions d'intérêt (essentiellement  $^{44}\text{Ca}^+$ ,  $^{43}\text{Ca}^+$ ,  $^{42}\text{Ca}^+$ ) sont interceptés par les détecteurs qui (G) transmettront un signal électrique proportionnel à l'abondance des ions interceptés. Les résines 1, 2 et 3 sont respectivement de l'AG50W-X12 (Biorad®), de l'AG1-X8 (Biorad®) et de la Sr-spec (Eichrom®). Modifié d'après Martin et al., 2017b. **Summary of the different steps from the sample collection to the acquisition of isotopic composition data.** Samples are first (A) powdered, (B) dissolved and digested in acid solution, then (C) loaded on a column filled with ionic exchange resins in order to eliminate matrix elements by elution, (D) to eliminate Fe, Zn and Cu from the solution, (E) to separate the Ca fraction from the Sr fraction. (F) Solutions of purified Ca are conditioned then injected within the MC-ICP-MS system to be nebulized, dried, atomized and ionized. The resulting ion beam is then directed by a set of electromagnetic lenses to the magnetic sector to be divided in different ion beams constituted by ions with the same mass/charge ratio. Ions of interest (essentially  $^{44}\text{Ca}^+$ ,  $^{43}\text{Ca}^+$ ,  $^{42}\text{Ca}^+$ ) are intercepted by the detectors which (G) provide an electric signal proportional to the abundance of intercepted ions. Resins 1, 2 and 3 correspond to AG50W-X12 (Biorad®), AG1-X8 (Biorad®) and Sr-spec (Eichrom®) resins, respectively. Modified from Martin et al., 2017b.

d'une plus grande proportion de Ca (e.g. os et émail) cette étape constitue généralement la première étape du protocole de purification (tel que présenté en figure II.1). Le protocole utilisé varie selon le type d'échantillon traité. Pour les tissus ou les fluides composés de peu de Ca au regard des autres éléments (e.g. sang, urine), les échantillons débarrassés des molécules organiques (voir section précédente) sont dissous dans une solution de 1 ml d'HCl 1 M et injectés au sommet d'une colonne de quartz pur conçue au laboratoire et contenant 2 ml d'AG50W-X12. La solution injectée traverse la résine par gravité et les cations qu'elle contient s'associent plus ou moins fortement à la résine en fonction de l'élément chimique considéré, ainsi que de la nature et de la molarité de l'acide qui traverse la résine. Le protocole d'élution suit celui décrit par Le Goff et al., 2021. La matrice est évacuée par l'injection de 41,5 ml d'HCl 1 M au sommet de la colonne, puis le Ca et le Sr (et potentiellement une fraction de quelques autres éléments tel que le Fe) sont récupérés en ajoutant 10 ml d'HCl 6 M. Cette procédure prend environ une journée complète entre le chargement de l'échantillon et la collecte du Ca, et nécessite environ 12 h supplémentaires pour le lavage et le conditionnement de la résine qui précèdent le chargement. Une procédure aussi longue et impliquant autant de réactifs n'est pas nécessaire si les échantillons contiennent une forte proportion de Ca (e.g. os, émail). Dans ces conditions, une méthode nécessitant moins de réactifs et de temps est privilégiée. Le protocole implique alors l'utilisation d'une colonne en PFA thermo-rétractable conçue au laboratoire et contenant 210  $\mu$ L d'AG50W-X12. Cette procédure est similaire à la troisième étape de purification décrite dans Le Goff et al., 2021. L'échantillon est dissous dans 300  $\mu$ L de 0,4 M HCl puis chargé sur la résine. Une première partie des éléments de la matrice (notamment P, K et Na) est éliminée par l'introduction de 12,7 ml de 0,4 M HCl supplémentaires, puis le Mg et le Mn sont éliminés par l'ajout de 3,5 ml de 1 M HCl. Enfin, la fraction Ca, Sr et une partie de la fraction de Fe sont collectés après l'ajout de 2,5 ml de 6 M HCl. Après élimination de la matrice, la solution contenant le Ca est évaporée (70-90°C sur plaque chauffante) puis resolubilisée dans l'acide servant à l'introduction de l'échantillon dans l'étape suivante du protocole.

## 5. Élimination du Fe, Zn et Cu

Lorsque l'échantillon contient des cations ne générant pas d'interférence isobare mais présents en proportion importante par rapport au Ca (e.g. Fe, Zn, Cu), l'échantillon dissous subit une étape de purification supplémentaire pour éliminer ces éléments (figure II.1D). Passé un certain seuil de proportion par rapport au Ca (voir section II.B.12 pour le Fe), ces éléments sont susceptibles de générer des interférences par effet de matrice lors des mesures de rapport isotopiques du Ca. Cette chromatographie est réalisée dans une colonne en polypropylène (PP columns Biorad®, volume du lit = 2 ml, réservoir = 10 ml) remplie de 1 ou 2 ml de résine AG1-X8 (100-200 mesh, Biorad®). Le protocole suit ceux décrits pour cette résine dans Tacail et al., 2014 et Le Goff et al., 2021. L'échantillon est dissous dans 0,25 à 2 ml de 6 M HCl et chargé sur la résine. Cette solution est récupérée en sortie de colonne, à laquelle s'ajoute 4,25 à 8,75 ml de 6 M HCl chargés sur la résine (le volume variant en fonction du volume chargé et de la quantité de résine). Ceci permet de collecter le Ca et les autres cations encore présents dans la solution, tout en se séparant du Fe, Zn et Cu qui resteront fixés sur la résine avant d'être remobilisés et éliminés par l'ajout de 5 à 10 ml de 0,5 M HNO<sub>3</sub>. Comme évoqué dans la section précédente, cette étape intervient avant l'élimination de la matrice pour les échantillons contenant relativement peu de Ca (e.g. sang, urine), mais intervient après l'élimination de la matrice dans le cas des échantillons contenant une proportion importante de Ca (comme illustré en figure II.1).

## 6. Séparation du Ca et du Sr

Après avoir éliminé les éléments de la matrice, et éventuellement éliminé le Fe, Zn et Cu de l'échantillon, la solution de Ca issue de l'échantillon est susceptible de contenir une quantité importante de Sr. Pour éliminer ce Sr, la solution est évaporée (70-90°C sur plaque chauffante), puis solubilisée dans 300 µl de 3M HNO<sub>3</sub> et chargée sur une colonne en polypropylène (manufacturée à partir d'une pipette pasteur) contenant 200 µl de résine Sr-specific Eichrom® (figure II.1E). Cette solution est récupérée en sortie de colonne, ainsi que les 3,2 ml de 3M HNO<sub>3</sub> injectés pour éluer la totalité du Ca. Le Sr reste quant à lui fixé sur la résine et sera éliminé par l'ajout ultérieur de 4 ml de

0,5 M HNO<sub>3</sub>. La solution de Ca est évaporée (70-90°C sur plaque chauffante) puis dissoute dans 0,5 ml de 15 M HNO<sub>3</sub> et laissée sur plaque chauffante à 130°C pendant 1 h afin d'éliminer les composés organiques traces potentiellement incorporés lors de cette dernière étape de purification. La solution de Ca collectée au terme de cette étape demeure ainsi purifiée de la plupart des éléments susceptibles d'interférer avec les mesures de rapports isotopiques du Ca. Elle est évaporée (70-90°C sur plaque chauffante) puis solubilisée dans 1 à 2 ml de 0,05 M HNO<sub>3</sub> en vue d'être analysée par MC-ICP-MS.

## *B. Analyse des compositions isotopiques du Ca par MC-ICP-MS*

### *1. TIMS versus MC-ICP-MS*

Comme mentionné en introduction (section I.C.3), l'analyse des compositions isotopiques du Ca s'articule principalement autour de deux types de spectromètres : les spectromètres de masse à ionisation thermique (TIMS) et les spectromètres de masse à couplage inductif plasma et multi-collecteur (MC-ICP-MS). Sans rentrer dans le détail des méthodes d'analyses basées sur le TIMS, il est pertinent de mentionner que ces dernières permettent de mesurer des  $\delta^{44/40}\text{Ca}$  grâce à l'absence d'argon 40 dans le système, et qu'elles sont les premières ayant permis de documenter les compositions isotopiques du Ca (Russell et al., 1978 ; Skulan et al., 1997 ; Skulan et DePaolo, 1999). Les méthodes de mesure par MC-ICP-MS permettent quant à elles d'acquérir des données de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  en conservant une précision et une justesse proches des mesures par TIMS (Halicz et al., 1999 ; Wieser et al., 2004 ; Chu et al., 2006 ; Reynard et al., 2010 ; Morgan et al., 2011 ; Tacail et al., 2014 ; Channon et al., 2015 ; He et al., 2019). Lors d'une analyse par MC-ICP-MS, l'échantillon est transporté sous forme de gaz, d'aérosol ou de microgouttelettes vers un plasma d'argon (ce principe est schématisé en figure II.1F). Avec une température de l'ordre de 5 000 à 10 000 K, ce plasma permet d'atomiser (i.e. casser les molécules) et d'ioniser (i.e. charger électriquement) les atomes de l'échantillon. Par rapport à l'ionisation thermique du TIMS, cette méthode permet une ionisation plus rapide et de multiplier jusqu'à dix le nombre d'échantillons analysables dans un même laps de temps (Halicz et al., 1999 ; He et al., 2019). Cette méthode est donc particulièrement adaptée pour traiter des échantillons nombreux, ce qui explique en partie son essor pour l'étude du vivant et des fossiles (Chu et al., 2006 ;

Hirata et al., 2008 ; Reynard et al., 2010 ; Morgan et al., 2011, 2012 ; Reynard et al., 2013 ; Tacail et al., 2014 ; Gordon et al., 2014 ; Channon et al., 2015 ; Martin et al., 2015 ; Li et al., 2016 ; Tacail et al., 2016 ; Martin et al., 2017b ; Tacail, 2017 ; Tacail et al., 2017 ; Martin et al., 2017a, 2018 ; Hassler et al., 2018 ; Eisenhauer et al., 2019 ; Tacail et al., 2019 ; Martin et al., 2020 ; Shroff et al., 2020 ; Dodat et al., 2021 ; Tacail et al., 2021 ; Weber et al., 2021). À précision égale, les mesures de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  induisent une perte de sensibilité par rapport aux mesures de  $\delta^{44/40}\text{Ca}$  ( $\delta^{44/40}\text{Ca} \approx 2,048 \times \delta^{44/42}\text{Ca}$ ). Des méthodes permettant d'obtenir des mesures de  $\delta^{44/40}\text{Ca}$  au moyen d'ICP-MS ont été explorées, avec notamment le recours à un « plasma froid » qui limite la production des ions  $^{40}\text{Ar}^+$  responsables de l'interférence avec le  $^{40}\text{Ca}$  (plasma de 400 W contre plus de 1000 W en général : Fietzke et al., 2004), ou le recours à des cellules de collision ou de réaction permettant de piéger les ions  $^{40}\text{Ar}^+$  en amont des détecteurs (Holland et Bandura, 2005 ; Boulyga et al., 2007 ; Li et al., 2016 ; He et al., 2019 ; Zhao et Simon, 2019). Ces méthodes ne sont pas sans limites (les effets de matrice sont notamment plus variables en configuration « plasma froid » : Fietzke et al., 2004), mais la récente commercialisation d'MC-ICP-MS embarquant une cellule de collision (Sapphire® de Nu®, ou Neoma® de Thermo Fisher Scientific®) et les premières publications sur le sujet (Lewis et al., 2018 ; Zhao et Simon, 2019) suggèrent que les mesures de  $\delta^{44/40}\text{Ca}$  par MC-ICP-MS pourraient se démocratiser à court ou moyen terme. Toutefois, même en l'absence de ce type d'instrumentation, le compromis de disposer de données de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  sans données de  $\delta^{44/40}\text{Ca}$  est généralement acceptable au regard du gain de temps associé, notamment parce que la gamme de variation naturelle des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  est suffisamment large (environ 3 ‰ pour des incertitudes de mesure de l'ordre de  $\pm 0,1$  ‰ ou moins, Tacail et al., 2020). Dans ce contexte et étant donné le nombre et la diversité des échantillons analysés au cours de ma thèse (os, émail, urine, sang, lait... etc.), il était naturel de se tourner vers les méthodes d'analyse par MC-ICP-MS.

## 2. Introduction de l'échantillon

Le spectromètre sur lequel j'ai réalisé les mesures de rapports isotopiques du Ca présentées dans cette thèse est un Neptune plus® (Thermo Fisher Scientific®). Le protocole pour réaliser les mesures sur cet instrument dérive de ceux décrits dans (Tacail et al., 2014, 2016). Après purification du Ca (section



II.A), les échantillons sont dilués une première fois dans 1 à 2 ml à 0,05 M de HNO<sub>3</sub>, puis dilués une seconde fois avec ce même acide de manière à créer des solutions dont la concentration en Ca est fixée à 1,25 mg/L. Cette différence par rapport aux 3 mg/L mentionnés dans Tacail et al. (2014) permet d'augmenter le nombre de répliques réalisables par échantillon tout en maintenant les niveaux de pollution environnementale enregistrés durant les sessions d'analyses à des niveaux négligeables (i.e. rapport  $\text{Ca}_{\text{blanc}}/\text{Ca}_{\text{échantillon}} < 10^{-2}$ ). Échantillons, standards et blancs en solution sont injectés à hauteur de 100 à 150 µl/min dans un nébuliseur connecté à un Aridus II® (Cetac®) et alimenté par un flux d'argon de 1 l/min (schématisé en figure II.1F). L'Aridus permet de sécher les microgouttelettes générées par le nébuliseur afin de former des aérosols secs. Ce système opère par l'intermédiaire d'une chambre de pulvérisation (T = 110 °C) et d'un désolvateur (T = 160 °C), dans le but de réduire les interférences liées au solvant (formation d'oxydes notamment). La membrane poreuse du désolvateur permet de finaliser le séchage des aérosols grâce à un flux d'argon externe (6 à 10 l/min) circulant à contre-sens du flux d'argon portant les aérosols issus de l'échantillon (figure II.1F). De l'azote (N) est injecté au mélange aérosol/argon (5 à 15 ml/min) avant l'injection de ce mélange dans le plasma, afin de stabiliser ce dernier (figure II.1F). Le tout est injecté dans une torche à plasma avec débit d'environ 1 l/min d'argon, torche qui a pour rôle d'alimenter et de contenir le plasma avec un flux d'argon auxiliaire de 0,7 l/min et un flux d'argon de refroidissement de 15 l/min. Par l'intermédiaire d'un champ magnétique généré par une bobine, le plasma est maintenu à une puissance d'environ 1200 W pour assurer l'atomisation et l'ionisation des aérosols qui le traversent. Le faisceau d'ions ainsi formé est dirigé vers un premier cône de nickel appelé cône échantillonneur qui limite le passage des atomes en dehors des ions du faisceau. La position de la torche selon les axes X, Y et Z est variable car optimisée avec l'alignement des cônes au début de la session d'analyse, puis au cours de celle-ci en cas de baisse de transmission ou de stabilité (Z est maintenu à une position supérieure à -3 mm pour éviter tout dommage causé par le plasma à l'instrumentation). Le cône échantillonneur fait l'interface avec une zone de vide partiel entretenu par une pompe à vide. Celle-ci évacue l'essentiel des atomes non-ionisés ou chargés négativement. Les ions chargés positivement (notamment le Ca<sup>+</sup> qui nous intéresse) sont extraits de ce milieu par l'intermédiaire d'un second cône de nickel dit « écrêteur » et d'une lentille

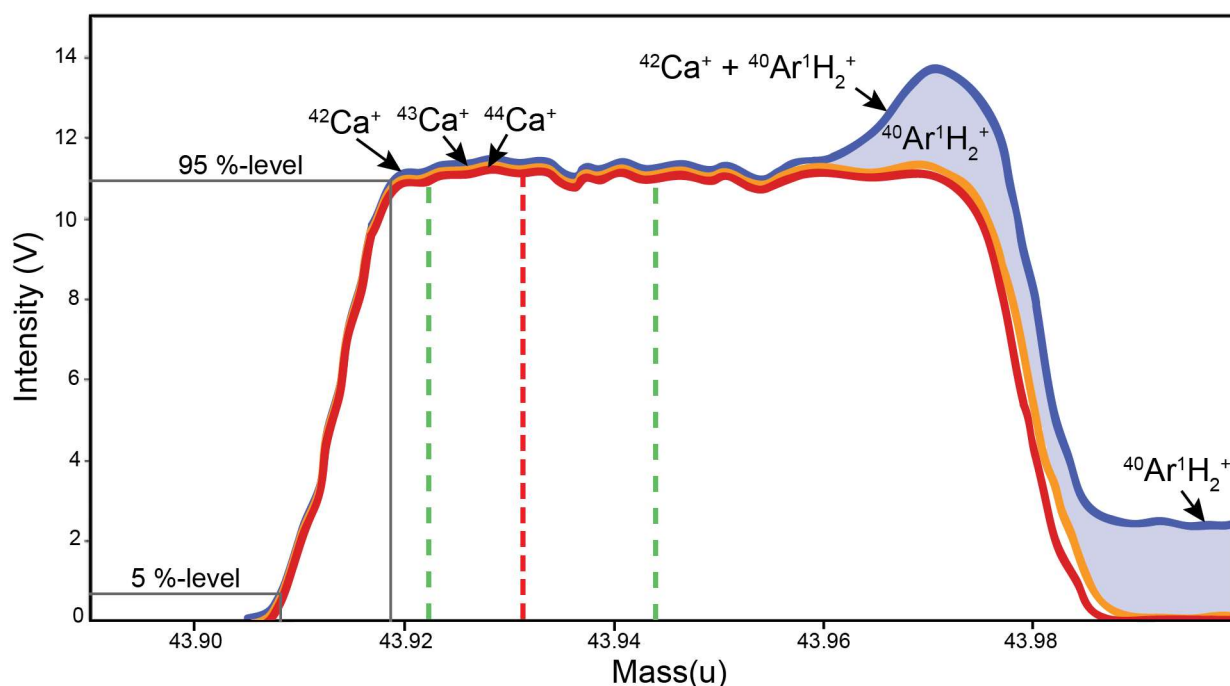
d'extraction appliquant une tension électrique de -2000 V. La configuration des cônes utilisée en routine est une configuration X/Jet (i.e. X sample cone/jet skimmer cone) qui garantit une bonne transmission et qui améliore la sensibilité des détections (Tcaïl et al., 2014), paramètre important pour les isotopes faiblement abondants tels que le  $^{42}\text{Ca}$  et le  $^{43}\text{Ca}$  (table I.2).

### 3. Contrôle du faisceau d'ions et système de détection

Après cette étape d'extraction, le faisceau d'ions entre une zone où le vide est plus poussé ( $< 5,10^{-4}$  Pa), et va successivement traverser une fente d'entrée (fente  $\alpha$ ), un analyseur électrostatique (ESA) et un secteur magnétique, tout en étant régulièrement accéléré et focalisé par un jeu de lentilles électromagnétiques. Ultiment, ces ions vont atteindre la zone des détecteurs, ces derniers étant disposés côte à côte dans un compartiment maintenu à une pression de  $10^{-6}$  Pa ou moins (figure II.1F). La fente  $\alpha$  limite la taille du faisceau d'ions qui sera analysé et module le pouvoir de résolution de l'appareil, c'est-à-dire sa capacité à distinguer des ions ayant un rapport masse/charge ( $m/z$ ) proche. En générant un champ électrique dans une géométrie coudée, l'ESA permet de trier les ions en fonction de leur énergie cinétique. Après ce filtre, les ions sont focalisés et dirigés vers un secteur magnétique coudé qui va modifier leur trajectoire en fonction de leur rapport  $m/z$ . Cette dernière étape sépare donc les isotopes de masses différentes contenus dans le faisceau d'ions afin de former plusieurs faisceaux d'ions individualisés et dirigés vers la chambre de détection. Le modèle de Neptune plus<sup>®</sup> que j'ai utilisé est équipé de 8 détecteurs périphériques articulés autour d'un détecteur central mobile et disposant chacun d'un certain degré de mobilité les uns par rapport aux autres. Ces détecteurs sont des cages de Faraday qui détectent le passage des ions en générant une tension électrique proportionnelle à l'abondance des ions qui atteignent la cage. En alignant ces cages sur la trajectoire de différents isotopes ionisés séparés par le secteur magnétique, il devient possible de mesurer simultanément l'abondance relative de plusieurs isotopes et donc de calculer des rapports isotopiques (e.g.  $^{44}\text{Ca}^+$ ,  $^{43}\text{Ca}^+$ ,  $^{42}\text{Ca}^+$  pour mesurer le  $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$  et le  $^{43}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$ , figure II.1G).

#### 4. Interférences et pouvoir de résolution

Lorsque le faisceau d'ion d'un isotope donné est détecté par l'ICP-MS, les ions de ce dernier ne sont pas identifiés avec un rapport  $m/z$  discret mais par une gamme continue de rapports  $m/z$  (figure II.2). Cette gamme constitue un pic, idéalement formé de deux pentes sigmoïdes délimitant un plateau avec un signal constant (exprimé en volts). Si des faisceaux ioniques sont porteurs d'ions ou de complexes d'ions possédant un rapport  $m/z$  proche, ces derniers peuvent voir leurs pics s'ajouter sur une certaine section de l'axe  $m/z$  (e.g.  $^{42}\text{Ca}^+$  et  $^{40}\text{Ar}^1\text{H}_2^+$  en figure II.2). On parle alors d'interférence



**Figure II.2 – Scan massif du standard ICP Ca Lyon.** Les signaux des détecteurs dédiés aux  $^{43}\text{Ca}^+$  (orange) et  $^{42}\text{Ca}^+$  (bleu) ont été alignés sur celui dédié au  $^{44}\text{Ca}^+$  (rouge). Afin de souligner cet alignement, les intensités mesurées pour le  $^{43}\text{Ca}^+$  et  $^{42}\text{Ca}^+$  ont été multipliées par 15,99 et 3,46 respectivement. Les valeurs de  $m/z$  (mass) et d'intensité des axes x et y sont donc valables pour le  $^{44}\text{Ca}^+$  uniquement. Ce graphique est issu de données réelles obtenues en résolution moyenne (session d'analyse du 29/11/2019). Les seuils à 5 % et 95 % de l'intensité maximale sont ceux servant à calculer le  $R(5, 95 \%)$ , ici de l'ordre de 4500. Les segments en pointillé vert indiquent les limites approximatives de la zone non-interférée du plateau exploitable pour réaliser des mesures de rapports isotopiques. Le segment en pointillé rouge indique la zone sélectionnée le jour de l'analyse pour mesurer les rapports isotopiques du Ca. L'interférence en  $^{40}\text{Ar}^1\text{H}_2^+$  est particulièrement visible sur la droite du plateau où elle contribue au signal mesuré par le détecteur dédié au  $^{42}\text{Ca}^+$ . La fraction du signal issu de l' $^{40}\text{Ar}^1\text{H}_2^+$  est indiquée par la zone bleu pâle. **Mass scan of the ICP Ca Lyon reference material.** Signals from detectors dedicated to  $^{43}\text{Ca}^+$  (orange) and  $^{42}\text{Ca}^+$  (blue) have been aligned with the  $^{44}\text{Ca}^+$  signal (red). To emphasize this alignment, the intensities measured for  $^{43}\text{Ca}^+$  and  $^{42}\text{Ca}^+$  have been multiplied by 15.99 and 3.46 respectively.  $m/z$  (mass) and intensity values are therefore only accurate for the  $^{44}\text{Ca}^+$  signal. This graphic originates from real data collected in medium resolution mode on the 29/11/2019. 5 % and 95 % levels are those used to calculate the  $R(5, 95 \%)$ , which is of the order of 4500 here. Green dashed lines represent the limits of the flat plateau region which is not affected by resolvable interferences. The red dashed line represents the area of the spectrum used to monitor Ca isotopic ratios on the day of the analysis. The  $^{40}\text{Ar}^1\text{H}_2^+$  interference is particularly visible on the right side of the plateau where it contributes to the signal recorded by the detector dedicated to the  $^{42}\text{Ca}^+$ . The  $^{40}\text{Ar}^1\text{H}_2^+$  fraction of the signal is represented by the pale blue area.

isobare. Or, pour pouvoir mesurer des rapports isotopiques précis et justes, il est nécessaire de mesurer l'intensité des signaux de chaque isotope d'intérêt au niveau de la section plane du plateau du signal, dans une gamme de m/z non-interférée par d'autres ions. Pour matérialiser cette capacité à distinguer les signaux de plusieurs faisceaux d'ions se recoupant, on fait appel à la notion de résolution en masse et de pouvoir de résolution. Le pouvoir de résolution R(5, 95 %) est calculé comme étant le rapport entre le m/z absolu de l'ion (m) et la différence entre le rapport m/z mesuré à l'extrême gauche ou droite du plateau à 5 % et 95 % (notés  $m_{5\%}$  et  $m_{95\%}$ ) de l'intensité maximale du signal (Weyer et Schwieters, 2003). Les ions porteurs d'une seule charge positive étant généralement ceux ciblés par ce type d'analyse (e.g.  $^{44}\text{Ca}^+$ ,  $^{43}\text{Ca}^+$ ,  $^{42}\text{Ca}^+$ ), on considère classiquement les rapports m/z comme une masse exprimée en unité de masse atomique (u). En prenant la gauche du plateau, la formule du R(5, 95 %) est la suivante :

$$R(5, 95 \%) = \frac{m}{m_{95\%} - m_{5\%}}$$

Une section plane non-interférée du plateau du signal est exploitable lorsque le R(5, 95 %) est plus de deux fois supérieur à la résolution en masse nécessaire pour distinguer les deux ions ou ensembles ioniques considérés (Weyer et Schwieters, 2003 ; Heuser et al., 2016a), la résolution en masse ( $R_m$ ) étant calculée avec la formule suivante :

$$R_m = \frac{m_1}{m_2 - m_1}$$

Où  $m_1$  et  $m_2$  sont les masses (ou les m/z) des ions (ou complexe ionique),  $m_1$  étant plus légère que  $m_2$ . La résolution en masse nécessaire pour distinguer les isotopes du Ca ionisés d'autres ions ou complexes ioniques est donnée dans le tableau II.1. La plupart de ces interférences sont évitées par l'intermédiaire de la purification des solutions de Ca analysées (section II.A). Toutefois, un certain nombre d'éléments demeurent capables de parvenir jusqu'aux détecteurs et de générer des interférences isobariques (en gras dans le tableau II.1). Il peut notamment s'agir d'atomes contenus dans l'air ambiant (e.g. C, N et O), dans les gaz nécessaires au fonctionnement de l'ICP-MS (Ar et N essentiellement), d'atomes constitutifs du solvant dans lequel était dissous le Ca (e.g. H, O et N), ou encore d'atomes ayant échappé aux protocoles de purification ou ayant contaminé l'échantillon après

cette étape (e.g. Sr et Ti). Une partie de ces interférences peuvent être résolues directement grâce au pouvoir de résolution atteignable avec le Neptune plus®. Sur cet appareil, il est possible de moduler la résolution en masse en modifiant la largeur de la fente  $\alpha$  à l'entrée du faisceau d'ions dans l'ESA. Plus

**Tableau II.1 – Interférences isobariques principales des isotopes du Ca.** Ce tableau est modifié d'après Heuser et al., 2016a.  $\Delta m$  représente la différence entre les rapports  $m/z$  de l'isotope du Ca et des ions interférant.  $R_m$  représente la résolution en masse nécessaire pour distinguer l'isotope du Ca de l'interférence. Il est possible de faire cette distinction dans le signal lorsque  $R_m \times 2 < R(5, 95 \%)$ . Les interférences signalées en gras sont induites par les gaz de l'atmosphère, les gaz intervenant dans le système d'introduction des échantillons, ou constituent des interférences particulièrement problématiques pour les analyses par MC-ICP-MS. **Main isobaric interferences for Ca isotopes.** This table is modified from Heuser et al., 2016a.  $\Delta m$  is the difference between the  $m/z$  ratios of Ca isotopes and interfering ions.  $R_m$  represents the mass resolution necessary to distinguish the Ca isotope for the interference. Resolving the interference is possible when  $R_m \times 2 < R(5, 95 \%)$ . Interferences in bold are generated by atmospheric gases, gases from the introduction interface of the spectrometer, or can be considered problematic for analyses by mean of MC-ICP-MS.

Ca isotope	Interference	$\Delta m$	$R_m$	Ca isotope	Interference	$\Delta m$	$R_m$
<b><math>^{40}\text{Ca}</math></b>	$^{80}\text{Kr}^{++}$	-0.0044	9076	<b><math>^{44}\text{Ca}</math></b>	<b><math>^{88}\text{Sr}^{++}</math></b>	<b>-0.0027</b>	<b>16,448</b>
	$^{80}\text{Se}^{++}$	-0.0043	9228		$^{43}\text{CaH}^+$	0.0111	3956
	<b><math>^{40}\text{Ar}^+</math></b>	<b>-0.0002</b>	<b>193,149</b>		$^{28}\text{Si}^{16}\text{O}^+$	0.0164	2687
	$^{40}\text{K}^+$	0.0014	28,378		$^{32}\text{S}^{12}\text{C}^+$	0.0166	2650
	$^{39}\text{KH}^+$	0.0089	4469		$^{30}\text{Si}^{14}\text{N}^+$	0.0214	2058
	$^{24}\text{Mg}^{16}\text{O}^+$	0.0174	2301		$^{26}\text{Mg}^{18}\text{O}^+$	0.0263	1673
	$^{20}\text{Ne}_2^+$	0.0223	1793		$^{27}\text{Al}^{16}\text{OH}^+$	0.0288	1526
	$^{23}\text{Na}^{16}\text{OH}^+$	0.0299	1336		<b><math>^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2^+</math></b>	<b>0.0343</b>	<b>1280</b>
<b><math>^{42}\text{Ca}</math></b>	$^{84}\text{Kr}^{++}$	-0.0029	14,627	<b><math>^{14}\text{N}_2^{16}\text{O}^+</math></b>	<b>0.0456</b>	<b>964</b>	
	<b><math>^{84}\text{Sr}^{++}</math></b>	<b>-0.0019</b>	<b>21,993</b>	<b><math>^{46}\text{Ca}</math></b>	$^{92}\text{Zr}^{++}$	-0.0012	39,297
	$^{41}\text{KH}^+$	0.0110	3805		<b><math>^{46}\text{Ti}^+</math></b>	<b>-0.0011</b>	<b>43,504</b>
	$^{30}\text{Si}^{12}\text{C}^+$	0.0151	2770		$^{92}\text{Mo}^{++}$	-0.0003	161,524
	$^{26}\text{Mg}^{16}\text{O}^+$	0.0189	2221		$^{30}\text{Si}^{16}\text{O}^+$	0.0150	3064
	<b><math>^{40}\text{ArH}_2^+</math></b>	<b>0.0194</b>	<b>2161</b>		$^{32}\text{S}^{14}\text{N}^+$	0.0215	2142
	$^{40}\text{CaH}_2^+$	0.0196	2139		$^{29}\text{Si}^{16}\text{OH}^+$	0.0255	1799
	$^{28}\text{Si}^{14}\text{N}^+$	0.0214	1962		<b><math>^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^+</math></b>	<b>0.0392</b>	<b>1172</b>
$^{24}\text{Mg}^{18}\text{O}^+$	0.0256	1640	<b><math>^{48}\text{Ca}</math></b>		<b><math>^{48}\text{Ti}^+</math></b>	<b>-0.0046</b>	<b>10,458</b>
$^{25}\text{Mg}^{16}\text{OH}^+$	0.0300	1401		$^{96}\text{Mo}^{++}$	-0.0002	246,860	
<b><math>^{14}\text{N}_3^+</math></b>	<b>0.0506</b>	<b>829</b>		$^{96}\text{Ru}^{++}$	0.0013	37,877	
<b><math>^{43}\text{Ca}</math></b>	<b><math>^{86}\text{Sr}^{++}</math></b>	<b>-0.0041</b>		<b>10,392</b>	$^{96}\text{Zr}^{++}$	0.0016	29,896
	$^{86}\text{Kr}^{++}$	-0.0035		12,404	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$	0.0145	3317
	$^{42}\text{CaH}^+$	0.0077		5596	$^{36}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$	0.0150	3194
	$^{27}\text{Al}^{16}\text{O}^+$	0.0177		2429	$^{24}\text{Mg}_2^+$	0.0176	2731
	$^{31}\text{P}^{12}\text{C}^+$	0.0150		2865	$^{34}\text{S}^{14}\text{N}^+$	0.0184	2605
	$^{26}\text{Mg}^{16}\text{OH}^+$	0.0266	1617	$^{31}\text{P}^{16}\text{OH}^+$	0.0240	2000	
	<b><math>^{14}\text{N}_3\text{H}^+</math></b>	<b>0.0583</b>	<b>737</b>	<b><math>^{16}\text{O}_3^+</math></b>	<b>0.0322</b>	<b>1489</b>	

la fente  $\alpha$  est étroite, et plus le pouvoir de résolution de l'appareil est important. Monter en résolution par cette méthode se fait cependant au détriment de la transmission, car réduire la taille du faisceau réduit inévitablement la quantité d'ions arrivant aux détecteurs et donc le rapport signal/bruit. La moyenne résolution du Neptune plus® (i.e. fente MR de 30  $\mu\text{m}$  de largeur) permet d'atteindre des pouvoirs de résolution de l'ordre de 4000 à 6000 (figure II.2). Ceci permet de conserver une transmission suffisante et de distinguer les signaux des ions  $^{44}\text{Ca}^+$ ,  $^{43}\text{Ca}^+$  et  $^{42}\text{Ca}^+$  des interférences causées par les groupements  $^{14}\text{N}_3^+$ ,  $^{14}\text{N}_3^1\text{H}^+$ ,  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2^+$ ,  $^{14}\text{N}_2^{16}\text{O}^+$  et  $^{40}\text{Ar}^1\text{H}_2^+$ , cette dernière interférence étant particulièrement intense (figure II.2). Tous ces groupements poly-atomiques se caractérisent par des rapports  $m/z$  plus grands que ceux des isotopes du Ca mono-chargés. En pratique, cela permet d'éviter ces interférences en analysant la section du plateau avec les plus petits rapports  $m/z$  (gauche du plateau dans la figure II.2). Les interférences en  $^{40}\text{Ar}^+$ ,  $^{84}\text{Sr}^{2+}$ ,  $^{86}\text{Sr}^{2+}$ ,  $^{88}\text{Sr}^{2+}$ ,  $^{46}\text{Ti}^+$  et  $^{48}\text{Ti}^+$  demandent toutes une résolution en masse supérieure à 10 000 pour être distinguées des isotopes du Ca ionisés, des résolutions difficilement atteignables pour le Neptune plus® (y compris en mode haute résolution : fente HR de 16  $\mu\text{m}$  de largeur) et la plupart des MC-ICP-MS disponibles sur le marché (même un Nu Plasma 1700® et son pouvoir de résolution de l'ordre de 40 000 ne permet pas de résoudre directement les interférences en  $^{40}\text{Ar}^+$  et  $^{46}\text{Ti}^+$ ). Comme évoqué précédemment, l'interférence en  $^{40}\text{Ar}^+$  a pour conséquence d'empêcher les mesures fiables de  $^{40}\text{Ca}^+$  par MC-ICP-MS en l'absence de méthodes de type plasma froid ou cellule de collision/réaction (Fietzke et al., 2004 ; Lewis et al., 2018 ; Zhao et Simon, 2019). Les interférences en  $^{46}\text{Ti}^+$  et  $^{48}\text{Ti}^+$  complexifient quant à elle les purifications nécessaires pour les mesures de  $^{46}\text{Ca}^+$  et  $^{48}\text{Ca}^+$ , particulièrement dans le contexte de la faible abondance de ces isotopes du Ca (Wieser et al., 2004 ; Morgan et al., 2011 ; Schiller et al., 2012 ; Tacail et al., 2014). Enfin, les interférences en  $^{84}\text{Sr}^{2+}$ ,  $^{86}\text{Sr}^{2+}$  et  $^{88}\text{Sr}^{2+}$  perturbent les mesures des ions  $^{42}\text{Ca}^+$ ,  $^{43}\text{Ca}^+$  et  $^{44}\text{Ca}^+$  (Wieser et al., 2004 ; Chu et al., 2006 ; Morgan et al., 2011 ; Tacail et al., 2014 ; He et al., 2019 ; Bao et al., 2020), bien que ces interférences soient limitées par l'élimination de l'essentiel du Sr lors de la purification (section II.A.6) ou par des méthodes de correction des mesures.

## 5. Interférence par le strontium

Malgré les protocoles de purification mis en place (section II.A), des quantités traces de strontium peuvent être présentes dans les solutions de Ca analysées par MC-ICP-MS, une contamination qui génère des interférences de mesures que le pouvoir de résolution de l'instrument ne permet pas de contourner (voir section précédente). Il est cependant possible de corriger les signaux fournis par l'ICP-MS afin d'obtenir des données véritablement représentatives des rapports  $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$  et  $^{43}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$  des échantillons. Pour réaliser cette correction, on applique la méthode décrite par Tacail et al., 2014 et 2016, qui implique de mesurer l'intensité du signal généré par les ions  $^{87}\text{Sr}^{2+}$  ( $m/z = 43,5$ ). Cette correction se base sur les abondances naturelles des isotopes du Sr estimées par l'intermédiaire des rapports isotopiques du Sr documentés pour le matériel de référence NBS 987 ( $^{88}\text{Sr}/^{87}\text{Sr} = 11,7959$ ,  $^{86}\text{Sr}/^{87}\text{Sr} = 1,4079$ ,  $^{84}\text{Sr}/^{87}\text{Sr} = 0,0796$ ), et considère que le biais de masse instrumental suit une loi exponentielle (Tacail et al., 2014, 2016). Les signaux corrigés des ions  $^{42}\text{Ca}^+$ ,  $^{43}\text{Ca}^+$  et  $^{44}\text{Ca}^+$  sont calculés selon la formule suivante :

$$^x\text{Ca}^+ = V_x - V_{43,5} \times \frac{^{2x}\text{Sr}}{^{87}\text{Sr}} \times \left( \frac{M_{2x}\text{Sr}}{M_{87}\text{Sr}} \right)^{f_{\text{Sr}^{2+}}}$$

Où  $x$  équivaut au nombre de masse de l'isotope du Ca considéré (44, 43 ou 42), où  $V$  est le signal mesuré en volt via l'ICP-MS, et où  $f_{\text{Sr}^{2+}}$  est le coefficient de fractionnement en masse du  $\text{Sr}^{2+}$  décrit par la loi exponentielle de fractionnement en masse. La valeur de ce coefficient est mesurée expérimentalement (Tacail et al., 2016). Cette méthode de correction se montre très efficace, au moins tant que les concentrations en Sr restent limitées (e.g.  $V_{44}/V_{43,5} < 10^{-4}$ , un seuil rarement dépassé compte tenu de l'étape de purification dédiée à la séparation du Ca et du Sr). Une correction inefficace ou une absence de correction produit des données de composition isotopique biaisées (bien que ce biais reste limité compte tenu des faibles rapports Sr/Ca post-purification) et modifie la relation qui lie le  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  et le  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  (ou  $\ln(^{44/42}\text{Ca})$  et  $\ln(^{43/42}\text{Ca})$ ) en les faisant sortir du cadre des prédictions des lois exponentielles, de puissance ou inverse de dépendance en masse. Le manque de fiabilité de cette correction au-delà d'un certain seuil de concentration en Sr peut s'expliquer par la variabilité du  $f_{\text{Sr}^{2+}}$  au cours des sessions d'analyse, ce qui limite la justesse de cette correction lorsqu'elle est basée sur

une valeur fixe de  $f_{Sr^{2+}}$  (He et al., 2019). D'autres méthodes de corrections impliquant des mesures de  $f_{Sr^{2+}}$  répétées au cours des sessions d'analyse permettent de maintenir de bons niveaux de précision et de justesse des mesures pour des rapports Sr/Ca aussi hauts que 0,1 (He et al., 2019). Cette méthode implique cependant une consommation de standards de référence supplémentaires (e.g. NIST® SRM 987) et des séquences d'analyse plus longues.

## 6. Correction du biais en masse instrumentale

Deux notions importantes en spectroscopie analytique sont celles de la précision et de la justesse des mesures. Des mesures précises donneront des résultats très proches si répliquées, tandis que des mesures justes donneront un résultat très proche de la valeur réelle de la dimension mesurée. La mesure parfaite est une mesure à la fois juste et précise, et idéalement les protocoles analytiques mis en place optimisent ces deux paramètres conjointement. Les sections précédentes décrivent le déroulement des analyses par MC-ICP-MS et les procédures mises en place pour éviter ou corriger les interférences isobariques affectant la justesse des mesures de rapports isotopiques du Ca. Cependant, au-delà de ces interférences, l'instrumentation induit inévitablement un biais en masse (i.e. les ions légers ne sont pas transmis avec la même efficacité que les ions lourds), ce qui modifie la justesse des mesures de rapports isotopiques. Ce biais en masse n'est constant ni entre les machines ni au cours du temps (ce qui est susceptible d'affecter la précision des mesures également), bien que la conception des MC-ICP-MS modernes soit pensée pour limiter ces variations du biais en masse (Weyer et Schwieters, 2003 ; Jakubowski et al., 2011). Les variations du biais en masse impliquent de mesurer les rapports isotopiques d'un standard de référence en parallèle de ceux des échantillons (voir section I.C). Plusieurs méthodes de standardisation permettent de corriger les mesures des variations du biais en masse au cours du temps (i.e. de la dérive instrumentale), standardisations qui peuvent être internes ou externes. La standardisation interne consiste en l'introduction d'un élément (e.g. ajout de Cu ou de Zn pour mesurer les rapports isotopiques de l'un ou l'autre de ces éléments : Marechal et al., 1999) ou de plusieurs isotopes différents de ceux dont on souhaite connaître les rapports isotopiques (e.g. méthodes de double-spike du Ca : Heuser et Eisenhauer, 2008 ; Guan et al., 2020 ; Liu et al., 2020). Cette standardisation permet de corriger les mesures de rapports isotopiques du biais en masse



instrumental, ainsi que des fractionnements pouvant résulter des étapes de purification (dans le cas des méthodes de double-spike). Les méthodes de double-spike sont cependant complexes à mettre en place pour le Ca en MC-ICP-MS (Morgan et al., 2011 ; Schiller et al., 2012) et constituent une étape de préparation supplémentaire qui est chronophage. Par ailleurs, aucune méthode satisfaisante de standardisation interne du Ca par un autre élément n'a été décrite à ce jour. La méthode la plus démocratisée pour mesurer les rapports isotopiques du Ca par MC-ICP-MS est la méthode de standardisation externe par bracketing standard-échantillon (i.e. standard-sample bracketing : Wieser et al., 2004 ; Chu et al., 2006 ; Reynard et al., 2010 ; Morgan et al., 2011 ; Tacail et al., 2014, 2017 ; Martin et al., 2015, 2017b, 2018 ; Lanping et al., 2018 ; He et al., 2019 ; Bao et al., 2020 ; Guan et al., 2020). Cette méthode consiste à réaliser des mesures d'une solution à la composition isotopique constante, le standard de bracketing, avant et après chaque mesure réalisée sur un échantillon. Les différences de rapports isotopiques mesurées entre plusieurs répliques de ce standard découlent directement des variations du biais instrumental (la composition isotopique réelle du standard étant constante), ce qui permet de quantifier ce biais et de corriger les mesures faites sur les échantillons en fonction de ce dernier. Pour réaliser cette correction, on fait l'hypothèse que le biais en masse a évolué de manière monotone et à un rythme constant entre les deux mesures de standard de bracketing. Cette hypothèse n'est pas toujours vraie mais reste efficace pour produire des mesures avec un bon degré de justesse et de précision (voir sections II.B.9, II.B.10 et II.B.11). Le standard de bracketing utilisé durant toutes les sessions d'analyse de cette thèse est une solution standard Specpure de Ca (Alfa Aesar®) préalablement purifiée de son Sr par la méthode décrite en section II.A.6. Cette solution nommée ICP Ca Lyon est décrite dans plusieurs publications documentant notamment sa composition isotopique relativement aux autres standards de référence de la littérature des isotopes du Ca (Tacail et al., 2014 ; Martin et al., 2015, 2017b, 2018). Ce standard de bracketing est aussi le standard qui sert à exprimer les rapports isotopiques sous forme de  $\delta$  dans les données présentées dans cette thèse. Pour le  $^{44/42}\text{Ca}$  par exemple, le  $\delta$  est alors calculé avec la formule suivante :

$$\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}} = \left( \frac{(^{44}\text{Ca} / ^{42}\text{Ca})_{\text{échantillon}}}{\frac{(^{44}\text{Ca} / ^{42}\text{Ca})_{\text{ICP Ca Lyon}, n-1} + (^{44}\text{Ca} / ^{42}\text{Ca})_{\text{ICP Ca Lyon}, n+1}}{2}} - 1 \right)$$

Où les indices n-1 et n+1 renvoient respectivement aux mesures réalisées avant et après l'échantillon. Le  $\delta$  est classiquement exprimé en ‰ (soit x 1000 par rapport au résultat brut de l'équation). Il a été déterminé que les valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  étaient en moyenne supérieures de  $+0,518 \pm 0,025$  ‰ par rapports aux valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{SRM 915a}}$ , une notation courante dans la littérature (Martin et al., 2018).

## 7. Séquence d'analyse type

Dans une séquence d'analyse de routine, les mesures d'échantillons et de standards de bracketing sont séparées par des mesures de blancs, des solutions de 0,05 M  $\text{HNO}_3$  dépourvues de Ca au premier ordre. Ces analyses de blancs remplissent une double fonction : celle de contrôler l'absence de contamination des solutions à analyser par du Ca environnemental (ou demeurant dans l'instrument après l'introduction d'échantillon précédents), et celle de nettoyer l'instrumentation des potentielles contaminations résultant des analyses précédentes. Pour se faire, les blancs sont injectés pendant 3 minutes entre chaque mesure de standard ou d'échantillon, au terme desquelles des mesures pour les masses (m/z) 44, 43, 43,5 et 42 sont réalisées. Concernant ces mesures, un signal approchant  $10^{-2}$  V pour la masse 44 est considéré comme témoignant d'un niveau de contamination important, une solution à 1,25 mg/l de Ca (la concentration de routine pour les échantillons et les standards) générant un signal en masse 44 compris en 12 et 20 V environ selon les sessions (signal variant notamment en fonction du paramétrage du désolvateur et du degré d'usure de la fente  $\alpha$ ). Afin d'améliorer cette phase de nettoyage instrumental, l'injection des blancs est précédée par 30 secondes d'injection de 0,5 M  $\text{HNO}_3$  par la sonde de prélèvement du spectromètre, et par 10 à 20 secondes d'injection de 0,5 M  $\text{HNO}_3$  directement dans la chambre de pulvérisation de l'Aridus® (système QuickWash®, CETAC®). En parallèle des blancs, des standards de bracketing et des échantillons, des standards secondaires sont analysés au cours de la session (en début de session puis tous les dix à vingt échantillons). Ces standards secondaires sont des matériaux de référence ayant subi le même protocole de purification

que les autres échantillons, et dont la composition isotopique en Ca est documentée dans la littérature. En comparant les données de la littérature avec les valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  mesurées, l'analyse de ces standards secondaires permet d'évaluer la justesse des mesures et ainsi d'identifier des fractionnements isotopiques instrumentaux ou issus des étapes de purification qui interfèreraient avec les mesures de rapports isotopiques. Ces standards peuvent être de nature différente (e.g. eau de mer, matériel biologique, roche), de composition isotopique différente, et préférentiellement de la même matrice que les échantillons analysés. Dans le cas des études que j'ai réalisées au cours de cette thèse, il s'agissait principalement de SRM1486 (NIST®, farine d'os de vache) et de IAPSO (OSIL®, eau de mer). Les mesures de rapports isotopiques sont réalisées de la même manière pour les standards (bracketing et secondaires) et les échantillons. Chaque mesure de rapports isotopiques du Ca consiste en une série de 40 mesures consécutives de 4,2 secondes chacune, réalisées en parallèle et simultanément par les détecteurs des masses 44, 43, 43,5 et 42. Après correction de l'interférence en Sr par l'intermédiaire du signal recueilli pour la masse 43,5 (voir section II.B.5), les mesures des masses 44, 43 et 42 sont utilisées pour calculer les rapports isotopiques  $^{44/42}\text{Ca}$ ,  $^{43/42}\text{Ca}$  et  $^{44/43}\text{Ca}$ . Une moyenne de chacun de ces rapports isotopiques est calculée sur la base des 40 mesures par détecteur, puis toutes les mesures

**Tableau II.2 – Exemple de séquence d'analyse.** Dans une séquence réelle, chaque bracketing et échantillon sont séparés par un passage de blanc non représenté ici. La valeur de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  des standards de bracketing est calculée avec le rapport  $^{44/42}\text{Ca}$  du bracketing du rang précédent comme référence (i.e. n-3 sert de référence pour n-1 et n-1 pour n+1). La valeur de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  des échantillons est calculée avec la moyenne des rapports  $^{44/42}\text{Ca}$  des standards de bracketing encadrant l'échantillon comme référence (e.g. n-1 et n+1 pour l'échantillon Y). La stabilité du biais en masse instrumental au cours d'une séquence bracketing-échantillon-bracketing est estimée grâce à la valeur de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  des standards de bracketing encadrant l'échantillon (e.g. bracketing n-1 et n+1 pour l'échantillon Y). **Example of analytical sequence.** In a real sequence, each bracketing and sample would be separated by a blanc step not represented here. The  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of bracketing standards are calculated with the  $^{44/42}\text{Ca}$  ratio of the previous bracketing standard as a reference (i.e. n-3 is the reference for n-1 and n-1 for n+1). Sample  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values are calculated with the mean of  $^{44/42}\text{Ca}$  ratios from bracketing standards around the sample (e.g. n-1 and n+1 for sample Y). The stability of the instrumental mass bias during a bracketing-sample-bracketing sequence is assessed using the  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of bracketing standards adjacent to the sample in the sequence (e.g. bracketing n-1 and n+1 for sample Y).

	rank
Bracketing – ICP Ca Lyon	n-3
Sample X	n-2
Bracketing – ICP Ca Lyon	n-1
sample Y	n
Bracketing – ICP Ca Lyon	n+1

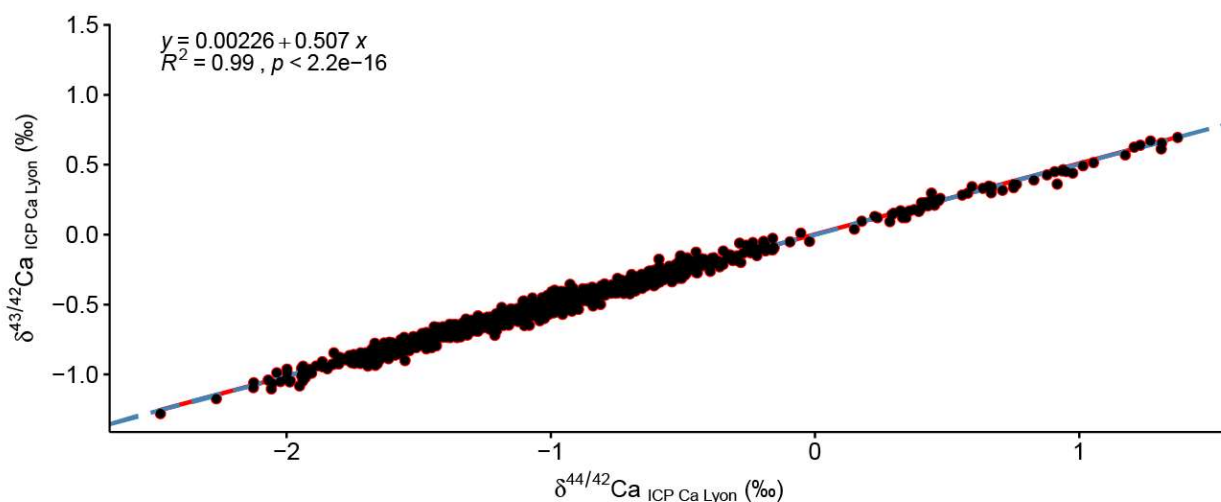
Sequence  
progression



de rapports isotopiques s'écartant de plus de 2 fois l'écart type autour de cette moyenne sont écartées (i.e. correction  $2\sigma$ ). Une nouvelle moyenne est calculée à partir des valeurs restantes pour chaque rapport isotopique, et ce sont ces valeurs qui seront intégrées dans le calcul des  $\delta^{44/42}\text{Ca}$ ,  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  et  $\delta^{44/43}\text{Ca}$ . Les mesures de ces  $\delta$  sont généralement répliquées au moins deux fois par échantillons afin de fournir du recul sur la précision des mesures (voir calcul des intervalles de confiance en section II.B.10 et II.B.11).

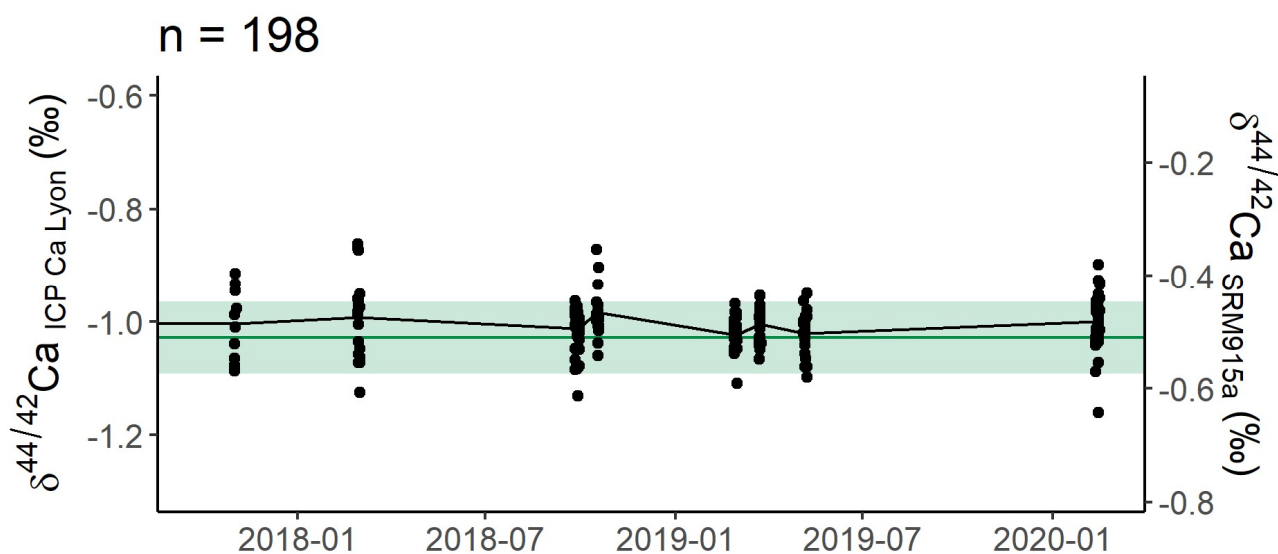
## 8. Paramètres de contrôle

Plusieurs paramètres de contrôle sont surveillés au cours des analyses pour juger du bon déroulement des mesures. Parmi eux, le rapport entre la concentration en Ca du standard de bracketing et celle des échantillons (ou standards secondaires) est contrôlé. En effet, la valeur mesurée des rapports isotopiques du Ca est dépendante de la concentration en Ca de la solution analysée (Schiller et al., 2012), ce qui nécessite de fixer la concentration en Ca des échantillons et des standards secondaires à une concentration proche de celle des solutions de standard de bracketing. La gamme de concentration généralement acceptée est de l'ordre de  $\pm 10\%$  de celle du standard de bracketing (Schiller et al., 2012 ; Tacail et al., 2014), soit une gamme comprise entre 1,125 et 1,375 mg/l de Ca



**Figure II.3 – Valeurs de  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  en fonction des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$ .** Ce graphique présente 1361 mesures de rapports isotopiques réalisées au cours de ma thèse. La droite de régression linéaire qui découle de ces mesures (droite rouge) possède une pente de 0,507 qui est indistinguable de la pente de 0,507 prédite par la loi exponentielle de fractionnement en masse (droite bleue en pointillé).  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  values as a function of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values. This graph presents 1361 measures of Ca isotope ratios realized during my thesis. The linear regression line of these measures (red line) has a slope of 0.507, indistinguishable from the 0.507 slope predicted by the exponential mass-dependent fractionation law (dashed blue line).

environ. Pour vérifier que l'interférence en  $\text{Sr}^{2+}$  est correctement corrigée et pour contrôler l'absence d'autres interférences (e.g.  $^{40}\text{Ar}^1\text{H}_2^+$ ), on compare les valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  et de  $\delta^{43/42}\text{Ca}$ . En effet, en étant liées par des fractionnements strictement dépendants de la masse (Gussone et al., 2016), et avec une gamme de variation des compositions isotopiques réduite à quelques ‰ dans la nature, on peut faire l'approximation que les valeurs de  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  et de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  des matériaux naturels décrivent une droite de formule :  $\delta^{43/42}\text{Ca} = a \times \delta^{44/42}\text{Ca} + b$ , où  $a$  est une pente comprise entre 0,501 et 0,512 en fonction des prédictions des lois inverse, de puissance ou exponentielle de fractionnement en masse (Tacail, 2017). Des mesures s'écartant significativement de cette droite seraient la marque d'une interférence affectant les mesures de rapports isotopiques. En conséquence, la concordance entre les valeurs de  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  et de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  fait l'objet d'un suivi détaillé au cours des sessions d'analyses. Les données de 1361 mesures d'échantillons et de standards réalisées au cours de ma thèse sont reportées en figure II.3. La pente de la droite de régression linéaire qui lie les valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  et de  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  (pente = 0,507) est parfaitement conforme aux prédictions d'un fractionnement en masse qui suivrait



**Figure II.4 – Variabilité sur le long terme des valeurs mesurées de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  du standard SRM 1486 (NIST®).** Chaque point représente une mesure de la valeur du  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de ce standard (n=198). La courbe noire représente l'évolution des valeurs moyennes de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  mesurée lors de chaque session d'analyse. La droite verte représente la valeur moyenne de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de -1,03 ‰ documentée par Tacail et al., 2014, 2016, 2017 ; Martin et al., 2015, 2017a, b, 2018 ; Hassler et al., 2018 et compilée par Martin et al., 2018. La zone verte qui l'entoure représente l'écart type autour de cette moyenne (sd = 0,06 ‰, n = 505). **Long term variability of measured SRM 1486 (NIST®)  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values.** Each dot represents a measure of the  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of this standard (n =198). The black line represents the evolution of the average measured  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value reported in each analytical session. The green line represents the mean  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of -1.03 ‰ reported by Tacail et al., 2014, 2016, 2017 ; Martin et al., 2015, 2017a, b, 2018 ; Hassler et al., 2018 and compiled by Martin et al., 2018. The green area represents the standard deviation around this mean (sd = 0.06 ‰, n = 505).

une loi exponentielle (pente théorique de 0,507 également : Tacail, 2017). Ces mesures de rapports isotopiques du Ca ne sont donc pas affectées des interférences isobariques (e.g. le  $\text{Sr}^{2+}$ ) qui feraient dévier les mesures de cette relation entre valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  et de  $\delta^{43/42}\text{Ca}$ .

## 9. Stabilité à long terme et justesse des mesures de rapports isotopiques

Afin de gagner en recul sur la stabilité et la justesse des mesures de rapports isotopiques du Ca réalisées au cours de cette thèse, j'ai compilé l'ensemble des données isotopiques collectées au sein d'une base de données unique. Les 5820 lignes de ce tableau de données incluent les mesures réalisées sur les standards de bracketing (ICP Ca Lyon), les standards secondaires (essentiellement SRM 1486<sup>®</sup> et IAPSO<sup>®</sup>) et les échantillons. Étant donné que les standards secondaires font partie de toutes les séquences d'analyse et que la composition isotopique de ceux-ci est documentée par des études indépendantes de celles du Laboratoire de Géologie de Lyon, ce sont les données de ces standards qui sont les plus explicites pour discuter de la stabilité et de la justesse des mesures sur le long terme. Le standard SRM 1486 de NIST<sup>®</sup> est particulièrement intéressant pour cette discussion car cette poudre d'os de référence fut utilisée comme standard secondaire principal au cours de toutes mes sessions d'analyse. À elles seules, et en excluant les mesures pour lesquelles je n'étais pas l'opérateur principal des étapes de purification du Ca et d'analyse, les analyses réalisées sur ce standard au cours de ma thèse représentent un total de 198 mesures de rapports isotopiques du Ca (235 mesures en incluant mes analyses datant d'avant octobre 2017). L'évolution des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  de ces 198 mesures est décrite en figure II.4 et comparée aux données de Tacail et al., 2014, 2016, 2017 ; Martin et al., 2015, 2017a, b, 2018 ; Hassler et al., 2018 et compilées par Martin et al., 2018. Ces 198 mesures donnent une valeur moyenne de  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  de  $-1,01 \pm 0,09$  (2 sd). Cette valeur est cohérente avec les mesures réalisées au Laboratoire de Géologie de Lyon en dehors de mes travaux de thèse et se basant sur des méthodes de purification du Ca et d'analyse analogues :  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}} = -1,03 \pm 0,13$  ‰ (2 sd, n = 505, Tacail et al., 2014, 2016, 2017 ; Martin et al., 2015, 2017a, b, 2018 ; Hassler et al., 2018). En outre, ces données sont cohérentes avec celles publiées par des laboratoires utilisant d'autres méthodes de purification et d'analyse ( $-1,01 \pm 0,04$  ‰, 2 sd, Heuser et Eisenhauer, 2008 ;

Heuser et al., 2011, 2016a ; Li et al., 2016, converties et compilées par Martin et al., 2018), ce qui atteste de la justesse et de la reproductibilité de ces mesures.

## 10. Incertitudes de mesures

Il existe de multiples manières d'exprimer des incertitudes autour d'une donnée constituée de plusieurs mesures indépendantes. Pour le cas des mesures de compositions isotopiques exprimées sous forme de  $\delta$  (e.g.  $\delta^{44/42}\text{Ca}$ ), l'une des méthodes les plus rigoureuses consiste à utiliser l'incertitude propagée  $U$ , elle-même calculée à partir de l'incertitude-type  $u_c(y)$  (Joint Committee for Guides in Metrology, 2008 ; Horsky et al., 2016 ; Sullivan, 2020 ; Sullivan et al., 2020 ; Sauzéat et al., 2021). En adaptant les calculs de cette incertitude-type à partir de la littérature d'autres systèmes isotopiques (Sullivan, 2020 ; Sullivan et al., 2020 ; Sauzéat et al., 2021), on obtient la formule suivante :

$$u^2(\delta^{44/42}\text{Ca}) = \left(\frac{1}{r_{\text{standard}}^{44/42}}\right)^2 \times \sigma^2(r_{\text{échantillon}}^{44/42}) + \left(-\frac{r_{\text{échantillon}}^{44/42}}{(r_{\text{standard}}^{44/42})^2}\right)^2 \times \sigma^2(r_{\text{standard}}^{44/42})$$

Où  $u^2$  est le carré de l'incertitude-type,  $r^{44/42}$  est la moyenne du rapport isotopique  $^{44/42}\text{Ca}$  de l'échantillon considéré et du standard de bracketing associé, et  $\sigma^2(r^{44/42})$  est la variance de ces rapports isotopiques.  $U$  est calculé en multipliant  $u(\delta^{44/42}\text{Ca})$  par un facteur d'élargissement  $k$  fixé à 2 afin de générer un intervalle de confiance à 95 % (équivalent à  $\pm U$  autour de la valeur moyenne). Cet intervalle de confiance permet de représenter l'incertitude entourant les mesures de rapports isotopiques par rapport à la valeur réelle des rapports isotopiques de l'échantillon analysé. Cependant, ce calcul est relativement peu adapté aux méthodes d'analyses impliquant une standardisation par bracketing-échantillon sans normalisation interne (de type double-spike ou inter-élément par exemple). En effet, le calcul du  $u(\delta^{44/42}\text{Ca})$  est très sensible à la variabilité des mesures de rapports isotopiques (termes  $\sigma^2(r^{44/42})$  de l'équation), variabilité qui augmente beaucoup sans standardisation interne puisque la correction du biais en masse intervient après les mesures de rapports isotopiques. Cette méthode a donc pour effet de produire de larges intervalles de confiance même pour des niveaux élevés de stabilité des mesures répliquées de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$ . En outre, connaître le vrai rapport isotopique  $r^{44/42}$  des échantillons (par opposition au rapport isotopique mesuré) est généralement dispensable pour les

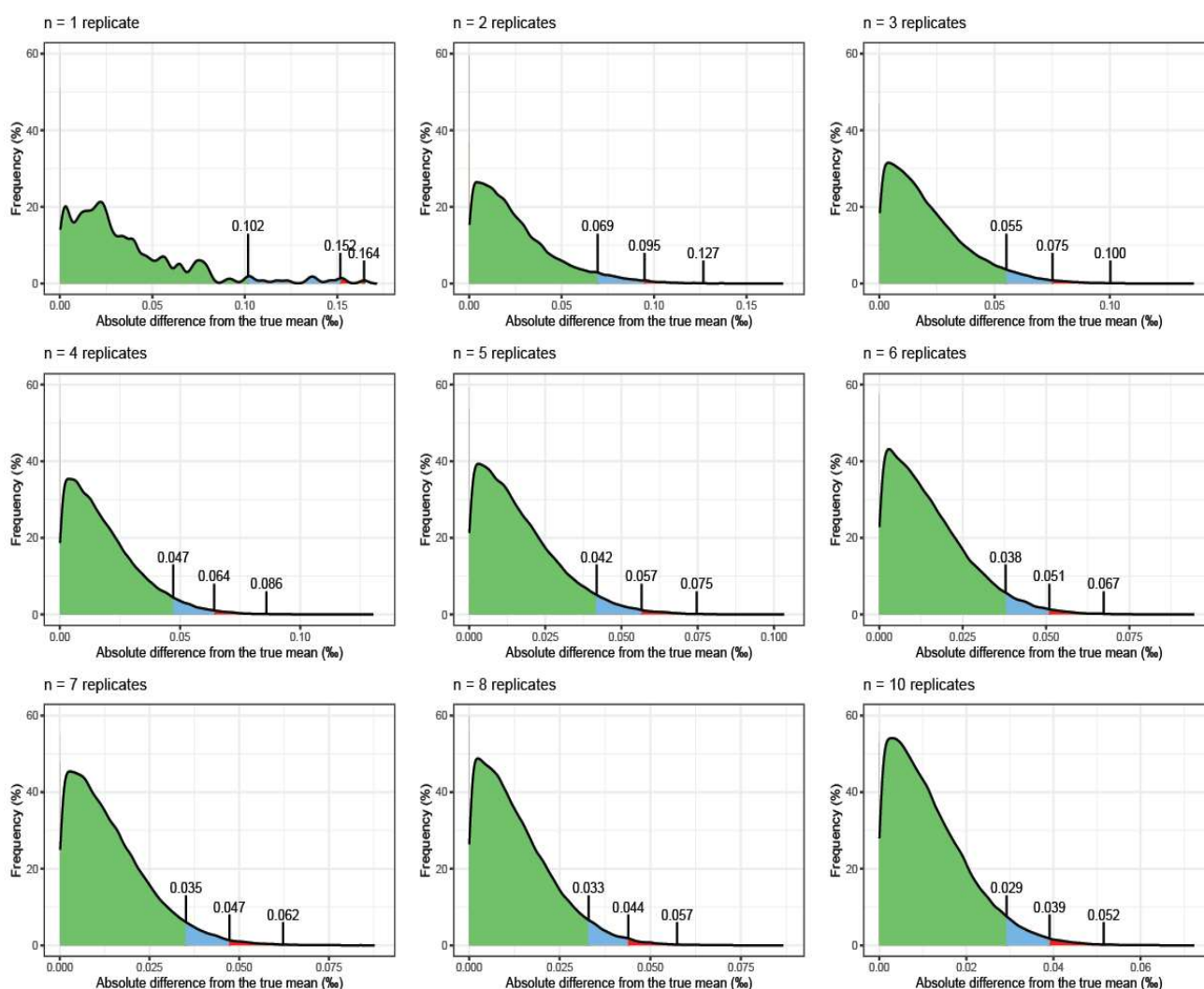
études portant sur le vivant (e.g. faunes actuelles ou fossiles), puisque c'est généralement l'écart relatif des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  qui est le plus important pour les questions scientifiques qui se posent. Dans le contexte de ces travaux de thèse, j'ai donc favorisé l'utilisation de l'erreur standard (se) pour estimer les intervalles de confiance autour des mesures de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  (une autre méthode à laquelle la littérature recourt largement : e.g. Chu et al., 2006 ; Heuser et al., 2011, 2019 ; Tacail et al., 2021). Étant donné que les valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  d'un échantillon mesurées plusieurs fois au cours d'une même session d'analyse sont le plus souvent normalement distribuées autour de la valeur moyenne de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  mesurée de cet échantillon (test de Shapiro-Wilk : p-value > 0,05), on peut estimer que l'intervalle de confiance à 95 % autour de la moyenne mesurée équivaut à  $\pm 2$  fois l'erreur standard (2 se). Cependant, dans le cas le plus courant où la composition isotopique des échantillons n'est connue que sur la base de 3 mesures répliquées, l'intervalle de confiance qui résulte de ce calcul peut localement sous-estimer l'incertitude réelle autour de certaines mesures si les quelques mesures répliquées sont stochastiquement plus semblables que pour la moyenne des autres échantillons. Afin d'avoir un meilleur recul sur les incertitudes de mesure réelles, une solution consiste donc à appliquer un intervalle de confiance minimum aux mesures. Il peut s'agir du 2 se moyen des mesures de la session d'analyse concernée ou bien d'un intervalle de confiance calculé par des méthodes plus élaborées (voir section suivante).

## 11. Intervalles de confiance minimum et niveau cible de réplication des mesures

Afin d'explorer comment le degré de réplication des analyses module l'incertitude de mesure autour des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$ , j'ai développé une procédure de bootstrap (i.e. échantillonnage avec remise) permettant de simuler différents niveaux de réplication à partir du jeu de données de mesures des rapports isotopiques du Ca du SRM 1486 (NIST®, n = 235). Pour chaque niveau de réplication exploré (n = 1 à 10), l'algorithme tire au hasard (et avec remise) n valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  dans cette base de données, puis compare la moyenne obtenue avec la moyenne réelle de la population. Cette procédure est répétée 100 000 fois pour chaque niveau de réplication. Les résultats de cette procédure sont

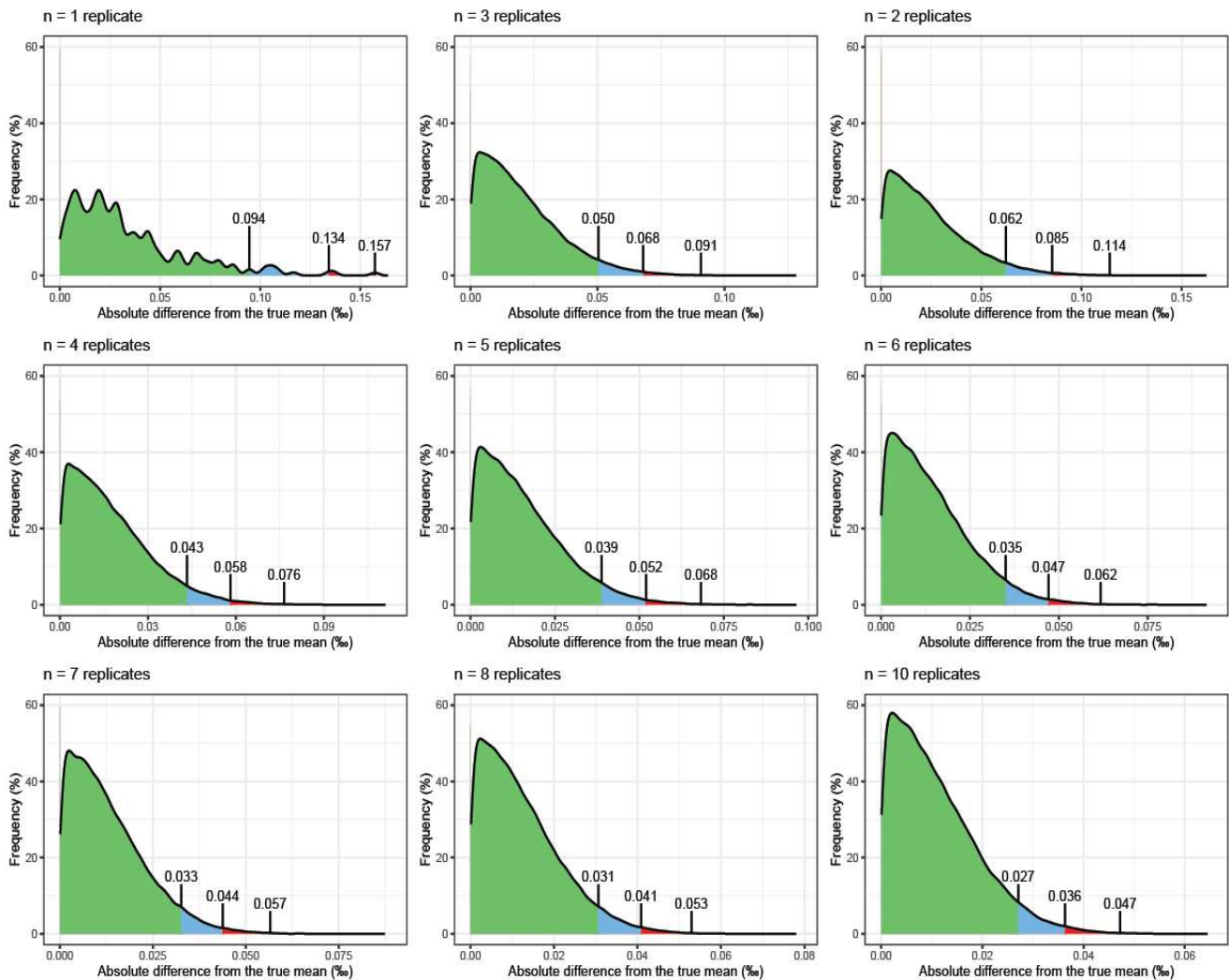


synthétisés dans les figures II.5 pour le  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  et II.6 pour le  $\delta^{43/42}\text{Ca}$ . Ces résultats de simulation permettent de représenter l'incertitude attendue en fonction du degré de réplication appliqué aux mesures d'échantillons (en faisant l'hypothèse que la précision et la justesse des mesures de valeurs



**Figure II.5 – Fréquence des écarts absolus entre la moyenne réelle des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  mesurées pour le SRM1486 (NIST®, n = 235) et la moyenne de tirages aléatoires avec remise (bootstrap) sur ce même jeu de données pour différents niveaux de réplication (n compris entre 1 et 10).** Chaque tirage avec remise de n mesures est répété 100 000 fois. Dans chaque graphique, l'aire verte représente 95 % des moyennes simulées par bootstrap les plus proches de la moyenne réelle du jeu de données. Les aires bleue et verte représentent ensemble 99 % des moyennes simulées les plus proches de la moyenne réelle. Les aires rouge, bleue et verte représentent ensemble 99,9 % des moyennes simulées les plus proches de la moyenne réelle. Les valeurs annotées aux limites de ces aires indiquent la valeur des centiles correspondant. **Frequency of the absolute difference between the true mean of measured  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  values for the SRM1486 (NIST®, n = 235) and the mean from random sampling with replacement (bootstrap) on the same dataset for different level of replication (n between 1 and 10).** Each random sampling of n measures is repeated 100 000 times. In each graph, the green area represents 95 % of the means simulated by bootstrap which are the closest from the true mean of the dataset. Blue and green areas together represent 99 % of the simulated means which are the closest from the true mean. Red, blue, and green areas together represent 99,9 % of the simulated means which are the closest from the true mean of the dataset. Values indicated at the limit of these areas are the correspondent centile values.

de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  du SRM1486 sont représentatives de celles des échantillons). Comme attendu, l'écart entre la moyenne du sous-échantillon simulé et la moyenne réelle de la population de mesures tend à diminuer avec l'augmentation du nombre de répliques. Un des intérêts de ces résultats est de pouvoir prédire, en amont des analyses, le nombre de répliques à viser pour distinguer des échantillons pour



**Figure II.6 – Fréquence des écarts absolus entre la moyenne réelle des valeurs de  $\delta^{43/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  mesurées pour le SRM1486 (NIST®, n = 235) et la moyenne de tirages aléatoires avec remise (bootstrap) sur ce même jeu de données pour différents niveaux de réplification (n compris entre 1 et 10). Chaque tirage avec remise de n mesures est répété 100 000 fois. Dans chaque graphique, l'aire verte représente 95 % des moyennes simulées par bootstrap les plus proches de la moyenne réelle du jeu de données. Les aires bleue et verte représentent ensemble 99 % des moyennes simulées les plus proches de la moyenne réelle. Les aires rouge, bleue et verte représentent ensemble 99,9 % des moyennes simulées les plus proches de la moyenne réelle. Les valeurs annotées aux limites de ces aires indiquent la valeur des centiles correspondant. Frequency of the absolute difference between the true mean of measured  $\delta^{43/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  values for the SRM1486 (NIST®, n = 235) and the mean from random sampling with replacement (bootstrap) on the same dataset for different level of replication (n between 1 and 10). Each random sampling of n measures is repeated 100 000 times. In each graph, the green area represents 95 % of the means simulated by bootstrap which are the closest from the true mean of the dataset. Blue and green areas together represent 99 % of the simulated means which are the closest from the true mean. Red, blue, and green areas together represent 99.9 % of the simulated means which are the closest from the true mean of the dataset. Values indicated at the limit of these areas are the correspondent centile values.**

lesquels on disposerait d'un a priori sur leurs différences de composition isotopique. Par exemple, si la littérature ou des modèles suggèrent que deux échantillons présentent des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  différentes de 0,20 ‰ en moyenne, la figure II.6 nous indique que dans les conditions d'analyses de routine, répliquer les mesures 2 fois suffit à ce que 95 % des moyennes de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  mesurées soient éloignées de moins de 0,07 ‰ de la moyenne réelle de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  des échantillons. Ainsi, dans 95 % des cas, ce niveau de réplication permettrait de distinguer de manière fiable des échantillons avec des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  différentes de 0,14 ‰ ou plus (égale à la somme des incertitudes des deux échantillons). En appliquant la même procédure à l'échelle des données d'une session d'analyse, cette méthode est aussi un moyen de déterminer des intervalles de confiance minimums autour des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  mesurées lors de cette session. Attribuer ces intervalles de confiance minimums à tous les échantillons possédant un 2 se plus bas que l'intervalle de confiance minimum, pour un niveau de réplication donné, constitue une approche prudente pour discuter de différences de composition isotopique entre échantillons.

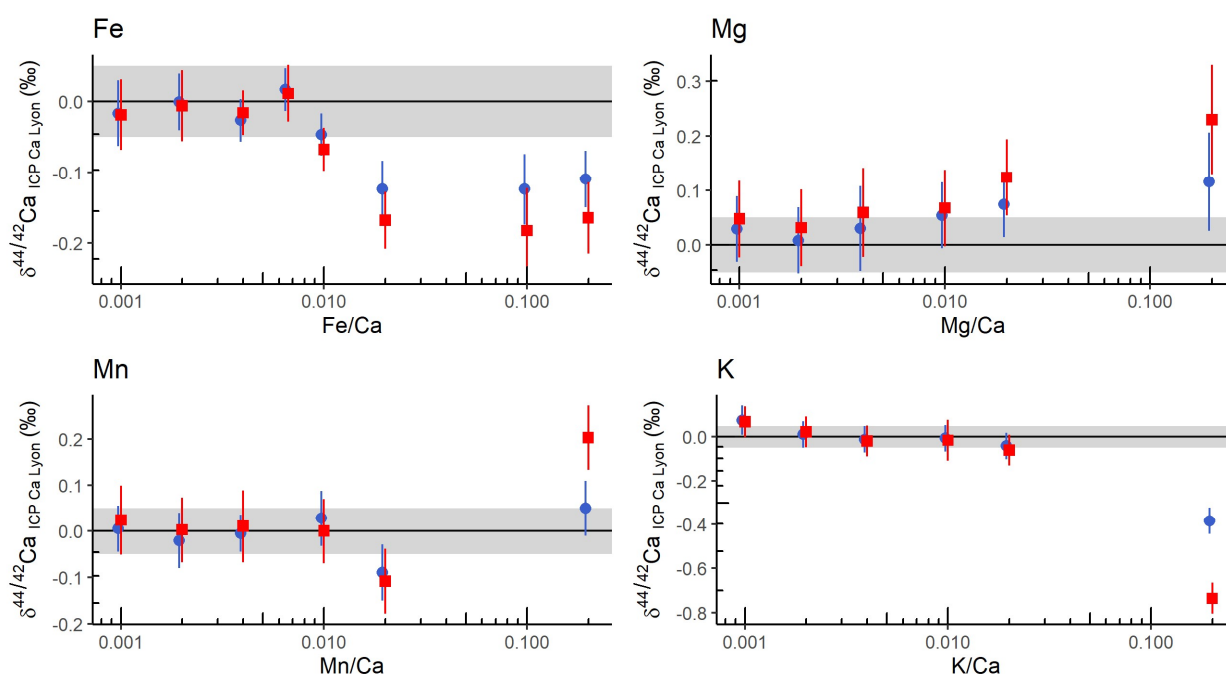
## 12. Effets de matrice et seuils de concentration

Les interférences isobariques ne sont pas le seul type d'interférences susceptibles de perturber les mesures de rapports isotopiques. Ainsi, les interférences par effet de matrice (ou interférences non-spectroscopiques) ne sont pas générées par la détection d'ions ou de complexes ioniques avec des rapports m/z proches des ions ciblés par les analyses, mais agissent en limitant ou amplifiant la transmission des ions dans l'ICP-MS. Il existe un large spectre de phénomènes physico-chimiques pouvant causer des effets de matrices, ces derniers pouvant intervenir dans la solution à analyser, dans le système de nébulisation et de désolvatation, au moment de l'ionisation des éléments dans le plasma, ou durant le trajet des ions depuis le plasma jusqu'aux détecteurs (voir review par Agatemor et Beauchemin, 2011). À titre d'exemple, introduire de nouveaux éléments chimiques dans une solution peut affecter la formation des aérosols par le nébuliseur et le désolvateur, changer la composition de ces aérosols, faire baisser la température du plasma ou ses performances d'ionisation, contribuer à la formation de dépôts sur les cônes limitant le passage du faisceau ionique, ou encore changer la forme du faisceau ionique lors de son trajet jusqu'aux détecteurs (Pietruszka et Reznik, 2008

; Fontaine et al., 2009 ; Agatemor et Beauchemin, 2011). Quantifier les effets de ces différents phénomènes sur les mesures de rapports isotopiques est une tâche complexe, notamment parce qu'un même élément chimique peut entraîner une combinaison de ces phénomènes. Une des méthodes d'investigation classiquement mise en place pour quantifier le résultat final de ces effets de matrice consiste à doper des solutions de composition isotopique connue avec différentes quantités de l'élément dont on souhaite connaître l'influence (e.g. Lanping et al., 2018 ; He et al., 2019 ; Bao et al., 2020 ; Le Goff et al., 2021). Cette méthode permet d'ailleurs également d'explorer la sensibilité des mesures à certaines interférences isobariques. Ces techniques peuvent mettre en évidence des seuils de proportion entre élément interférant et élément cible à partir desquels des effets de matrice significatifs se manifestent (Bao et al., 2020 ; Le Goff et al., 2021). Pour le cas des mesures de rapport isotopique du Ca, de tels effets de matrice avaient été détectés pour le Fe, ce qui justifiait une étape de purification supplémentaire lorsque le Fe était présent en quantité importante (voir section A.1 et Tacaïl et al., 2014). Or ce paramètre est important à considérer étant donné les proportions importantes de Fe contenues dans certains échantillons (e.g. sang et de tissus mous). Au début de ma thèse, le seuil de proportion en Fe à partir duquel ces effets de matrice se manifestaient étaient peu documentés, ce qui justifiait de mener des expériences de dopages. Par ailleurs, l'enrichissement occasionnel en éléments majeurs et traces de certains fossiles par rapport aux matériaux biologiques classiques (e.g. Fe, Mg, Mn et K: Kohn et al., 1999 ; Hassler et al., 2018) justifiait de tester les effets de matrice et d'interférences isobariques de ces éléments. Ces tests permettent notamment de simuler un scénario où le protocole de purification laisserait passer une certaine fraction de ces éléments.

Pour réaliser ces dopages, des solutions de standard ICP Ca Lyon avec une concentration de 1,25 mg/l de Ca (milieu : HNO<sub>3</sub> 0,05 M) ont été mélangées à des quantités variables de Fe, Mg, Mn et K. Les rapports isotopiques du Ca de ces solutions dopées ont ensuite été analysés par MC-ICP-MS en suivant le protocole décrit dans les sections précédentes. Les solutions dopées sont analysées en tant qu'échantillons encadrés par deux mesures de standard de bracketing (i.e. des solutions d'ICP Ca Lyon non dopées). Les résultats de ces analyses sont présentés en figure II.7. Ces derniers démontrent que ces quatre éléments affectent nos mesures de rapports isotopiques du Ca au-delà d'une certaine

concentration. Dans le cas du Fe, les mesures de rapports isotopiques semblent biaisées lorsque le rapport Fe/Ca de l'échantillon est supérieur à  $6,7 \times 10^{-3}$  avec des écarts de valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  mesurées qui dépassent  $-0,15 \text{ ‰}$  au-delà d'un rapport Fe/Ca de 0,01. Il convient donc de réaliser l'étape de purification du Fe (résine AG1-X8, section II.A.5) lorsque le rapport Fe/Ca de l'échantillon dépasse ce seuil de  $6,7 \times 10^{-3}$ . Les dopages en Mg montrent eux aussi des effets sur les mesures de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  avec un décalage net de l'ordre de  $+0,12 \text{ ‰}$  pour un rapport Mg/Ca de 0,02. Toutefois, les mesures de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  deviennent déjà suspectes au-delà d'un Mg/Ca de 0,004. Les effets des contaminations en Mn ne sont pas monotones puisque des rapports Mn/Ca supérieurs à 0,01 peuvent biaiser positivement ou négativement les valeurs de  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  et de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  selon le rapport Mn/Ca considéré (de l'ordre de  $-0,1 \text{ ‰}$  de valeur de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  pour un Mn/Ca de 0,02, et de  $+0,2 \text{ ‰}$  pour un Mn/Ca de 0,2). Enfin le K



**Figure II.7 – Effets de dopages élémentaires sur les mesures de valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  et  $\delta^{43/42}\text{Ca}$ .** Les carrés rouges représentent des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$ , les points bleus représentent des valeurs de  $\delta^{43/42}\text{Ca}$ . La droite noire représente les valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  et de  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  théoriques de la solution non dopée, la zone grisée représentant un intervalle de confiance autour de cette valeur de l'ordre de  $\pm 0,05 \text{ ‰}$ . Les barres d'erreurs de chaque point représentent l'intervalle de confiance autour des mesures, avec un intervalle de confiance minimum établi par la méthode de bootstrap décrite dans la section précédente et un intervalle de confiance maximum correspondant au 2 se autour des mesures (lorsque le 2 se est supérieur à l'intervalle minimum). Les solutions dopées sont des solutions d'ICP Ca Lyon avec une concentration en Ca de 1,25 mg/l. **Effects of elemental doping on measures of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  and  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  values.** Red squares represent  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values and blue dots represent  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  values. The black line represents the theoretical  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  and  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  values, with the shaded grey area representing a confidence interval of  $\pm 0.05 \text{ ‰}$  around these values. Error bars around each measured  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  and  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  values represent the minimum confidence interval established with the bootstrap method described in the previous section, or to the 2 se interval of the measures when the 2 se interval is larger than the minimum interval. Doped solutions are ICP Ca Lyon solutions with a Ca concentration of 1.25 mg/l.

semble peu affecter les mesures de  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  et de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  jusqu'à un rapport K/Ca de 0,02, mais produit un biais de mesure important au-delà (jusqu'à -0,74 ‰ pour un K/Ca de 0,2). Dans l'ensemble, ces analyses nous permettent d'avoir un meilleur recul sur la sensibilité de nos mesures de rapports isotopiques du Ca en fonction des pollutions par ces quatre éléments. Ces données sont particulièrement utiles pour pouvoir juger de la nécessité de réaliser l'étape de purification du Fe lors de la procédure de purification du Ca par chromatographie sur colonne à résine échangeuse d'ions. Il est en outre intéressant de constater que les seuils des rapports élémentaires à partir desquels nos mesures de rapports isotopiques du Ca sont biaisés sont différents de ceux documentés par Bao et al., 2020 pour le Fe et le Mg. En effet, cette équipe n'observe pas de différences majeures dans leurs mesures de  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  et de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  jusqu'à des rapports Fe/Ca et Mg/Ca de 0,1. Leur méthode d'analyse est différente de la nôtre en de nombreux points, bien que le spectromètre utilisé soit le même (Neptune plus®). Il est donc difficile d'identifier la ou les causes derrière ces différences de sensibilité aux pollutions. Il est toutefois probable qu'une partie au moins de ces divergences résulte des différences de mode d'introduction des échantillons (plasma humide contre plasma sec) et des différences de concentration en Ca dans les échantillons analysés, cette dernière étant de l'ordre de 5 mg/l pour Bao et al., 2020 contre 1,25 mg/l dans le cadre de nos analyses. En effet, ces deux paramètres peuvent jouer un rôle important dans les effets de matrice (Agatemor et Beauchemin, 2011). Par ailleurs, ces divergences soulignent à quel point il est important de réaliser des tests de dopages dans les mêmes conditions analytiques que celles de routine, sans quoi il est impossible d'estimer des seuils limites de rapports élémentaires qui soient réellement représentatifs de la sensibilité des mesures.



# Chapitre III - Cycle de reproduction et fractionnements isotopiques du Ca

## *A. Introduction*

Comme présenté en introduction, il était suggéré que les différences de composition isotopique du Ca observées entre mâles et femelles d'une même population de moutons domestiques pouvaient être causées directement ou indirectement par la gestation et/ou la lactation (Reynard et al., 2010). Il était cependant nécessaire de clarifier l'influence relative de ces deux phénomènes sur les compositions isotopiques de l'organisme, de cerner quels étaient les changements de flux de Ca responsables de ces différences isotopiques, et d'intégrer ces différents paramètres dans un modèle complet et à jour du cycle isotopique du Ca chez les mammifères. L'étude présentée dans ce chapitre a été conçue dans le but de résoudre ces différentes questions, et avec pour ambition de proposer une base théorique permettant d'estimer si les mâles et les femelles d'une espèce de mammifère donnée étaient susceptibles de présenter ou non des différences isotopiques du Ca enregistrées dans leurs os ou leurs dents. Cette étude inclut une base expérimentale se basant sur les méthodes décrites dans le chapitre II, et une base de simulation numérique portant sur un modèle de boîte dynamique simulant l'évolution de la composition isotopique du Ca d'un mammifère.

## *B. Résumé*







La lactation et la gestation sont parmi les événements physiologiques qui s'accompagnent des changements les plus intenses de flux de Ca dans l'organisme. En parallèle de la composition isotopique du régime alimentaire de l'animal, ces événements sont suspectés d'impacter la composition isotopique des réservoirs de Ca de l'organisme (e.g. os, sang), mais la dynamique de ces changements reste encore mal connue. Dans cette étude, nous avons réalisé le suivi d'un groupe de cochons domestiques femelles (*Sus scrofa domesticus*) au cours d'un cycle de reproduction complet (i.e. de l'insémination au sevrage des petits). Au cours de ce suivi, nous avons collecté un ensemble de tissus et de fluides biologiques à différentes étapes de la gestation et de la lactation (sang, urine, lait,



colostrum, sang ombilical, ossements des adultes en fin d'expérimentation, et ossements de porcelets décédés avant le sevrage), échantillons dont nous avons analysé les compositions isotopiques du Ca (i.e.  $\delta^{44/42}\text{Ca}$ ) par méthode MC-ICP-MS. Parmi d'autres résultats, cette étude rapporte les premières observations de fractionnement isotopique du Ca entre le sang maternel et le sang ombilical ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{sang ombilical-sang maternel}} = -0,18 \pm 0,11 \text{ ‰}$ ,  $n = 3$ ). Les résultats de cette expérimentation suggèrent également que les périodes de gestation et de lactation se caractérisent par des fractionnements isotopiques du Ca entre alimentation et os moins marqués que ce qui est classiquement observé chez les mammifères ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{os-alimentation}} = -0,28 \pm 0,11 \text{ ‰}$ ,  $n = 3$ ), avec des compositions isotopiques du sang particulièrement enrichies en  $^{44}\text{Ca}$  durant l'allaitement ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{sang allaitement-gestation}} = +0,42^{+0,11}_{-0,12} \text{ ‰}$ ,  $n = 3$ ). A la lumière d'un modèle de boîte numérique constitué des différents réservoirs de Ca d'un animal simulé s'apparentant à un cochon domestique, nous avons exploré les conséquences de différents scénarios de flux de Ca représentatifs des flux réels vécus par les cochons domestiques lors de la gestation et de la lactation. Ces simulations suggèrent que les changements isotopiques associés à la gestation pourraient provenir de l'augmentation de la consommation et de l'absorption de Ca par l'animal. Pour la lactation, elles suggèrent que c'est la production de lait relativement appauvrie en  $^{44}\text{Ca}$  qui génère l'enrichissement relatif en  $^{44}\text{Ca}$  dans le sang. Par ailleurs, les résultats suggèrent également que la minéralisation de l'os pourrait être associée à un fractionnement isotopique de plus faible amplitude que suggéré précédemment. En conclusion, ces résultats éclaircissent le cadre des applications possibles de l'étude des isotopes du Ca, notamment en ce qui concerne les méthodes de suivi de la balance osseuse chez l'homme (e.g. diagnostique de pertes osseuses, ostéoporose) et l'étude des espèces et des écosystèmes du présent et du passé.

*C. Article : Lactation and gestation controls on calcium isotopic compositions in a mammalian model*

# Lactation and gestation controls on calcium isotopic compositions in a mammalian model

Auguste Hassler <sup>1,\*</sup>, Jeremy E. Martin <sup>1</sup>, Stéphane Ferchaud<sup>2</sup>, Doryan Grivault<sup>2</sup>, Samuel Le Goff <sup>1</sup>, Emmanuelle Albalat <sup>1</sup>, Jean-Alexis Hernandez<sup>3</sup>, Théo Tacail <sup>4</sup> and Vincent Balter <sup>1</sup>

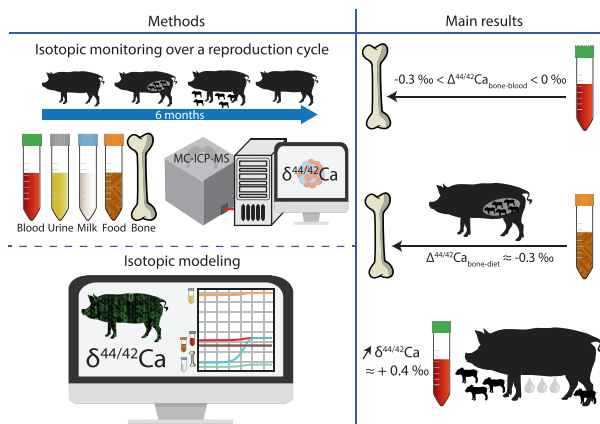
<sup>1</sup>Univ Lyon, ENSL, Univ Lyon 1, CNRS, LGL-TPE, F-69007 Lyon, France, <sup>2</sup>GenESI, INRA, Rouillé, France, <sup>3</sup>Center for Earth Evolution and Dynamics, University of Oslo, N-0315 Oslo, Norway and <sup>4</sup>Bristol Isotope Group, School of Earth Sciences, University of Bristol, Bristol BS8 1RJ, UK

\*Correspondence: 1 rue du Brigadier Voituret 69007 Lyon, France. E-mail: [auguste.hassler@ens-lyon.fr](mailto:auguste.hassler@ens-lyon.fr)

## Abstract

Lactation and gestation are among the physiological events that trigger the most intense changes in body calcium (Ca) fluxes. Along with the composition of the animal diet, these events are suspected to impact the Ca isotopic composition of Ca body reservoirs but their dynamics are poorly understood. In this study, we monitored a group of domestic sows across a full reproduction cycle. We collected tissues and fluids (blood, urine, milk, colostrum, umbilical blood, adult and piglet bones) at different steps of gestation and lactation, and analyzed their Ca isotopic compositions (i.e.  $\delta^{44/42}\text{Ca}$ ) by means of multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. Among other results, we report the first observations of Ca isotopic fractionation between maternal and umbilical blood ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{umbilical blood-sow blood}} = -0.18 \pm 0.11\text{‰}$ ,  $n = 3$ ). Our data also highlight that gestation and lactation periods are characterized by small diet-bone Ca isotopic offsets ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}} = -0.28 \pm 0.11\text{‰}$ ,  $n = 3$ ), with  $^{44}\text{Ca}$ -enriched blood compositions during nursing ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{nursing blood-gestation blood}} = +0.42 \pm 0.11\text{‰}$ ,  $n = 3$ ). Under the light of an up-to-date mammalian box model, we explored different scenarios of gestation and lactation Ca fluxes experienced by a sow-like animal. These simulations suggest that gestation changes on body  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values may result from the intensification of Ca absorption by the animal, whereas the production of  $^{44}\text{Ca}$ -depleted milk is the main driver for the  $^{44}\text{Ca}$  enrichment in blood during lactation. In addition, our results also support that bone mineralization could be associated with a more restricted Ca isotopic fractionation than previously envisioned. Together, these results refine the framework of Ca isotope applications, notably regarding the monitoring of human bone balance and the study of species and ecosystems from the present and the past.

## Graphical abstract



Combining experimental and modeling approaches allows to document changes in body  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values and to identify their physiological causes. The results support an update of the model of Ca isotopic fractionation in mammals, notably by suggesting a limited isotopic fractionation at bone mineralization and a reduced bone-diet isotopic offset during gestation. Finally, this study highlights that milk production is the main driver of blood increase in  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values during nursing, as well as the cause of male/female differences of Ca isotopic composition observed in some mammal populations.

## Introduction

There is evidence that the calcium (Ca) isotopic composition of mammal bone and teeth is controlled by diet, but other phys-

iological parameters might also be at play and the cycling of Ca and its isotopic fractionation in the body is far from being fully understood.<sup>1-17</sup> Among dietary inputs, milk is highly

depleted in heavy Ca isotopes relative to adult diet ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{milk-diet}} = -0.6\%$ )<sup>6</sup>; the consumption of milk affects the Ca isotopic composition of juvenile teeth, which can be used to document weaning ages and nursing practices.<sup>8,18,19</sup> Nevertheless, the production of milk (lactation) and possibly gestation seem to affect bone and blood Ca isotopic compositions of breeding females,<sup>7,17</sup> notably by generating male versus female differences in bone Ca isotopic composition ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{females-males}} = +0.14 \pm 0.08\%$ ).<sup>7</sup> Until now, this phenomenon has only been described for sheep, whereas there is no evidence of such sexual difference in human populations.<sup>7,16</sup> It may not be surprising that different mammal species display different sexually-driven isotopic differences due to their physiological and behavioral differences. However, this observation calls for further investigations on other mammal species and, more essentially, on physiological factors at play to generate these sexually-driven isotopic differences. Improving our knowledge about the mammalian Ca isotope cycle is motivated both by the development of biomedical innovations based on Ca isotope measurements<sup>14,20–24</sup> and potential applications in paleoanthropology and paleontology.<sup>1–3,6–8,18,19,25,26</sup> For example, new methods for bone balance and osteoporosis monitoring depend upon an accurate description of the Ca isotope cycle.<sup>14,20–24</sup> Besides, sexually driven Ca isotopic differences could help in detecting sex or past lactation events from teeth or bones, if their causing factors could be further constrained and quantified.<sup>7</sup> This would be a great opportunity for paleontologists as these are challenging to detect by other means. Finally, clearly identifying the range of action of these factors seems to be a necessary step to accurately reconstruct dietary preferences from Ca isotopic compositions within mammalian faunas.<sup>1,3–5,7,15</sup>

The hypothesis that sexual differences of bone Ca isotopic compositions originate from gestation, lactation, or both arises from experiments and modeling, which suggest important Ca isotopic fractionation during milk production (notably inferred from the  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{milk-diet}}$  of  $-0.6\%$ )<sup>6</sup> and bone mineralization<sup>2,6,7,10,13,17</sup> (notably inferred from the  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$  of  $-0.57 \pm 0.10\%$ ,  $n = 21$ ; see review from Tacail *et al.*<sup>2</sup>). In this scenario, milk is enriched in light Ca isotopes relative to blood, and bone growth associated with gestation preferentially favors light Ca isotopes during the mineralization process.<sup>7</sup> However, later studies have highlighted that fractionation of Ca isotopes also occurs during urine formation through the reabsorption of Ca from primary urine by kidneys,<sup>10,21–23,27,28</sup> as evidenced by differences between blood and urine  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{urine-blood}} = +1.15 \pm 0.06\%$ ,  $n = 29$ ).<sup>10,11,21,23</sup> In parallel, small differences between blood and bone Ca isotopic compositions in humans, sheep, and rats<sup>11,27</sup> (i.e.  $\leq 0.3\%$ ) and new modeling integrating Ca urinary fractionation in normal conditions (i.e. without gestation- or lactation-related Ca fluxes; see Tacail<sup>11</sup>) also suggest a reevaluation of Ca fractionation amplitude at bone mineralization.<sup>2,11</sup> It is thus necessary to integrate these findings in updated models in order to unravel the underlying causes behind the observed sexual differences in Ca isotopic composition, as well as to provide guidance for future investigations of such gestation and lactation signals. It is also essential to widen the spectrum of mammals for which such difference is documented experimentally in order to test modeling predictions. The aim of this study is to address both of these aspects, by documenting the effects of gestation and lactation on Ca isotopic composition in the domestic pig, *Sus scrofa domesticus*, and by comparing these data with stable isotope box models that consider urinary isotopic fractionation along with other fractionation processes described so far for Ca.

To achieve these objectives, we designed a breeding and feeding experiment consisting of a close monitoring of three adult sows

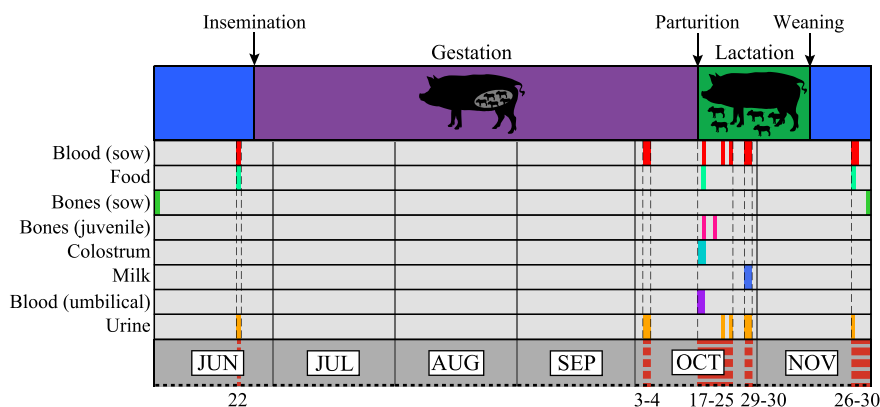
during a full reproduction cycle. Over the 6 months of the experiment, samples including blood, urine, milk, colostrum, umbilical blood, and bone have been collected while maintaining a diet with a stable Ca isotopic composition. This controlled environment allows us to identify the physiological drivers of Ca isotopic compositions in body reservoirs at each step of the reproduction cycle. Our sampling procedure allows us to compare the Ca isotopic composition of different body reservoirs at rather high temporal resolution, and to monitor the evolution of their respective Ca isotopic composition before, during, and after gestation and lactation periods. Attention was also given to the juveniles of these three individuals, notably to their weight, in order to estimate Ca transfers during gestation and milk production. Shortly after parturition, two piglets from other females living in the same conditions unfortunately died. We sampled the bones of these two individuals and measured their Ca isotopic composition in order to assess the isotopic fractionation occurring between mother and offspring bones during gestation. Using these results and literature data about pig Ca cycle during reproduction, we performed different box model simulations to compare with our experimental data. Finally, we use these comparisons to identify the main drivers of Ca isotopic fractionation in the body, and compare our findings with previous studies from pig, deer, mice, rat, sheep, and human.<sup>6,7,10,11,16,17</sup>

## Materials and methods

### Animal monitoring and sampling

The use of animals for scientific purpose has been authorized in accordance with the French rural and sea fishing code, notably following the articles R.214-87 and R.214-126. The ethical approval was given to the project (referenced as APAFIS#13631-2018021417118920 v3) by the ethics committee of animal experimentations No. 084. Sampling procedures have been designed to minimize animal stress and to be the least invasive possible. Moreover, this study has been grafted to an already going agronomic study, therefore preventing supplementary animal use.

The three monitored sows (C1, C2, and C3) were crossbred Landrace Français and Duroc breeds, raised within the unit of Genetic experimentation and innovative systems (GenESI) of the French National Institute for Agriculture, Alimentation and Environment Research (INRAE), in the facility of la gouvanière (Rouillé 86480, France; DOI: 10.15454/1.5572415481185847E12). Two were at their second breeding cycle (C1 and C3 individuals); another was at its third breeding cycle (C2). The experiment started 12–14 days after the weaning of a previous litter, a breeding cycle conducted within the same environment with a similar diet made up of a mix of barley, corn, wheat, sunflower, rapeseed, beets, sugar cane, calcium carbonate as well as other minor ingredients constituting  $\sim 1\%$  of the mix (e.g. sodium chloride and sodium bicarbonate). The return to estrus during this 14-day period has been artificially delayed by administrating Régumate® to sows for about the first 10 days after weaning. One other individual (C8) living in the same conditions died from an unidentified cause between the experiment and the previous breeding cycle. We collected one of its phalanges to perform comparative bone analyses. The blood, urine, colostrum, milk of sows and umbilical blood from their piglets were collected at five key moments of their reproduction: 3 days before the insemination, during the last month of gestation, shortly after parturition, during nursing, and 14 days after weaning (Fig. 1). At each step, bio-fluids were collected with the intention to minimize the time lapse between each collection, in order to maximize the comparability between samples from Ca reservoirs with small Ca residence time. To the same end, all



**Fig. 1** Sampling time chart. Key steps and periods within the reproduction cycle of monitored specimens are represented at the top of the figure. Sampling operations have been essentially conducted during five key periods represented as dashed red area in the time chart and delimited by dashed lines. Starting and ending dates of these periods are indicated at the bottom of the time chart. From left to right these periods are representing: pre-insemination conditions, the last month of gestation, the post-parturition period, nursing and post-weaning conditions. Each sampling that leads to a  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  measure is represented by a colored bar.

sampling sessions were carried in the morning, before the first meal and after at least 8 h of fasting. This procedure allows to minimize short-term impacts of food intakes on Ca isotopic compositions of body reservoirs. We maintained the same food supply and performed food samplings during the duration of the experiment to monitor the isotopic variability of sow Ca intakes.

Sampling sessions were conducted as follows. On sampling days, light was switched on manually at the arrival of the collecting team, under the supervision of S. Ferchaud and D. Grivault. Urines were preferably collected with the first urination of the day, as an attempt to limit the impact of urine isotopic variability over daytime and because 24-h urine collections were not achievable. Urines were collected in Falcon® tubes (50 ml, REF 352070) without the first milliliters of the urination, then transferred in 2-ml polypropylene (PP) tubes and stored in a freezer. This step requires a close monitoring of sows to achieve the collection, a success upon which subsequent samplings were initiated or not. For blood collection, adult individuals were immobilized and blood was collected from the jugular vein using lithium heparin tubes without gel (BD Vacutainer®, REF 367526). Blood samples were centrifuged, then the plasma was collected and transferred in PP tubes prior to be store-frozen. Because almost all the Ca from the blood is contained within the plasma,<sup>11,29-31</sup> plasma and total blood Ca compositions are considered to be identical in this article. At parturition, umbilical blood was collected from umbilical cords in heparin tubes without gel (BD Vacutainer®, REF 367526). The umbilical plasma has been collected after centrifugation and stored in the same conditions as regular plasma. At parturition and 14 days after parturition, respectively, 4 ml of colostrum and 2 ml of milk were collected from each individual. These collections were achieved in PP tubes by operating a massage of the udder. No hormonal injection was carried on in that purpose. Fourteen days after the weaning of their offspring and after a last round of sampling, studied animals were slaughtered to join the traditional circuit of pork meat distribution. Their skulls were collected, boiled in water, and manually cleaned to allow bone sampling from their mandible using a handled drill (8200 Dremel with tungsten steel solid carbide bit).

### Weight and milk production estimates

We estimated the weight of the three studied sows based on the average weight recorded for their congeners in the INRAE GenESI facility. At weaning of their second lactation, sows from the same

breed weigh  $199.3 \pm 17.1$  kg ( $n = 117$ ,  $\pm$ standard error) on average, while weighing an average of  $213 \pm 20$  kg ( $n = 100$ ,  $\pm$ standard error) after their third lactation. This is similar to what is documented in Dourmad *et al.*<sup>32</sup> and Giesemann *et al.*,<sup>33</sup> who support that Ca reservoir sizes and Ca fluxes reported in these studies are of the same order of magnitude as for the individuals of our experiment. At birth, piglets were weighed to estimate the amount of Ca they received from their mother during gestation. This estimation is based on the assumption that dry bone represents  $\sim 4.88\%$  of their total body mass (mean calculated from two newborns of the same breed) and that Ca accounts for  $\sim 26.58\%$  of bone mass (extrapolated from cow bone meal reference material the National Institute of Standards and Technology (NIST) SRM1486). After birth, litters were rearranged between sows from within and outside the experiment, in order to equilibrate the number of piglets per sow and guarantee healthy growth conditions. The piglet mass gain at weaning is thus calculated while including all piglets (native and adopted) nursed per each sow, by subtracting their weight at birth from their weight at weaning. This piglet daily weight gain (referred to as GMQ to match the notation of Etienne *et al.*<sup>34</sup>) is used to calculate the piglet daily intake of milk dry fraction (referred to as MS to match the notation of Etienne *et al.*<sup>34</sup>) using the following formula:  $\text{MS} = 0.72 (\pm 0.07) \times \text{GMQ} - 7$ , where MS and GMQ are expressed in gram/piglet/day.<sup>34</sup> Considering an average sow milk dry mass fraction of  $18\%$ <sup>34,35</sup> allows to estimate sow average milk daily production. Five piglets died between birth and weaning with a noticeable weak body condition. Their puny state at death supports that they consumed limited amounts of milk and that their body mass can be neglected in the calculation of milk production.

### Sample preparation and chromatography

Complementary details regarding equipment and cleaning procedures used in this study can be found in Appendix A.1 (Supplementary Information); the following section focuses on the operations performed on samples, blanks, and reference materials. Prior to chromatography and concentration analyses, blood, colostrum, milk, and food samples have been freeze-dried, homogenized in an agate mortar, weighed, and placed in perfluoroalkoxy (PFA) beakers (Saville®). Urine samples have been unfrozen and homogenized, and  $500 \mu\text{l}$  of each were collected in PFA beakers. Bone powders collected from mandibles were weighed and placed in PFA beakers prior to digestion. Further

manipulations were carried exclusively in a clean lab (unregistered ISO class), under a laminar flux hood (absolute filter H14) to avoid environmental contamination. After being placed in PFA beakers, samples were mixed with 10 ml of distilled nitric acid (15 M, Fisher Scientific®, Primar plus®—Trace analysis grade, in-house distilled) and 1 ml of 30% Suprapur hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fisher Chemical®, Hampton, NH, USA) to start digestion. Samples were left at ambient temperature for 1 h, then placed on a hotplate at 160°C for 2 days, and evaporated to dryness. All along this procedure, we performed periodic beaker degassing to avoid critical overpressure. This procedure was repeated at least three times, until complete mineralization of samples. The complete digestion of the organic matter was assessed by monitoring H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effervescence. Digested and evaporated samples were dissolved in 0.5 M distilled HNO<sub>3</sub> (Fisher Scientific®, Primar plus®—Trace analysis grade, in-house distilled), a fraction of which was kept for concentration analyses. The rest has been evaporated to dryness, dissolved in 6 M distilled hydrochloric acid (Fisher Scientific®, laboratory reagent grade, in-house distilled), and evaporated again prior to chromatography.

The chromatography procedure used for Ca chemical purification is derived from Tacail *et al.*<sup>27</sup> and Le Goff *et al.*<sup>36</sup> It consists in a triple column chromatography, starting with an elution on AG 1-X8 resin to discard elements such as Zn and Fe, followed by an AG 50WX-12 resin to isolate Ca and strontium (Sr) from the matrix, and by an elution on Eichrom Sr-specific resin to isolate Ca from Sr. This procedure is detailed in Table B.1 (Supplementary Information). Blanks have been monitored all along digestion and chromatography processes (i.e. total and chromatography blanks) to control for Ca contamination levels. The use of heparin tubes for blood collections (BD Vacutainer®, REF 367526, lithium heparin) is associated with additional Ca contaminations. To estimate this contamination, we filled a heparin tube of Milli-Q (Millipore®, initial resistivity = 18 MΩ.cm at 25°C) during 1 h at ambient temperature, and analyzed its Ca concentration by means of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

## Analytical procedures

Elemental concentrations have been measured on an inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (ICP-AES, model ICAP 7400 Series, Thermo Scientific®), with the exception of the Ca content of heparin tubes, which has been measured by means of an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS, model iCAP Q, Thermo Scientific®). The reliability of measurements has been controlled through a set of blanks and reference materials, as well as by replicating measures at least twice for each sample.

We measured Ca isotopic ratios (<sup>44</sup>Ca/<sup>42</sup>Ca and <sup>43</sup>Ca/<sup>42</sup>Ca) using a multi-collector ICP-MS (MC-ICP-MS, Neptune Plus, Thermo Scientific®) following the method described in Tacail *et al.*<sup>27</sup> Prior to Ca isotopic analyses, Ca purified samples were dissolved in distilled 0.05 M HNO<sub>3</sub> in order to set the Ca concentration at 1.25 mg/l. This concentration matches the concentration of our in-house bracketing standard, a Specpure Ca plasma standard solution (Alfa Aesar) named ICP Ca Lyon and described in previous studies.<sup>1,9,18,27</sup> Calcium isotopic compositions reported in this article are all expressed as  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values calculated based on this reference material and the following formula (unless explicitly mentioned):

$$\delta^{44/42}\text{Ca} = \left( \frac{(44\text{Ca}/^{42}\text{Ca})_{\text{sample}}}{(44\text{Ca}/^{42}\text{Ca})_{\text{ICP Ca Lyon}}} \right) - 1, \quad (1)$$

with  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values given in ‰. For more comparability with studies from other laboratories, the  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  values are also expressed as  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{SRM915a}}$  in tables and figures. Based on 71 measures synthesized in the appendix of Martin *et al.*,<sup>3</sup> we converted  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  values to  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{SRM915a}}$  values by adding +0.518‰ to  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  values. This conversion is associated with a wider uncertainty interval corresponding to +0.025‰ of the uncertainty around  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  values (error bars within figures reflect uncertainties around  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  values only). We used the SRM1486, a cow bone meal reference material from NIST, as a secondary standard to assess the reproducibility of the ion-exchange chromatography procedure, as well as to monitor the accuracy of MC-ICP-MS measures. Blank Ca concentrations have also been measured using the Neptune Plus MC-ICP-MS. All samples and reference material measurements have been replicated at least three times (Table B.6, Supplementary Information).

Differences between Ca isotopic compositions are expressed as  $\Delta^{44/42}\text{Ca}$ , following the formula:

$$\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{X-Y}} = \delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{X}} - \delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{Y}}, \quad (2)$$

where X and Y refer to different samples or Ca isotope reservoirs. For calculating  $\Delta^{44/42}\text{Ca}$  values between sample types (e.g. blood, urine) at the scale of several individuals or sampling steps (e.g. the average  $\Delta^{44/42}\text{Ca}$  value between blood and urine samples), the terms  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{X}}$  and  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{Y}}$  can simply be replaced by the mean  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of Ca reservoirs X and Y. Uncertainties expressed around  $\Delta^{44/42}\text{Ca}$  values are the sum of the uncertainties of  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{X}}$  and  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{Y}}$ . When a Ca flux connects two Ca reservoirs, the isotopic fractionation associated with this flux can be expressed as an isotopic fractionation factor  $\alpha$ , calculated as follows:

$$\alpha_{\text{X-Y}} = \frac{\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{X}} + 1000}{\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{Y}} + 1000}, \quad (3)$$

which can be approximated as

$$1000 \times \ln(\alpha_{\text{X-Y}}) \approx \delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{X}} - \delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{Y}} \quad (4)$$

where X and Y refer to different Ca isotope reservoirs connected by the Ca flux associated with the isotopic fractionation factor described by  $\alpha_{\text{X-Y}}$ .

## Accuracy and precision of Ca isotopic compositions

For more clarity in the following sections, the *n* notation refers to a number of samples or specimens, whereas the *n*\* notation specifically refers to number of replicates for a given measurement. Replicating Ca isotope measurements allows us to estimate the range of analytical precision of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values. The correlation between  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  and  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values for samples and reference materials follows the trend expected from an exponential fractionation law,<sup>37</sup> with a slope value of  $0.502 \pm 0.007$  (2 s.e.), an intercept of  $-0.003 \pm 0.005$  (2 s.e.), an  $R^2 = 0.997$  and a *P*-value of  $<0.001$  (Fig. C.1, Supplementary Information). This demonstrates that no mass independent fractionation or mass isobaric interference affect these measurements. Across the 6 days of analytical session with the MC-ICP-MS, the reference material SRM1486 exhibited a mean  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of  $-1.01 \pm 0.01\%$  (2 s.e.; *n* = 37), which is undistinguishable from previously published data for this reference material.<sup>3,18,38,39</sup> All these data support that the Ca isotopic compositions we measure are not



biased by the ion-exchange protocol and MC-ICPMS setup, and that the measured Ca isotopic compositions are accurate.

For our bracketing standard (ICP Ca Lyon), blanks collected during the Sr purification step<sup>27</sup> represent ~100 ng of Ca, a negligible pollution at the scale of the 4 mg of Ca contained in the solution. For samples and SRM1486, chromatography blanks contain between 52 and 181 ng of Ca (~100 ng of Ca in average), while blanks monitoring environmental contaminations during the MC-ICP-MS session contain <10 ng of Ca. Heparin tubes can add  $273 \pm 35$  ng of Ca (2 s.e.,  $n^* = 2$ ) to blood samples. For the majority of our samples, these blank levels are negligible compared with the amount of Ca contained in samples; only five samples containing limited amounts of Ca could have been notably affected. Uncertainty estimations and corresponding error bars have been extended accordingly (Table B.6, Supplementary Information). Equations behind uncertainties presented in this paper are described in details in Appendix A, Text A.2 (Supplementary Information).

## Box model

In order to identify the mechanisms behind the distribution of Ca isotopic compositions in the body, we performed several simulations of a Ca box model using the Isopybox program. This Python-coded program derives from a code used in previously published work.<sup>40</sup> It iteratively calculates the evolution of isotopic compositions within interacting reservoirs of a given isotopic system.<sup>11</sup> In its current version, Isopybox allows to solve steady-state box model, study the relaxation time of a system in response to a discrete perturbation, and study the isotopic evolution of a system with unbalanced fluxes (provided that no box will be emptied during the duration of the run). The program and its resources are accessible on Github at the following address: <https://github.com/ttacaill/isopybox.git>.

The conception of the model is described and discussed in further details in Appendix A, Text A.3 (Supplementary Information) and Tables B.2, B.3, and B.4 (Supplementary Information). In a few words, this model is a box model designed to simulate the Ca isotopic composition ( $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$ ) of a sow-like animal based on plausible Ca reservoir sizes, Ca fluxes, and Ca isotopic fractionation factors. We modeled different scenarios of Ca fluxes and isotopic fractionation factors for the animal. First, we simulated a gestation without Ca transfer to fetuses (Ca gain is transferred from extracellular fluids to the waste box with no isotopic fractionation). This simulation (referred to as GestFF for Gestation Fetus Free) is purely conceptual but stays quite representative of the average conditions of a domestic sow, as the Ca transfer to fetuses intensifies only toward the last third of the gestation period, and that they generally have small nursing periods and recovery time between weaning and new insemination. The second simulation is similar to the first one but includes Ca transfer to fetuses (referred to as GestR for Gestation Regular). This last aim is to represent a sow toward the end of a gestation, when Ca transfer to fetuses is intense. The third and fourth simulations (LactA, LactB) represent a lactation scenario without bone loss, with relatively high (LactA) and low Ca dairy excretion (LactB). Finally, we tested the influence of Ca absorption (i.e. the amount of Ca transferred from the digestive tract to the blood) on body Ca isotopic compositions. This test is a series of simulations that use the basis of the GestFF scenario with different Ca absorption levels, respectively, 75%, 50%, and 25% of GestFF Ca fluxes from digestive tract to blood. In addition to these scenarios, we tested additional configurations of Ca fluxes and Ca isotopic fractionation factors in

order to assess the sensitivity of the model to these parameters. Monitored parameters include: the coefficient of Ca isotopic fractionation at bone mineralization, the degree of bone loss, the ratio between Ca absorption and excretion (i.e. by digestive secretions), and the ratio between urinary and endogenous Ca losses. These last scenarios and associate results are further described in Appendix A, Text A.3 (Supplementary Information) and Figs C.5, C.6, and C.7 (Supplementary Information).

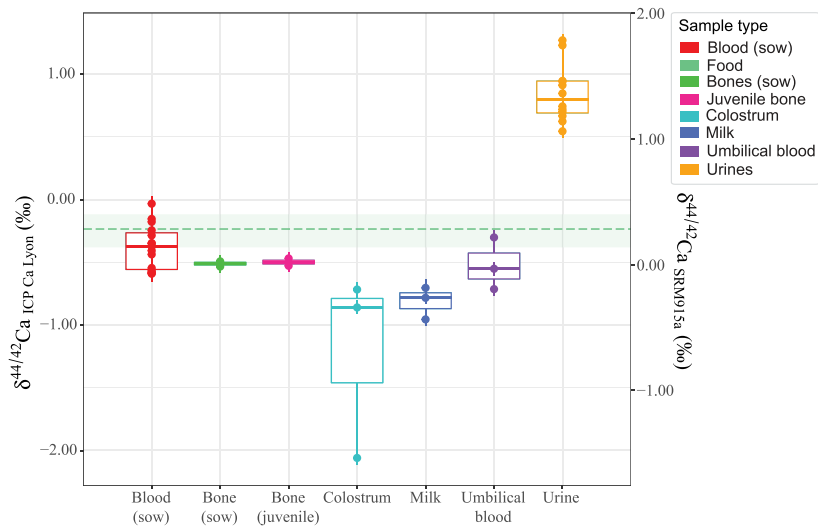
## Results

### Zootechanical data

Zootechanical data for sows (e.g. litter size, weaning age, quantity of milk produced) from this study are reported in Table B.5 (Supplementary Information). Estimations of sow body masses fall within the range of body masses reported for other porcine specimens studied by Dourmad *et al.*<sup>32</sup> and Giesemann *et al.*<sup>33</sup> The near 4-month gestation of sows multiplied by the daily flux of extracellular fluids into the fetus (i.e. EF→Ft) documented by Giesemann *et al.*<sup>33</sup> produces estimations of total piglet Ca mass at birth that are lower but of the same order as the total piglet Ca mass estimated at birth for C1 and C3 offspring (Table B.5, Supplementary Information). In this experiment, we estimate that sow produced an average of 10 kg of milk per day.<sup>34</sup> The fraction of Ca in milk samples was highly variable (3830 to 7632 ppm), which led to a wide range of possible Ca dairy output, from 8.16 to 16.25 g of Ca per day. Considering that Ca milk concentration is documented to be between 1700 and 2140 g/l after the second week of lactation,<sup>33,41</sup> the upper estimation of 16.25 g/d of Ca dairy output seems more consistent and matches with Ca dairy outputs documented by Giesemann *et al.*<sup>33</sup> Overall, the estimations of body masses, Ca reservoir size, placental and dairy Ca fluxes from this study are consistent with those reported in Giesemann *et al.*<sup>33</sup> and the other studies used to design the present model (Tables B.2 and B.3, Supplementary Information). This supports that these Ca flux data can be reasonably used within our model to compare with experimental measurements.

### Experimental elemental and isotopic data

Calcium isotopic compositions collected during this study (205 measures for 50 samples and 1 reference material) are reported as both  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  and  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{SRM915a}}$  in Fig. 2 and Table B.6 (Supplementary Information). Food Ca isotopic composition remains consistently stable at  $-0.23 \pm 0.06\text{‰}$  ( $n = 3$ ) during the duration of the experiment (Fig. 3A). Bones of adult females (C1, C2, C3) display  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values distributed in a tight range between  $-0.49 \pm 0.05\text{‰}$  ( $n^* = 4$ ) and  $-0.53 \pm 0.05\text{‰}$  ( $n^* = 3$ ), with a general  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$  offset of  $-0.28 \pm 0.11\text{‰}$  ( $n_{\text{bone}} = 3$ ,  $n_{\text{diet}} = 3$ ). Bones are undistinguishable from pre-insemination blood Ca isotopic compositions ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-blood}} \approx -0.08 \pm 0.11\text{‰}$ ,  $n_{\text{bone}} = 3$ ,  $n_{\text{blood}} = 3$ ). The bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of the C8 individual ( $-0.51 \pm 0.05\text{‰}$ ,  $n^* = 4$ ) is indistinguishable from C1, C2, and C3 individuals. Milk Ca isotopic composition ranges between  $-0.70 \pm 0.07\text{‰}$  ( $n^* = 3$ ) and  $-0.96 \pm 0.05\text{‰}$  ( $n^* = 3$ ). The mean difference between the food of sows and their milk ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{milk-diet}}$ ) is  $-0.58 \pm 0.12\text{‰}$  ( $n_{\text{milk}} = 3$ ,  $n_{\text{diet}} = 3$ ), whereas the mean difference between their blood and milk during nursing ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{milk-blood}}$ ) is  $-0.67 \pm 0.12\text{‰}$  ( $n_{\text{milk}} = 3$ ,  $n_{\text{blood}} = 3$ ). Colostrum samples ( $n = 3$ ) have a wider range of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values than milk, from  $-0.72 \pm 0.06\text{‰}$  ( $n^* = 3$ ) to  $-2.06 \pm_{-0.05}^{+0.06}\text{‰}$  ( $n^* = 3$ ), mainly because of one outlier sampled from the C3 individual. The two other colostrum samples (from C1 and C2) display  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values in the range



**Fig. 2** Fluid and tissue Ca isotopic compositions. Ca isotopic compositions of all tissues and fluids collected from C1, C2, C3, and juvenile individuals, expressed in ‰ as  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  and  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{SRM915a}}$  values. In these box plots, the central line represents the median, boxes are limited by their first and third quartiles, and whiskers extend to maximum and minimum values  $\pm$  their uncertainties. The light green shaded area represents the range of Ca isotopic composition of the diet with the mean identified by the dashed line.

of milk values (Fig. 2). Umbilical blood samples ( $n = 3$ ) show intermediate  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values between mother blood and milk, ranging between  $-0.30 \pm 0.05\text{‰}$  ( $n^* = 3$ ) and  $-0.71 \pm 0.05\text{‰}$  ( $n^* = 3$ ). The mean  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{umbilical blood-diet}}$  offset is  $-0.29 \pm 0.11\text{‰}$  ( $n_{\text{umbilical blood}} = 3$ ,  $n_{\text{diet}} = 3$ ). Close after parturition, the mean  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{umbilical blood-sow blood}}$  is  $-0.18 \pm 0.11\text{‰}$  ( $n_{\text{umbilical blood}} = 3$ ,  $n_{\text{sow blood}} = 3$ ) and  $-0.14 \pm 0.11\text{‰}$  for C1 ( $n_{\text{umbilical blood}} = 1$ ,  $n_{\text{sow blood}} = 1$ ), the individual for which collections of blood and umbilical blood were the closest in time. Thus, umbilical blood tends to be slightly depleted in heavy Ca isotopes compared with sow's food and blood (Fig. 2). Bone samples collected from the two early deceased piglets show a Ca isotopic composition undistinguishable from the adult sows, with a mean  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of  $-0.50 \pm 0.05\text{‰}$  ( $n = 2$ ). Urine Ca isotopic compositions range between  $+1.27^{+0.05}_{-0.09}\text{‰}$  ( $n^* = 3$ ) and  $+0.55 \pm 0.05\text{‰}$  ( $n^* = 3$ ), with either a relative stability over time (C1 and C3 individuals) or a noticeable variability (C2 individual, see Fig. 3B).

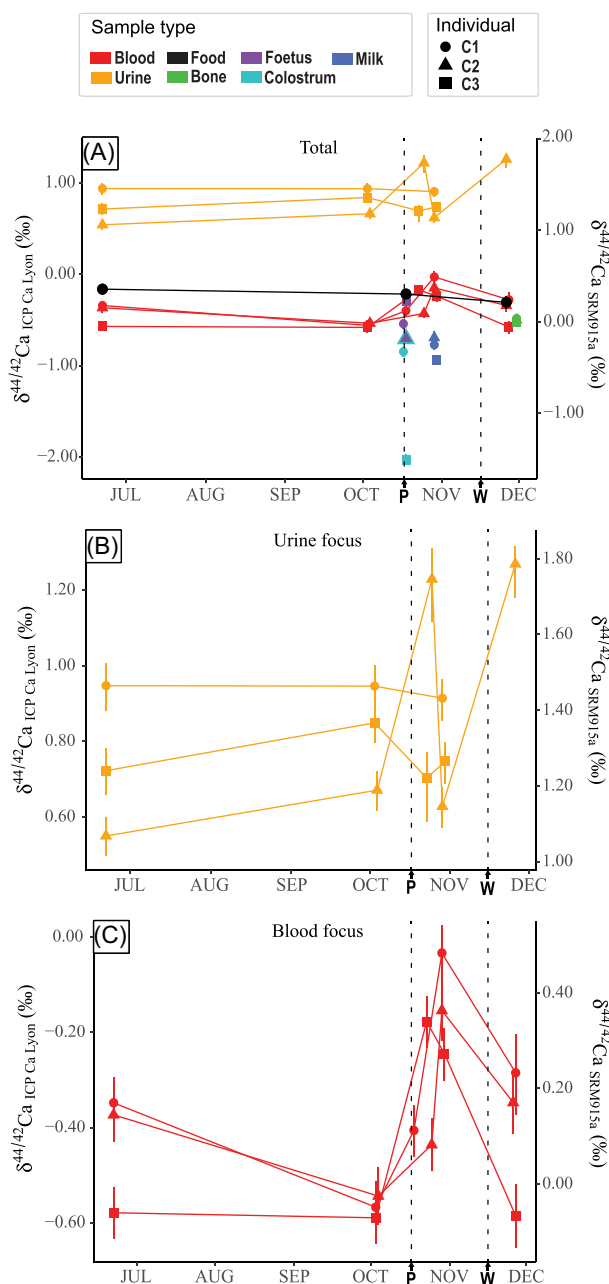
We do not identify a common temporal pattern of urine Ca isotopic composition shared by the three individuals. Except for the C2 individual that shows higher urine  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values at parturition and post-weaning steps, urine Ca isotopic composition seems relatively stable over the experiment, although the data point of C2 is only available for the post-weaning step (Fig. 3B). However, all individuals share a similar temporal pattern of blood Ca isotopic composition (Fig. 3C). Blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values range between  $-0.03 \pm 0.06\text{‰}$  ( $n^* = 3$ ) and  $-0.59 \pm 0.06\text{‰}$  ( $n^* = 5$ ). Depending on the individual, blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values are either stable or decrease between pre-insemination step (June) and the last month of gestation (early October). The amplitude of this change is between  $-0.01 \pm 0.11\text{‰}$  ( $n_{\text{pre-insemination}} = 1$ ,  $n_{\text{syn-gestation}} = 1$ ) and  $-0.22 \pm 0.11\text{‰}$  ( $n_{\text{pre-insemination}} = 1$ ,  $n_{\text{syn-gestation}} = 1$ ). However, the range of blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values between June and early October largely overlaps when all individuals are considered together. This period is followed by a rapid increase of  $+0.42^{+0.11}_{-0.12}\text{‰}$  ( $n_{\text{syn-gestation}} = 3$ ,  $n_{\text{syn-nursing}} = 3$ ) in average between the last month of gestation (early October) and the middle of nursing (mid-November). The onset of this change in blood Ca isotopic composition is different between the individuals, with individual C3 exhibiting this offset 5 days after parturition, whereas individual

C2 still shows no sign of it 7 days after parturition (Fig. 3C). All the individuals consistently display this change 14 days after parturition (Fig. 3C). This phase is followed by a decrease of  $-0.19^{+0.12}_{-0.13}\text{‰}$  ( $n_{\text{syn-nursing}} = 1$ ,  $n_{\text{post-weaning}} = 1$ ) to  $-0.34 \pm 0.12\text{‰}$  ( $n_{\text{syn-nursing}} = 1$ ,  $n_{\text{post-weaning}} = 1$ ) after weaning (late November) depending on the individual. In the case of the C3 individual, blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values are back to initial values in December (respectively  $-0.58 \pm 0.05\text{‰}$  and  $-0.59 \pm 0.07\text{‰}$ ,  $n^* = 3$  for both).

Calcium concentrations in urine range from 2.8 to 715.9 mg/l. At the individual level, urines collected before insemination are systematically the most Ca concentrated. Ca concentration then decreases during the gestation, increases in the middle of the lactation period, and goes back to post-birth levels after weaning (Fig. C.2, Supplementary Information). We found a weak linear and logarithmic correlation between urine Ca concentration and isotopic composition with an  $R^2$  of 0.37 and 0.35, respectively (Fig. C.3, Supplementary Information). We found no significant temporal pattern of blood Ca concentration (Fig. C.2, Supplementary Information), or correlation between blood Ca concentration and isotopic composition (Fig. C.3, Supplementary Information). All non-blood samples isotopic compositions are shown compared with individual's blood compositions ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{X-blood}}$ ) in Fig. C.4 (Supplementary Information). The mean  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{urine-blood}}$  offset is  $+1.21^{+0.11}_{-0.13}\text{‰}$  ( $n_{\text{urine}} = 12$ ,  $n_{\text{blood}} = 12$ ), which is undistinguishable from the offset of  $+1.15\text{‰}$  used in our model. This offset, however, changes over time, notably during the lactation period when a cluster of low  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{urine-blood}}$  can be distinguished (Fig. 4).

### Box model predictions

The structure of the box model of this study is detailed in Fig. 5. The evolutions of Ca isotopic compositions within some of these Ca reservoirs (i.e. extracellular fluids, urine, feces, bone, milk and bulk fetus tissues) are presented in Fig. 6 and are the result of GestFF, GestR, LactA, and LactB simulations. The initial conditions of these simulations are summarized in Tables B.2, B.3, and B.4 (Supplementary Information), briefly described in Section 2.6, and further detailed in Appendix A, Text A.3 (Supplementary Information).



**Fig. 3** Ca isotopic compositions over time. Ca isotopic compositions of all samples collected from C1, C2, and C3, expressed in ‰ as  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca}_{\text{Lyon}}}$  and  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{SRM915a}}$  values over time. (A) All tissue and fluid Ca isotopic compositions, (B) urine focus, and (C) blood focus. Arrows, dashed black lines, and associated P and W marks on the x temporal axis, respectively, highlight parturition and weaning dates. The size of the C2 colostrum data point is increased to make it visible despite the superposition with the C2 umbilical blood data point. Error bars represent the range of uncertainty around each value.

In Fig. 6, three phases can be distinguished for all the four simulations. From day 2 to day 100, extracellular fluids, urines, milk and fetal tissues reach a transient/temporary equilibrium, which depends strictly on Ca fluxes and associated Ca isotopic fractionation but not on initial Ca isotopic compositions. This result is expected considering the small Ca residence time of these reservoirs or their small initial size (e.g. fetal tissues). Our model thus predicts a rapid reaction of these reservoirs and a relative stability of the Ca isotopic composition within this time range. After 100 days and up to  $10^4$  days, we observe a change in bone Ca iso-

topic composition which also results in a slight increase of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of extracellular fluids, urines, milk and fetal tissues. After  $10^4$  days, the sow system (not including the fetus box) is relaxed to its steady state. We compared the four modeled predictions with our experimental data, at different timings (100 days and steady state) while considering different Ca isotopic fractionation factors ( $\alpha_{\text{B-EF}}$ ) at bone mineralization [Fig. 7; see Table B.4 (Supplementary Information) and references therein]. At steady state, only bone Ca isotopic composition is affected by  $\alpha_{\text{B-EF}}$ . This parameter has little impact on intermediate composition states at 100 days for lactation but a more pronounced impact for gestation simulations (Fig. C.5, Supplementary Information).

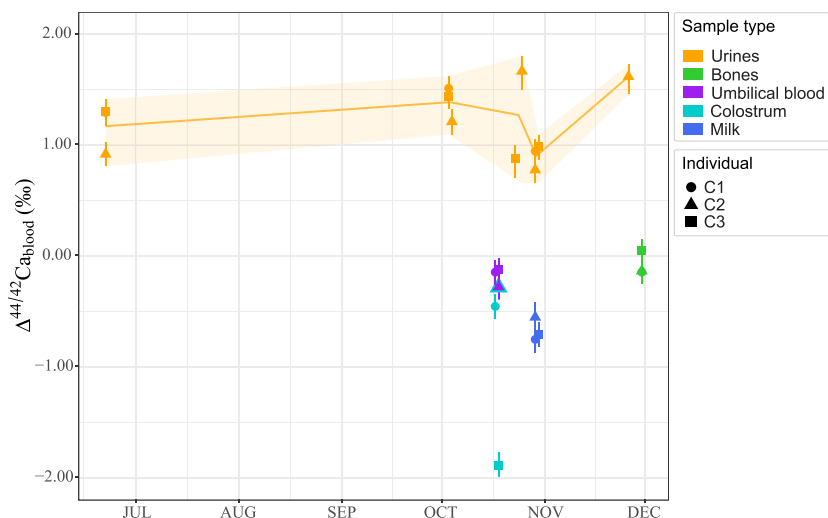
GestFF predictions for urine and extracellular fluids fits remarkably well within the range of urine and blood data obtained from pre-insemination samplings (Fig. 7). Ca isotopic compositions recorded in bones collected from sows after the weaning of the offspring fit with compositions predicted from GestFF simulation, but only for Ca isotopic fractionation factor  $\alpha_{\text{B-EF}}$  between 1 and 0.9999 (i.e. with  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-blood}}$  between 0 and  $-0.1\%$ ). Note that considering the Ca residence time in bones ( $\sim 5$  to 6 years for sows) and the length of the experiment ( $< 6$  months),  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values from sow bones collected at the end of the experiment are considered to be minimally affected by gestation (3 months) and lactation periods (28 days) experienced during the experiment. Instead, these bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values are more comparable with pre-insemination body Ca isotopic compositions. This is confirmed by bone data obtained from the individual C8 (the sow who died between the previous breeding cycle and the monitored breeding cycle), which is identical to C1, C2 and C3 bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values.

In gestation condition (GestR), predictions for urine and fetus tissues fit well within the range of experimental syn-gestation urine and syn-parturition umbilical blood compositions, for steady state (i.e. post  $10^4$  days) as for 100-day simulations. Steady state and 100-day  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values predicted for extracellular fluids are higher than experimental blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  range of the last month of gestation, by an order of 0.1–0.2‰. None of our experimental bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values are comparable with 100 days or steady state gestation simulations; however, low  $\alpha_{\text{B-EF}}$  (i.e. high enrichment in light Ca isotopes at bone mineralization) increases the gap between predicted extracellular fluid  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values at 100 days (GestR) and the range of experimental syn-gestation blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values (Fig. C.5, Supplementary Information).

Model predictions for urine, extracellular fluids, and milk  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values for the high dairy excretion scenario (LactA) are all higher than the range of experimental data obtained during nursing for these fluids, for steady state as for 100-day simulations. As these fluids keep a similar Ca isotopic composition between 2 and 100 days, we can postulate that 100-day simulations are comparable with experimental data at 14 days of lactation (with moderate reserves regarding the overlooking of non-secreting soft tissue dynamic in the model). Model predictions within the low dairy excretion scenario (LactB) for extracellular fluids and milk  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values (for steady state and for 100-day simulations) fall in the range of experimental data for blood and milk obtained during nursing. For urine, only 100-day simulations predict  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values, which are in the upper range of experimental urine  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values during nursing.

Comparisons between lactation scenarios at 1000 days with various intensity of bone loss predict that bone loss and its intensity have a negligible impact on the state of the system at 1000 days (i.e. on the long term), and only strongly affects bone Ca isotopic composition (Fig. C.6, Supplementary Information). This is the logical consequence of decreasing the bone Ca residence time by decreasing the bone reservoir size through bone loss. The





**Fig. 4** Temporal evolution of  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{blood}}$  values. Summary of  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{x-blood}}$  values (i.e. the difference between blood and other sample  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values). For each individual, sample Ca isotopic compositions have been compared with blood Ca isotopic compositions of the same sampling step (see Figs 1 and 3), with the exception of bones that are compared with pre-insemination blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values. The shaded orange area covers the range of urine  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{x-blood}}$  values  $\pm$  their uncertainties. The orange line represents the moving average of  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{x-blood}}$  values calculated for each sampling step. The size of the C2 colostrum data point is increased to make it visible despite the superposition with the C2 umbilical blood data point.

different configurations of Ca digestive excretions we tested (i.e.  $\text{K} \rightarrow \text{Ur}/\text{EF} \rightarrow \text{Fs}$  ratios ranging from 0.5 to 2) show that this parameter has a restricted impact on the evolution of the system, for steady state (Fig. C.7, Supplementary Information) as for intermediate isotopic compositions (under  $10^4$  days).

Simulations with lower Ca absorption through the digestive tract (Fig. 8) show that decreasing Ca absorption leads to lower  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values for urine, feces, blood, and eventually bone after 100 days of simulation. By dividing Ca absorption by four compared with gestation conditions without Ca transfer to fetuses (GestFF), blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values decrease by  $\sim -0.20\%$  (Fig. 8). The predicted  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$  in such case is  $-0.46\%$ , which differs from the  $-0.26\%$  predicted for regular GestFF conditions, and the  $-0.28\%$  we observe experimentally.

## Discussion

### Urine isotopic stability and Rayleigh distillation process

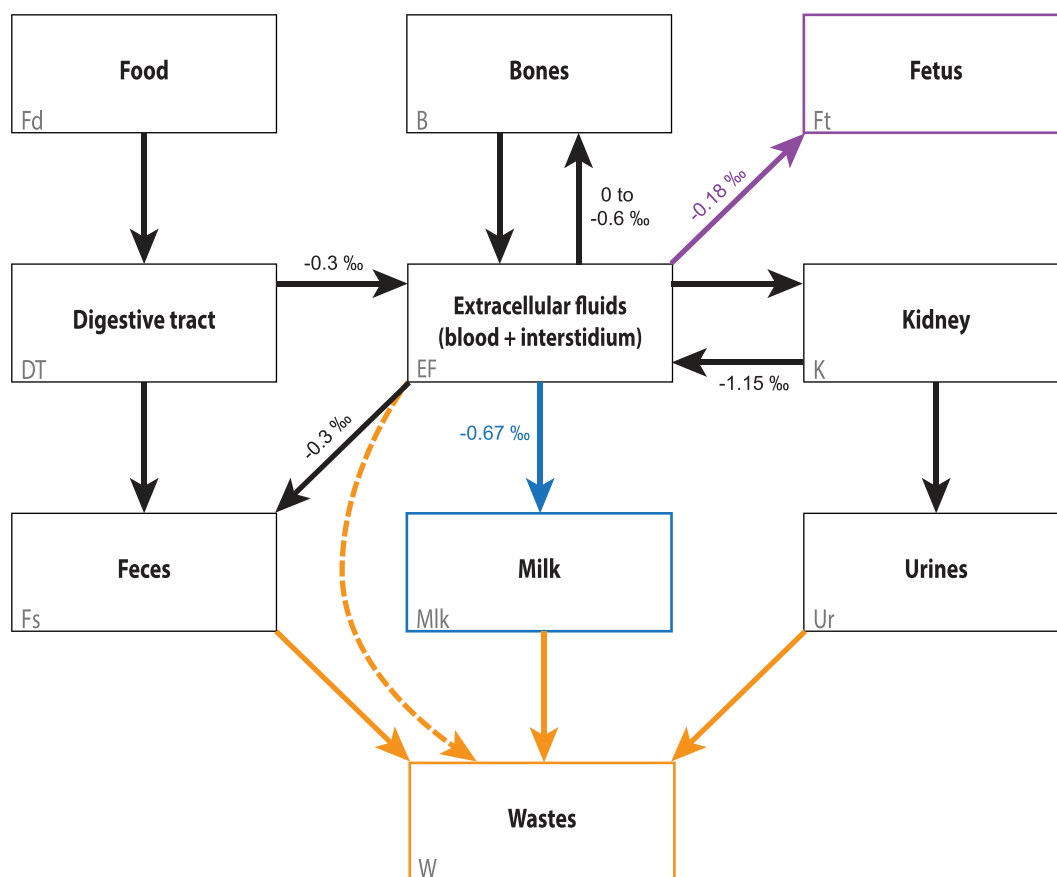
Despite the fact that pre-insemination and post-weaning steps should be similar in terms of body Ca fluxes for the animals (both take place two weeks after weaning), the range of Ca concentrations reported in morning-first urines is  $\sim 2.5$  wider at the pre-insemination step than during all the rest of the experiment (Fig. C.2, Supplementary Information). This suggests that Ca concentrations in these urines are quite uninformative of daily urinary Ca fluxes, probably because the water balance status of the animals is too variable between samplings. Urine collected with that procedure however highlights a decrease of blood to urine isotopic difference during lactation ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{urine-blood}}$  change from  $+1.39^{+0.11}_{-0.12}\%$  during gestation to  $+0.90^{+0.11}_{-0.12}\%$  during nursing; Fig. 4), when sows generally increase their Ca urinary losses.<sup>33</sup> This is compatible with the effect of a Rayleigh distillation process, resulting in lower  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{urine-blood}}$  for higher Ca urinary excretions.<sup>11,22,28</sup> As no other factor influencing  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{urine-blood}}$  has yet been described, this provides additional support that a Rayleigh distillation process affects Ca isotopic fractionation within kidneys.

This Rayleigh distillation is also a possible explanation to why urine collected during nursing displays a range of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values that is lower than what the model predicts (Fig. 7; LactA and LactB). Indeed, in the model, the  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{urine-blood}}$  offset is constant (equal to  $+1.15\%$ <sup>10,11,21,23</sup>) and does not change with Ca urinary fluxes such as expected with a Rayleigh distillation process operating at Ca renal reabsorption. Taking a Rayleigh distillation process into account would mechanically decrease  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{urine-blood}}$  for high Ca urinary excretions<sup>11,22,28</sup> (e.g. during pig lactation<sup>33</sup>), and hence lower blood, urine, feces, and milk  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values compared with predicted values in LactA and LactB simulations (Fig. 7). Alternatively, taking into account a lower dairy Ca flux also reduces the mismatch between experimental and model data (Fig. 7; LactB). However, if this last scenario is consistent with the lower range of milk production and Ca dairy excretion we estimate ( $\sim 8.2$  g of Ca per day; Table B.5, Supplementary Information), it seems partially incompatible with the range of Ca concentration classically reported in milk ( $> 1500$  mg/l<sup>33,41</sup> compared with a minimum of 817 mg/l for this study; Table B.5, Supplementary Information). In this context, the Rayleigh distillation hypothesis seems more parsimonious to explain the difference between experimental and model data in lactation conditions.

Thus, our observations support that a Rayleigh distillation process operates during Ca renal reabsorption, but also that comparing blood and urine Ca isotopic compositions (i.e.  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{urine-blood}}$ ) collected by following our procedure (i.e. night of fasting, morning-first urine and blood collection) can be used to detect changes in daily Ca urinary excretions without having to collect 24 h urines. As such, this method can help monitoring Ca retention in the body and bone balance, which can be useful when 24 h urine collections are difficult or impossible to set up (e.g. for studying large mammals other than humans).

### Ca isotopic fractionation in pre-insemination conditions

In pre-insemination conditions, blood is depleted in heavy Ca isotopes relative to urine ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{urine-blood}} = +1.17^{+0.11}_{-0.12}\%$ ,



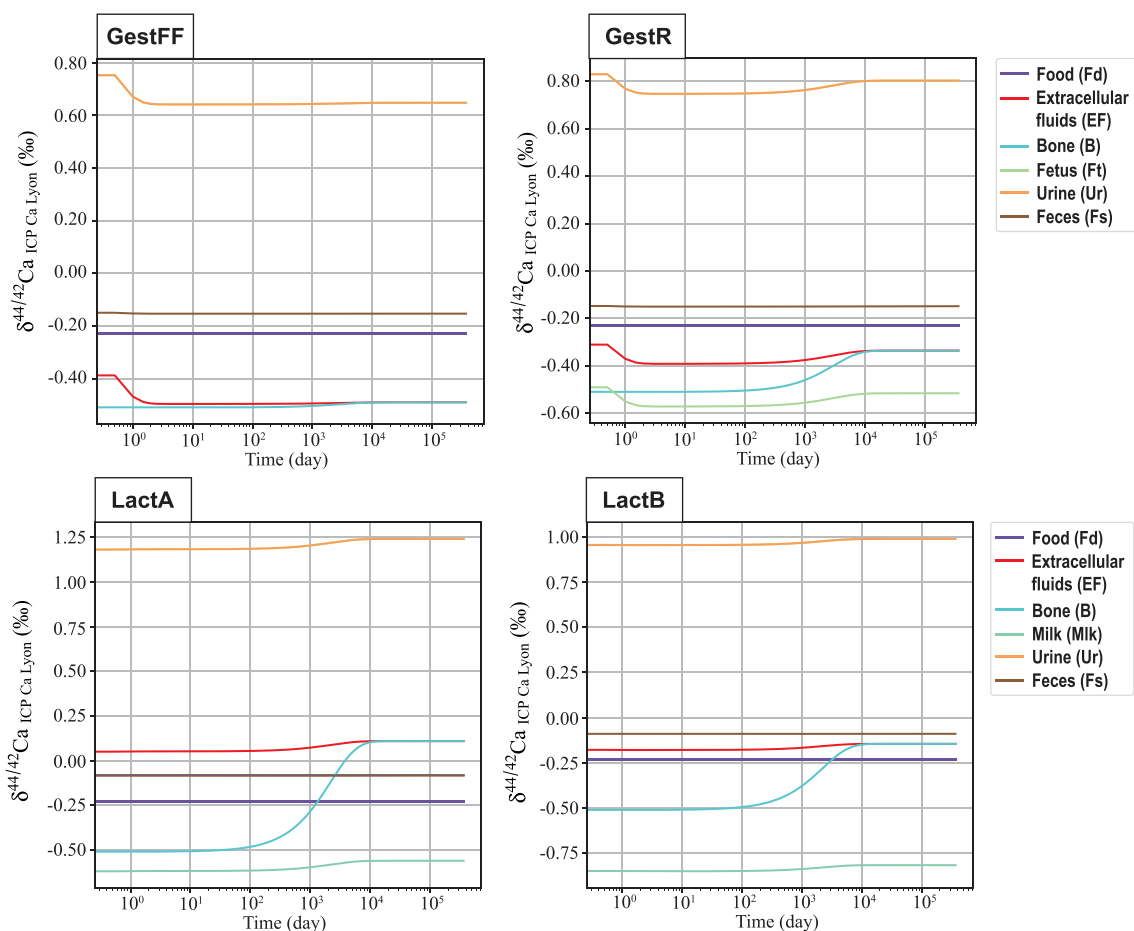
**Fig. 5** Model of Ca cycle. Box model of Ca body cycle adapted from the human model proposed by Tacaill.<sup>11</sup> The purple arrow and box are implemented to the model for gestation runs. The blue arrow and box are implemented to the model for lactation runs. Yellow arrows represent Ca fluxes going to the waste box, a theoretical reservoir of virtually infinite size that prevents Ca output fluxes to interact with the rest of the system. The dashed yellow arrow is a conceptual flux associated with no isotopic fractionation, notably used to nullify the growth of the sow-like animal (see Section 2.6). The  $\Delta^{44/42}\text{Ca}$  values considered in the model are specified along their flux (detailed and justified in Table B.4, Supplementary Information).

$n_{\text{urine}} = 3$ ,  $n_{\text{blood}} = 3$ ; Fig. 3A; which is in conformance with the literature:  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{urine-blood}} \approx +1.15\text{‰}$ <sup>10,11,21,23</sup>), an isotopic fractionation generated by the preferential reabsorption of light Ca isotopes from primary urines to blood in kidneys.<sup>10,20–24,27</sup> The same blood samples, however, have an isotopic composition very similar to bones ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-blood}} = -0.08 \pm 0.11\%$ ,  $n_{\text{bone}} = 3$ ,  $n_{\text{blood}} = 3$ ; Fig. 3A), which suggest a low to null amplitude of isotopic fractionation between blood and bone during mineralization. This agrees with other observations of low blood-bone differences of Ca isotopic compositions in sheep, rats, and humans,<sup>11,27</sup> and predictions of quantitative modeling,<sup>11</sup> but challenges previous hypotheses involving a  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-blood}}$  of the order of  $-0.6\text{‰}$ .<sup>2,7,10,13,14,21–23</sup>

Similarly, the predictions of our model are only compatible with our experimental data when considering a small Ca isotopic fractionation at bone mineralization (i.e.  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-extracellular fluids}}$  between 0 and  $-0.1\text{‰}$ ; Fig. 7, GestFF). Along with other publications on the subject,<sup>11,27</sup> this finding supports that the quantitative implications of kidney-mediated Ca isotopic fractionation on the body isotopic equilibrium could have been underestimated, and that, conversely, Ca isotopic fractionation at bone mineralization could be less pronounced than previously thought.<sup>2,11</sup> This mismatch between studies is likely favored by the wide diversity of Ca residence time in biological tissues and fluids that are compared. For example, it takes decades for bone to be at the isotopic steady state with blood (Fig. 6), whereas blood Ca isotopic compo-

sition can likely change in minutes to hours in response to transient physiological states such as food consumption. Few hours of fasting (e.g. Heuser *et al.*<sup>10</sup> and this study) likely limit the impact of these transitory events, but also provide data that are not fully representative of tissue and fluid Ca isotopic compositions over a day period. Thus, accurate direct comparisons are difficult outside of long-term feeding experiments (several years), a condition that is challenging to satisfy and lacks in the literature so far.

Nevertheless, apart from blood to bone differences, these two models of Ca isotopic fractionation (i.e. small versus large Ca isotopic fractionation at bone mineralization) can generate similar body Ca isotopic compositions despite their conceptual differences. For example, as long as bone resorption is associated with increased Ca urinary losses and bone accretion with decreased Ca urinary losses, both models stay compatible with the decrease of blood and urine  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values documented during bone loss events.<sup>14,20–23,28</sup> However, considering a smaller Ca isotopic fractionation at bone mineralization also provides new perspectives about some observations of the literature. For example, induced bone loss in Göttingen minipigs<sup>10</sup> is not associated with higher Ca urinary excretions or with a decrease of blood and urine  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values.<sup>10,42</sup> However, blood and urine  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values do decrease for humans with bone loss,<sup>20,24,28</sup> while there are clues that bone loss comes with higher Ca urinary excretions for them (e.g. higher Ca concentrations in urines: Eisenhauer *et al.*; Heuser *et al.*).<sup>20,28</sup> This suggests that bone losses can be efficiently monitored with



**Fig. 6** Model evolution to steady state. Evolution of Ca isotopic composition of sow Ca reservoirs in general conditions (GestFF), gestating conditions (GestR), and lactating condition with higher or lower dairy Ca excretion (LactA and LactB, respectively). The x axis represents the time in days. These graphs represent scenarios with no Ca isotopic fractionation at bone mineralization (i.e.  $\alpha_{B-EF} = 1$ ); however, only bone Ca isotopic composition is notably affected by this fractionation factor. Initial conditions of these simulations are summarized in Tables B.2, B.3, and B.4 (Supplementary Information) and further detailed in Section 3.3 and Appendix A.3 (Supplementary Information).

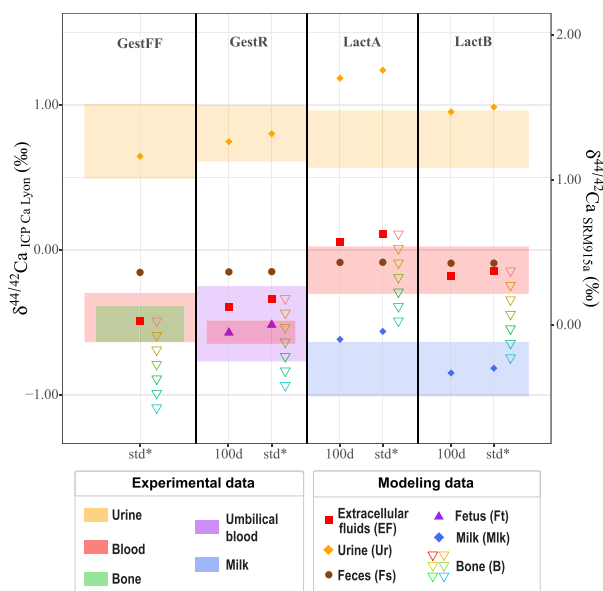
Ca isotopes only when associated with increased urinary excretions, which is precisely the kind of difference predicted by the model we support in this study (i.e.  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-blood}}$  between 0 and  $-0.3\%$ ,  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{urine-blood}} \approx +1.15\%$ ). Overall, these results thus specify the range of physiological and pathological contexts where Ca isotopes can be used to monitor bone balance.

### Ca isotopic fractionation from diet to bone during gestation

The difference between diet and bone Ca isotopic composition reported in this study ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}} = -0.28 \pm 0.11\%$ ,  $n_{\text{bone}} = 3$ ,  $n_{\text{diet}} = 3$ ) is at odds with the relatively constant value generally reported among mammals (mean  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}} = -0.54 \pm 0.08\%$ <sup>2,6,10,11,13,17,27</sup>). This study is among the first to report such a different and smaller  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$  value. To our knowledge, only Heuser *et al.*<sup>10</sup> previously described a similarly low  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$  value in Göttingen minipigs with glucocorticosteroid-induced osteoporosis ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}} = -0.32 \pm 0.15\%$ ),<sup>10</sup> although this result falls in the range of uncertainty reported in the literature.<sup>2,6,10,11,13,17,27</sup> This raises questions about the cause behind these differences. Simulations of gestation without Ca transfer to fetal tissues (GestFF) predicts the same isotopic compositions than what we observe experimentally and similarly generate a small  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$  (Fig. 7).

This suggests that apparently no exotic parameter is needed to generate this small  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$ . An important point is that the GestFF simulation involves Ca fluxes documented during gestation with the exception of fetal Ca transfer (Table B.3, Supplementary Information). This is relevant as a general condition of the sows only because these domestic animals underwent repetitive gestations, representing more than two-thirds of their lifetime after their sexual maturity. In the wild, medium- and large-sized mammals generally experience bigger time gaps between gestations, with  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$  documented so far arising largely from wild animals, non-breeding animals, or primiparous females.<sup>6,10,13,17</sup> This suggests that changes in Ca fluxes during gestation can change the bone-diet isotopic offset (i.e.  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$ ).

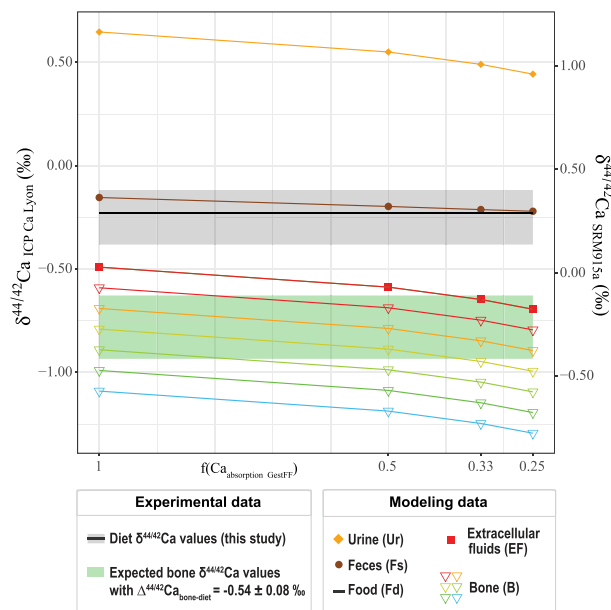
The study of sow Ca balance in normal adult condition (i.e. outside of the gestation and lactation periods) attracted little attention so far. However, we can reasonably assume that Ca absorption in the digestive track increases during gestation compared with normal conditions, with gestation involving more Ca dietary intakes in order to adapt to higher Ca demands (see example for humans: Kovacs and Fuleihan).<sup>43</sup> Dividing Ca absorptions by four (compared with GestFF conditions), changes predicted  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$  values from  $-0.26$  to  $-0.46\%$  (Fig. 8), which then fall within the range of the general  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$  documented for mammals (mean  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$



**Fig. 7** Model and experimental data comparison. Comparison of modeling and experimental data in general condition (GestFF), gestating condition (GestR), and lactating conditions with higher or lower dairy Ca excretion (LactA and LactB, respectively). Points represent simulation results, whereas colored zones represent the range of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values measured during our experiment at comparable stage of the reproductive cycle. Simulation results are presented at day 100 and after 1000 days when the sow system is in steady state (noted as 'std'). Steady state simulations presented here consider different Ca isotopic fractionation factor at bone mineralization (i.e.  $\alpha_{\text{B-EF}}$  between 1 and 0.9994), representing a  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-blood}}$  offset between 0 and 0.6‰ (only bone is affected by this value). Bone data points tend toward red colors for  $\alpha_{\text{B-EF}} = 1$  (i.e. no Ca isotopic fractionation at bone mineralization) and light blue colors for  $\alpha_{\text{B-EF}} = 0.9994$ , with 0.0001 of difference between each neighbor color level. GestFF results are compared with pre-insemination  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values for urine and blood and with post-weaning  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values for bones (justified in Section 3.3). GestR  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values are compared with late gestation urine, sow blood and umbilical blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values at parturition. LactA and LactB are compared with urine, blood, and milk  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values from the nursing period. Bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values are not displayed for 100-day simulations, because at this time bones are not yet significantly affected by changes in body Ca isotopic composition (see Fig. 6).

$= -0.54 \pm 0.08\%$ <sup>2,6,10,11,13,17,27</sup>). This demonstration is purely conceptual as only Ca absorption, fecal Ca losses and the blood→waste Ca flux are modified from GestFF conditions in Fig. 8, whereas changing Ca absorption in a real organism would likely trigger other changes in Ca fluxes (e.g. urinary). Moreover, any modification of the ratio between Ca absorption and Ca urinary excretion fluxes can modify the  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$ .<sup>11</sup> Monitoring an animal population with various Ca absorption levels (e.g. with different Ca content in the diet) would thus be necessary to precisely describe the effect of Ca absorption on body isotopic compositions. Nevertheless, there remains a strong suspicion that the small  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$  reported in this study could be the consequence of prolonged higher food Ca absorptions (with a lower Ca absorption/Ca urinary excretion ratio), notably caused by consecutive gestation periods. Furthermore, the reduction of the  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$  can also be further amplified by the repeated export of light Ca isotopes through placental and milk transfers (see Sections 4.4 and 4.5).

This consequence of frequent reproductions is important to consider for Ca isotope studies involving livestock animals, but likely plays a minor role in animal populations reproducing less



**Fig. 8** Ca absorption effect on body  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values. Body Ca isotopic compositions predicted by our model at steady state in general condition (GestFF), with various Ca isotopic fractionation factor during bone mineralization (i.e.  $\alpha_{\text{B-EF}}$ ), and various Ca absorption levels in the digestive track. Bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  predicted values are confounded with extracellular fluids values for  $\alpha_{\text{B-EF}} = 1$  (i.e. no Ca isotopic fractionation at bone mineralization), and tend toward light blue colors for  $\alpha_{\text{B-EF}} = 0.9994$ , with 0.0001 of difference between each neighbor color level. Absorption levels presented on the x axis range from 100% (left) to 25% (right) of Ca absorptions described by Giesemann et al. during gestation (Table B.3, Supplementary Information).<sup>33</sup> The gray shaded area represents the range of food  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values from our experiment (uncertainties included), while the black line represents the average food  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value. The green shaded area represents the range of bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values expected with a mean  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$  of  $-0.54 \pm 0.08\%$ .<sup>2,6,10,11,13,17,27</sup>

intensively. Thus, we can reasonably assume that this gestation effect is only a minor issue for trophic studies of wild faunas involving Ca isotopes. The first reason is because gestation decreases the  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$  values but does not cancel entirely the trophic-level effect. The second reason is because this phenomenon will be active only for females with gestation periods constituting the majority of their lifetime, a condition that is relevant only for a fraction of females in specific mammal species and populations.<sup>44</sup>

### Gestation effects on body $\delta^{44/42}\text{Ca}$ values

As discussed in the previous section, gestation periods appear to be associated with smaller  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{blood-diet}}$  and  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}}$  offsets, resulting in overall higher body  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values than what could be expected in normal conditions (Figs 7 and 8). However, there is no major change of urine and blood Ca isotopic compositions between pre-insemination and end-gestation periods. We do observe a decrease of blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of  $\sim -0.2\%$  for two individuals (C1 and C2, Fig. 3C), but we suspect that this difference is a stochastic underestimation of blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  inter-individual variability during the last month of gestation. This phenomenon is likely because only three individuals have been monitored and that blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values from this period are by far the most homogeneous of all sampling steps (Fig. 3C). Alternatively, this could be explained by the fact that blood compositions are not entirely free of nursing influence for C1 and C2 individuals at the



pre-insemination step, as it follows a previous weaning by only 12–14 days (similarly as the monitored post-weaning step).

The fact that urines and blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values remain stable, or decrease between pre-insemination and end-gestation periods (Fig. 3), is at odds with modeling predictions suggesting an increase of +0.10 to +0.15‰ (Fig. 7, difference between GestFF and GestR). A possibility is that Ca isotopic fractionations between sow blood and fetal tissues are in reality less pronounced than what is considered in GestR simulation (i.e. a  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{umbilical blood-sow blood}}$  closer to 0‰ than  $-0.18\text{‰}$ ). At the moment, the data we obtained from sow blood and umbilical blood at birth are the first direct data to document potential isotopic fractionations associated with this flux. However, it is yet to be confirmed if the average difference of  $-0.18 \pm 0.11\text{‰}$  we measure between these fluids (or  $-0.14 \pm 0.11\text{‰}$  for the best temporal match) is representative of a full gestation period or only of birth. Several independent clues suggest that the general  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{umbilical blood-sow blood}}$  offset could be closer to 0‰. For example, the individual C2 carried only 2 piglets against 16 and 18 piglets for C1 and C3, which should result in Ca placental transfers that would be 5–6 times smaller for C2 (see total piglet Ca mass in Table B.5, Supplementary Information). However, despite this huge difference and the fact that these Ca transfers should peak around the sampling period,<sup>45,46</sup> body Ca isotopic compositions of C2 do not exhibit an exotic pattern between pre-insemination and late gestation periods compared with C1 and C3 (Fig. 3). Additionally, the two juveniles who died at and closely after birth have bone Ca isotopic compositions undistinguishable from adults (Fig. 2). A similar observation has been documented between human young infants and adults who display low to absent difference between their bone Ca isotopic compositions.<sup>16</sup> This seems partly incompatible with the low  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values recorded in human enamel growing in utero,<sup>18,19</sup> but could be explained if umbilical blood Ca is only significantly  $^{44}\text{Ca}$ -depleted during a relatively short period before birth, such as suggested by other human enamel data.<sup>8</sup> If further investigations confirm that the general Ca isotopic fractionation between gestating females and their fetuses is small, this would make gestation model predictions (GestR) converge with gestation predictions without Ca placental transfer predictions (GestFF), with the bulk fetus Ca isotopic composition being equal to sow extracellular fluids in average (Fig. 7, GestFF). Nevertheless, the fact that Ca isotope body compositions predicted for 100-day gestation simulations (GestR) remain in the range of pre-insemination experimental  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values (Fig. 7) emphasizes that even a Ca isotopic fractionation factor of 0.99982 at Ca placental transfers from sow to fetuses (representative of a  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{umbilical blood-sow blood}} = -0.18\text{‰}$  would have a restricted effect on sow body Ca isotopic compositions. Finally, contrary to what we consider in the model of this study (Fig. 5), Ca transfer does occur in reality from the umbilical reservoir to the sow blood reservoir.<sup>47</sup> We can suppose that this flux is associated with an isotopic fractionation factor equal to 1 or less (because this is generally what is observed for transmembrane transport<sup>11</sup>). As such, this flux likely attenuates the effect of placental Ca transfers on sow body composition and further explains why we do not detect  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  differences between bones from newborn and adults, or between C2  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  patterns and those of the other specimens.

These results also provide new insights about the higher bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values ( $+0.14 \pm 0.08\text{‰}$ ) documented for ewes when compared with male sheep from the same herd.<sup>7</sup> With a model which is very different from that of this study, as it notably involves important Ca isotopic fractionation at bone mineralization and no renal fractionation, the authors pointed to bone accretion during

gestation as one of the potential drivers of the sexual isotopic difference. Our data do not support this hypothesis, because we do not observe any marked increase in blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values during gestation, while blood is expected to experience an even greater increase of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values than bone in such a scenario. This can be caused by the fact that sows did not experience bone accretion over the course of their gestation, but can be explained more generally because bone mineralization seems associated with a Ca isotopic fractionation factor closer to 1 than previously thought (see Section 4.2).<sup>2,11</sup> Nevertheless, we demonstrated that gestation periods could increase body  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values for other reasons than bone accretion (Fig. 8 and Section 4.3). To some extent, gestation periods are thus likely contributing to the higher bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values documented in female sheep.<sup>7</sup>

### Control of lactation on body $\delta^{44/42}\text{Ca}$ values

Our experiment highlights a significant increase of adult blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values during nursing compared with pre-parturition values ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{nursing blood-gestation blood}} = +0.42^{+0.11}_{-0.12}\text{‰}$ ; Fig. 3C), joining similar observations done in mice.<sup>17</sup> Giesemann *et al.* showed that besides milk production, lactation in sows was associated with bone resorption as well as higher Ca dietary absorption, digestibility, and urinary excretions.<sup>33</sup> Having higher Ca urinary losses during lactation is however not a constant among mammals. This is notably the opposite of what was documented for humans,<sup>43</sup> and emphasizes why changes in  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{urine-blood}}$  (Fig. 4, discussed in Section 4.1) cannot be used as a universal lactation signal. Simulations highlight that higher Ca dietary absorption, urinary excretion, and milk production conjointly increase blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values during lactation (Figs 7 and 8; Figs C.6 and C.7, Supplementary Information), with milk production being the dominant factor of this isotopic change. As a flux, Ca dairy excretion exceeds Ca urinary excretions by two orders of magnitude (Table B.5, Supplementary Information; Giesemann *et al.*<sup>33</sup>) and constitutes by far the biggest change from normal or gestation conditions to lactation conditions. This flux comes with important Ca isotopic fractionation at milk production, as suggested by  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{milk-diet}}$  data ( $-0.6\text{‰}$ <sup>6</sup>;  $-0.58 \pm 0.12\text{‰}$ , this study) and  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{milk-blood}}$  data ( $-0.67 \pm 0.12\text{‰}$ , this study), and therefore strongly affects blood and the whole body Ca isotopic compositions. This is particularly clear when comparing low versus high milk production simulations (LactA and LactB, Fig. 7). A decrease of about half the Ca dairy excretion (between LactA and LactB) results in a decrease of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of the order of 0.25‰ in extracellular fluids (i.e. blood), urine, and milk. The increase of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values in the maternal blood during nursing can therefore be described as a lactation signal that exceeds the effects of gestation. Nevertheless, the amount of milk produced per day and Ca dietary intakes also change a lot between species. This heterogeneity between mammal species could thus be an important modulatory factor for the expression of this lactation signal among mammal species.

### Lactation signal record within mineralized tissues

In terms of rate, body Ca reservoirs are expected to react very rapidly after the onset of lactation Ca fluxes, with the exception of bone (Fig. 6). In our experiment however, these changes seem to appear only after a few days from parturition (e.g. 5 days for C3, Fig. 3C). This minor inconsistency can be explained partly by the fact that our model neglects the Ca storage in non-secreting organs and soft tissues, but also by the lower Ca excretion

through colostrum and milk during the first days following parturition.<sup>48</sup> As for its onset, the blood lactation signal we describe also attenuates rapidly (in few weeks) as the sow comes back to normal physiological conditions. It seems to be the case 14 days after weaning, with blood post-weaning  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values matching pre-insemination values (this is particularly clear for the C3 individual, Fig. 3C), although we cannot guarantee that the pre-insemination step was completely free of nursing influence (only 12–14 days separate this step from the weaning of the previous litter). Preserving such a lactation signal within mineralized tissues (i.e. bones and teeth) is thus only possible if the lactation is sustained for enough time. For bones, the model predicts ~100 days before a significant change can be recorded (Fig. 6) and a shorter time if bone loss is involved (Fig. C.6, Supplementary Information). A similar animal with longer nursing period than sows would thus likely preserve a lactation signal within bone, provided that it dies close enough from a lactation period to not attenuate the signal too much with bone remodeling (in the model 50% of the Ca of bones is renewed after ~3.8 years). Nevertheless, preserving such signal in teeth that would mineralize during a lactation period is also possible for certain mammal species and would likely constitute an even better record considering how enamel grows and preserves isotopic compositions.<sup>49</sup>

As previously mentioned, it has been shown that modern ewes have higher bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values than males within the same herd.<sup>7</sup> Besides bone accretion during gestation, the authors pointed to milk excretion as an alternative driver of this sexual isotopic difference. Our study supports that such signals can result from Ca flux changes during lactation, mainly because of the milk excretion, but also to a lesser extent because of the increase of dietary Ca intakes and urinary excretion during lactation and preceding gestation. The average  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{females-males}}$  reported in bones of ewes compared with male sheep ( $+0.14 \pm 0.08\%$ )<sup>7</sup> falls within the range of what could be reasonably expected for pigs if they sustained a lactation over 1 year without undergoing bone loss (Fig. 6). Although this is longer than what ewes usually do and very far from sow's typical nursing duration,<sup>50</sup> lactation-induced bone loss can increase the bone reactivity to lactation isotopic changes and likely helps recording such a lactation signal (Fig. C.6, Supplementary Information). Consecutive gestations and lactations, such as classically experienced by livestock animals, and a death relatively close from lactation are also favorable factors to preserve such signals. This makes lactation a very suitable candidate to explain differences in bone Ca isotopic composition between sexes of adult mammal populations having a similar diet, such as those observed for modern ewes.<sup>7</sup> Besides, this provides an additional explanation to why human populations studied so far do not exhibit such differences.<sup>7,16</sup> Obviously the predictions of our model cannot be directly applied to sheep, as many Ca fluxes and reservoir sizes change between sow and sheep in addition to the length of lactation of these animals. However, our model and experimental data provide the basics and order of magnitude of what could be expected in other medium to large mammal species. Considering all of that, preserving this lactation signature within bones or teeth of other mammal species, including extinct ones, seems plausible. This would allow studying past lactation habits using bone or teeth Ca isotopic compositions, but could concurrently complicate the use of Ca isotopes as a trophic indicator. However, our study suggests the timings and lengths of lactation periods necessary to preserve such a lactation signal likely concern a fraction of mammal species only.<sup>44</sup> Additionally, the sheep population studied by Reynard *et al.*<sup>7</sup> suggests that this signature of the lactation event tends to stay of small amplitude

( $+0.14 \pm 0.08\%$ ),<sup>7</sup> despite the fact that females from this population went through three consecutive gestations and lactations in that study. Thus, the effects of lactation we describe here do not seem to be a major issue for using Ca isotopes as a trophic indicator, especially when studying wild faunas.

## Conclusion

Through modeling and a longitudinal monitoring of a sow population, this study provides new insights about the mammalian isotopic Ca cycle. Our data support a model of Ca isotopic fractionation with a less pronounced fractionation during bone mineralization than previously proposed ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-blood}}$  between 0 and  $-0.3\%$  instead of  $\sim -0.6\%$ ), a change that specifies the range of physiological and pathological contexts where Ca isotopes can be used to monitor bone balance. Although of small amplitude and apparently not representative of the full length of the gestation, we detected that umbilical blood is  $^{44}\text{Ca}$ -depleted compared with maternal blood ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{umbilical blood-sow blood}} = -0.18 \pm 0.11\%$ ,  $n = 3$ ; or  $-0.14 \pm 0.11\%$  for the best temporal match). Apart from this fractionation, gestation seems to be associated with overall higher body  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values and lower isotopic differences between diet and bones than for other mammals in normal physiological conditions ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-diet}} = -0.28 \pm 0.11\%$ ), possibly because of higher Ca absorptions by the digestive track. Lactation periods are associated with even higher blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values ( $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{blood}}$  change of  $+0.42^{+0.11}_{-0.12}\%$  during nursing) and with small isotopic differences between urine and blood ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{urine-blood}} = +0.90^{+0.11}_{-0.12}\%$ ), although this last observation is likely a less universal lactation marker. The high blood  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values are mainly caused by milk production and excretion, and are likely the main cause of male versus female differences in bone Ca isotopic composition documented in certain mammal populations. According to our model, the preservation of such signature of lactation events in bone is favored by greater Ca dairy excretions, longer lactation periods, smaller time gaps between nursing periods, as well as a death or bone sampling close to the lactation period.

## Supplementary material

Supplementary data are available at [Metalomics](https://doi.org/10.1093/mnfab019/6244243) online.

## Acknowledgements

We thank Yoann Bailly, Stéphane Moreau, Tony Terrasson and the rest of the team of GenESI for their dedicated investment in the project regarding animal management and samplings. For technical assistance on spectrometers, we thank F. Arnaud Godet and P. Telouk. We thank Gildas Merceron for organizing the meeting that planted the seeds of this project as well as many others. The authors are grateful to all the institutions that supported the project.

## Funding

This study was supported by the Intervie program of INSU, CNRS (to J.E.M.), by the INRAE (previously INRA), and by the ENS de Lyon.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Data availability

The data underlying this article are available in the article and in its online supplementary material. The Isopybox program used for building box model simulations and its resources are accessible on Github at the following address: <https://github.com/tacail/isopybox.git>.

## References

- J. E. Martin, T. Tacail and V. Balter, Non-traditional isotope perspectives in vertebrate palaeobiology, *Palaeontology*, 2017, 60 (4), 485–502.
- T. Tacail, S. Le Houedec and J. L. Skulan, New frontiers in calcium stable isotope geochemistry: perspectives in present and past vertebrate biology, *Chem. Geol.*, 2020, 537, 119471.
- J. E. Martin, T. Tacail, T. E. Cerling and V. Balter, Calcium isotopes in enamel of modern and Plio-Pleistocene East African mammals, *Earth Planet. Sci. Lett.*, 2018, 503, 227–235.
- M. T. Clementz, P. Holden and P. L. Koch, Are calcium isotopes a reliable monitor of trophic level in marine settings?, *Int. J. Osteoarchaeol.*, 2003, 13 (1–2), 29–36.
- M. T. Clementz, New insight from old bones: stable isotope analysis of fossil mammals, *J. Mammal.*, 2012, 93 (2), 368–380.
- N. C. Chu, G. M. Henderson, N. S. Belshaw and R. E. M. Hedges, Establishing the potential of Ca isotopes as proxy for consumption of dairy products, *Appl. Geochem.*, 2006, 21 (10), 1656–1667.
- L. M. Reynard, G. M. Henderson and R. E. M. Hedges, Calcium isotope ratios in animal and human bone, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2010, 74 (13), 3735–3750.
- Q. Li, A. Nava, L. M. Reynard, M. Thirlwall, L. Bondioli and W. Müller, Spatially-resolved Ca isotopic and trace element variations in human deciduous teeth record diet and physiological change, *Env. Archaeol.*, 2020, 1–10.
- J. E. Martin, T. Tacail, S. Adnet, C. Girard and V. Balter, Calcium isotopes reveal the trophic position of extant and fossil elasmobranchs, *Chem. Geol.*, 2015, 415, 118–125.
- A. Heuser, A. Eisenhauer, K. E. Scholz-Ahrens and J. Schrezenmeier, Biological fractionation of stable Ca isotopes in Göttingen minipigs as a physiological model for Ca homeostasis in humans, *Isotopes Environ. Health Stud.*, 2016, 52 (6), 633–648.
- T. Tacail, *Calcium isotope physiology in mammals*, Ph.D. Thesis, Université de Lyon, 2017.
- Q. Li, M. Thirlwall and W. Müller, Ca isotopic analysis of laser-cut microsamples of (bio)apatite without chemical purification, *Chem. Geol.*, 2016, 422, 1–12.
- J. Skulan and D. J. DePaolo, Calcium isotope fractionation between soft and mineralized tissues as a monitor of calcium use in vertebrates., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, 96 (24), 13709–13713.
- J. Skulan, T. Bullen, A. D. Anbar, J. E. Puzas, L. S. Ford, A. LeBlanc and S. M. Smith, Natural calcium isotopic composition of urine as a marker of bone mineral balance, *Clin. Chem.*, 2007, 53 (6), 1155–1158.
- A. D. Melin, B. E. Crowley, S. T. Brown, P. V. Wheatley, G. L. Moritz, F. T. Yit Yu, H. Bernard, D. J. DePaolo, A. D. Jacobson and N. J. Dominy, Calcium and carbon stable isotope ratios as paleodietary indicators, *Am. J. Phys. Anthropol.*, 2014, 154 (4), 633–643.
- L. M. Reynard, J. A. Pearson, G. M. Henderson and R. E. M. Hedges, Calcium isotopes in juvenile milk-consumers, *Archaeometry*, 2013, 55 (5), 946–957.
- T. Hirata, M. Tanoshima, A. Suga, Y. Tanaka, Y. Nagata, A. Shinohara and M. Chiba, Isotopic analysis of calcium in blood plasma and bone from mouse samples by multiple collector-ICP-mass spectrometry, *Anal. Sci.*, 2008, 24 (11), 1501–1507.
- T. Tacail, B. Thivichon-Prince, J. E. Martin, C. Charles, L. Viriot and V. Balter, Assessing human weaning practices with calcium isotopes in tooth enamel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2017, 114 (24), 6268–6273.
- T. Tacail, J. E. Martin, F. Arnaud-Godet, J. F. Thackeray, T. E. Cerling, J. Braga and V. Balter, Calcium isotopic patterns in enamel reflect different nursing behaviors among South African early hominins, *Sci. Adv.*, 2019, 5 (8), eaax3250.
- A. Eisenhauer, M. Müller, A. Heuser, A. Kolevica, C. C. Glüer, M. Both, C. Laue, U. V. Hehn, S. Kloth, R. Shroff and J. Schrezenmeier, Calcium isotope ratios in blood and urine: a new biomarker for the diagnosis of osteoporosis, *Bone Rep.*, 2019, 10, 100200.
- J. L. L. Morgan, J. L. Skulan, G. W. Gordon, S. J. Romaniello, S. M. Smith and A. D. Anbar, Rapidly assessing changes in bone mineral balance using natural stable calcium isotopes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2012, 109 (25), 9989–9994.
- A. Heuser and A. Eisenhauer, A pilot study on the use of natural calcium isotope ( $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ ) fractionation in urine as a proxy for the human body calcium balance, *Bone*, 2010, 46 (4), 889–896.
- M. B. Channon, G. W. Gordon, J. L. L. Morgan, J. L. Skulan, S. M. Smith and A. D. Anbar, Using natural, stable calcium isotopes of human blood to detect and monitor changes in bone mineral balance, *Bone*, 2015, 77, 69–74.
- R. Shroff, M. Fewtrell, A. Heuser, A. Kolevica, A. Lalayiannis, L. Mcalister, S. Silva, N. Goodman, C. P. Schmitt, L. Biassoni, A. Rahn, D.-C. Fischer and A. Eisenhauer, Naturally occurring stable calcium isotope ratios in body compartments provide a novel biomarker of bone mineral balance in children and young adults, *J. Bone Miner. Res.*, 2021, 36 (1), 133–142.
- A. Hassler, J. E. Martin, R. Amiot, T. Tacail, F. A. Godet, R. Allain and V. Balter, Calcium isotopes offer clues on resource partitioning among Cretaceous predatory dinosaurs, *Proc. Biol. Sci.*, 2018, 285 (1876), 20180197.
- J. E. Martin, T. Tacail, J. Braga, T. E. Cerling and V. Balter, Calcium isotopic ecology of Turkana Basin hominins, *Nat. Commun.*, 2020, 11 (1), 3587.
- T. Tacail, E. Albalat, P. Télouk and V. Balter, A simplified protocol for measurement of Ca isotopes in biological samples, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, 29 (3), 529.
- A. Heuser, P. Frings-Meuthen, J. Rittweger and S. J. G. Galer, Calcium isotopes in human urine as a diagnostic tool for bone loss: additional evidence for time delays in bone response to experimental bed rest, *Front. Physiol.*, 2019, 10, 12.
- M. Peacock, Calcium metabolism in health and disease, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2010, 5 (Supplement 1), S23–S30.
- A. H. Doherty, C. K. Ghalambor and S. W. Donahue, Evolutionary physiology of bone: bone metabolism in changing environments, *Physiology*, 2015, 30 (1), 17–29.
- M. C. Peterson and M. M. Riggs, A physiologically based mathematical model of integrated calcium homeostasis and bone remodeling, *Bone*, 2010, 46 (1), 49–63.
- J.-Y. Dourmad, M. Etienne, J. Noblet and D. Causeur, Prédiction de la composition chimique des truies reproductrices à partir du poids vif et de l'épaisseur de lard dorsal, *J. Rech. Porcine Fr.*, 1997, 29, 255–262.
- M. A. Giesemann, A. J. Lewis, P. S. Miller and M. P. Akhter, Effects of the reproductive cycle and age on calcium and phosphorus metabolism and bone integrity of sows, *J. Anim. Sci.*, 1998, 76 (3), 796–807.
- M. Etienne, C. Legault, J.-Y. Dourmad and J. Noblet, Production laitière de la truie: estimation, composition, facteurs de variation et évolution, *J. Rech. Porcine Fr.*, 2000, 32, 253–264.
- F. Klobasa, E. Werhahn and J. E. Butler, Composition of sow milk during lactation, *J. Anim. Sci.*, 1987, 64 (5), 1458–1466.

36. S. L. Goff, E. Albalat, A. Dosseto, J. Godin and V. Balter, Determination of magnesium isotopic ratios of biological reference materials via multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2021, 35 (10), e9074.
37. C. N. Marechal, P. Telouk and F. Albarede, Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry, *Chem. Geol.*, 1999, 156 (1–4), 251–273.
38. T. Tacaïl, P. Telouk and V. Balter, Precise analysis of calcium stable isotope variations in biological apatites using laser ablation MC-ICPMS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016, 31 (1), 152–162.
39. A. Heuser and A. Eisenhauer, The calcium isotope composition ( $\delta^{44/40}\text{Ca}$ ) of NIST SRM 915b and NIST SRM 1486, *Geostand. Geoanal. Res.*, 2008, 32 (3), 311–315.
40. K. Jaouen, L. Pouilloux, V. Balter, M. L. Pons, J. J. Hublin and F. Albarède, Dynamic homeostasis modeling of Zn isotope ratios in the human body, *Metallomics*, 2019, 11 (6), 1049–1059.
41. J. Novotný, P. Reichel, B. Kósa and D. Šipoš, Excretion of calcium, phosphorus, magnesium and sodium in lactating sows, *Folia Vet.*, 2018, 60 (2), 61–65.
42. K. E. Scholz-Ahrens, G. Delling, B. Stampa, A. Helfenstein, H. J. Hahne, Y. Açı̇l, W. Timm, R. Barkmann, J. Hassenpflug, J. Schrezenmeir and C. C. Glüer, Glucocorticosteroid-induced osteoporosis in adult primiparous Göttingen miniature pigs: effects on bone mineral and mineral metabolism, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2007, 293 (1), E385–E395.
43. C. S. Kovacs and G. E. Fuleihan, Calcium and bone disorders during pregnancy and lactation, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 2006, 35 (1), 21–51.
44. K. E. Jones, J. Bielby, M. Cardillo, S. A. Fritz, J. O'Dell, C. D. L. Orme, K. Safi, W. Sechrest, E. H. Boakes, C. Carbone, C. Connolly, M. J. Cutts, J. K. Foster, R. Grenyer, C. A. Plaster, S. A. Price, E. A. Rigby, J. Rist, A. Teacher and A. Purvis, PanTHERIA: a species-level database of life history, ecology, and geography of extant and recently extinct mammals, *Ecology*, 2009, 90 (9), 2648.
45. S. L. Hansard, H. Itoh, J. C. Glenn and D. M. Thrasher, Placental transfer and fetal utilization of calcium in developing swine, *J. Nutr.*, 1966, 89 (3), 335–340.
46. H. Itoh, S. L. Hansard, J. C. Glenn, F. H. Hoskins and D. M. Thrasher, Placental transfer of calcium in pregnant sows on normal and limited-calcium rations, *J. Anim. Sci.*, 1967, 26 (2), 335–340.
47. J. Štulc, Placental transfer of inorganic ions and water, *Physiol. Rev.*, 1997, 77 (3), 805–836.
48. D. R. Perrin, The chemical composition of the colostrum and milk of the sow, *J. Dairy Res.*, 1955, 22 (1), 103–107.
49. R. B. Trayler and M. J. Kohn, Tooth enamel maturation reequilibrates oxygen isotope compositions and supports simple sampling methods, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2017, 198, 32–47.
50. K. Bøe, The process of weaning in pigs: when the sow decides, *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 1991, 30 (1–2), 47–59.



## D. Perspectives sur les effets de la lactation

L'étude présentée dans ce chapitre a permis de clarifier les causes des différences mâle/femelle de composition isotopique du Ca des os documentées chez certaines espèces de mammifères (e.g. le mouton domestique : Reynard et al., 2010). Sur la base de ces connaissances et des modélisations réalisées dans cette étude, il est désormais clair que les périodes prolongées de lactation (de l'ordre de plusieurs mois pour un mammifère de la taille d'un cochon ou d'un mouton) permettent de modifier la composition isotopique du Ca des os des individus femelles en modifiant de manière prolongée la composition isotopique de leur sang. Les effets de la gestation peuvent semble-t-il également jouer un rôle dans ces différences mâle/femelle en modifiant le fractionnement isotopique os-alimentation (i.e.  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{os-alimentation}}$  plus proche de 0 que pour les autres espèces de la littérature), mais ce facteur semble n'intervenir qu'au second ordre derrière la lactation lorsque les deux phénomènes sont de durée similaire. En effet, la gestation du cochon semble modifier deux fois moins les valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  du sang que la lactation, si l'on fait l'hypothèse que  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{os-alimentation}} \approx 0,54 \text{ ‰}$  en dehors des périodes de reproduction et de lactation (conformément à la littérature : Tacail, 2017 ; Tacail et al., 2020). Si les données acquises expérimentalement concernent principalement le cochon domestique, ces dernières rejoignent des observations similaires d'augmentation des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  du sang faites chez la souris lors de l'allaitement (Hirata et al., 2008). Il est possible que le fractionnement isotopique du Ca entre le sang et le lait varie d'une espèce à une autre, potentiellement en fonction des différences de gradient de concentration en Ca entre le liquide extracellulaire et le lait des différentes espèces (Cross et al., 2014). Cependant ce fractionnement semble rester assez marqué chez les différentes espèces étudiées jusqu'ici (humain :  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{lait-sang}} = -0,36 \text{ ‰}$ , Tacail, 2017 ; cochon :  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{lait-sang}} = -0,58 \pm 0,12 \text{ ‰}$ , Hassler et al., 2021b ; brebis :  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{lait-alimentation}} = -0,6 \text{ ‰}$ , Chu et al., 2006), une conclusion également portée par les valeurs basses de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  généralisée dans les produits laitiers ( $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}} < -1 \text{ ‰}$  : Chu et al., 2006 ; Gussone et Heuser, 2016 ; Heuser, 2016 ; Tacail, 2017 ; Tacail et al., 2017). Ceci suggère que des différences mâle/femelle de composition isotopique du Ca résultant de la lactation peuvent se manifester chez diverses espèces de mammifères. Cependant, afin qu'une espèce puisse présenter de telles différences dans son squelette, il est nécessaire que les

périodes d'allaitement s'accompagnent d'une production de lait suffisamment importante pour impacter la composition isotopique du Ca du sang, et que les femelles passent une fraction importante de leur vie à allaiter (i.e. longues périodes d'allaitement ou périodes d'allaitement successives séparées par peu de temps, tel que chez les animaux d'élevages laitiers, les rongeurs commensaux de l'espèce humaine ou chez certains marsupiaux par exemple : Ernest, 2003 ; Jones et al., 2009). Le modèle proposé par cette étude prédit par exemple que le squelette du cochon ne sera significativement affecté qu'à partir de 100 jours d'allaitement environ, et que l'amplitude de ce changement isotopique diminuera de moitié après 3,8 ans sans allaitement. Cette étude fournit donc des perspectives de premier plan pour expliquer l'hétérogénéité des résultats présentés dans le chapitre IV.



# Chapitre IV - Variabilité des effets de la lactation chez les mammifères

## A. *Préambule*

Avant cette thèse, les rares études portant sur les différences isotopiques du Ca induites par le sexe ont pu documenter ces différences chez le mouton (Reynard et al., 2010) et l'absence de ces différences chez l'humain (Reynard et al., 2010, 2013). Il était donc difficile de concevoir un outil capable d'identifier des capacités de lactation chez des mammifères fossiles en se basant sur ces seules données. L'objectif des études présentées dans ce chapitre IV est donc de documenter la manifestation de différences mâle/femelle (i.e. inter-sexes) de composition isotopique du Ca (essentiellement du Ca osseux) chez différentes espèces de mammifères éloignées phylogénétiquement, physiologiquement et/ou écologiquement. Ces études portent sur d'autres espèces de mammifères placentaires que l'humain ou le mouton, à savoir le cerf élaphe (*Cervus elaphus*) et la souris (*Mus musculus*), mais également sur une espèce marsupiale, le wallaby de l'île Eugène (*Macropus eugenii*), et sur deux espèces monotrèmes : l'ornithorynque (*Ornithorhynchus anatinus*) et l'échidné à nez court (*Tachyglossus aculeatus*).

## B. *Article : Calcium isotopic variability of cervid bioapatite and implications for mammalian physiology and diet*

### 1. Introduction

Parmi les différentes espèces étudiées dans le contexte de ce chapitre IV, le cerf élaphe (*Cervus elaphus*) a fait l'objet d'une attention particulière. Ce choix fut motivé à la fois par la nature et la qualité du matériel disponible, mais également du fait de la variété des questions qui se posaient autour des cervidés et de la composition isotopique du Ca de leurs tissus. Les spécimens étudiés proviennent tous de la même zone géographique restreinte, à savoir le massif des Bauges, situé à cheval entre la Savoie et la Haute-Savoie. Ces spécimens sont tous morts en 2015, après quoi une partie de leurs squelettes

(notamment les mandibules) a été intégrée aux collections du laboratoire PALEVOPRIM (UMR CNRS 7262 – Université de Poitiers, France). Par conséquent, l'ensemble de ces spécimens a vécu en même temps et dans le même environnement, ce qui limite la variabilité des sources de Ca disponibles pour ces animaux et favorise l'identification de différences isotopiques d'origines physiologique et sexuelle. Un autre intérêt de ces spécimens provient des dents présentes sur les mandibules intégrées aux collections. Ces dents ont fait l'objet d'analyses détaillées permettant de renseigner l'évolution de la composition isotopique des individus entre leur naissance et leur maturité sexuelle. Ceci donnait l'opportunité de décrire les conséquences de l'allaitement et du sevrage sur la composition isotopique du Ca de l'émail d'une nouvelle espèce de mammifère. Une autre raison de s'intéresser de près à cette espèce provient de la composition isotopique particulière que les cervidés manifestent dans certaines faunes fossiles (Martin et al., 2017b ; Dodat et al., 2021). Ces compositions isotopiques, particulièrement appauvries en isotopes lourds du Ca pour des herbivores, posent des questions quant aux conséquences isotopiques de certains aspects de leur physiologie et de leur comportement. La formation des bois (organe constitué essentiellement d'os et dont la formation saisonnière mobilise des quantités notables de Ca) ou la consommation d'os (i.e. ostéophagie) étaient notamment suspectées d'être à l'origine de ces compositions isotopiques particulières du Ca. En effet, l'ostéophagie est un comportement alimentaire qui n'est pas sans conséquences sur les apports de Ca et qui est fréquemment observé chez ces animaux (à partir d'os trouvés dans la nature tels que les bois perdus par leurs congénères les années précédentes). Ce contexte a donc motivé des mesures pilotes sur les bois de cervidés, ainsi que de nouvelles investigations menées sur une population de rennes (*Rangifer tarandus*) fossiles chez qui des valeurs relativement basses de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'émail (par rapport au reste de la faune associée) avaient précédemment été documentées.

## 2. Résumé

Des indices suggèrent que les compositions isotopiques du Ca de la bioapatite des vertébrés sont influencées par l'alimentation et le niveau trophique des animaux. Cependant, ces indices font face au cas de plusieurs espèces de mammifères dont la composition isotopique du Ca de l'apatite est en décalage avec leur niveau trophique réel. Ces observations suggèrent que l'alimentation n'est pas le

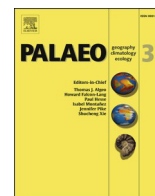
seul facteur modulant les compositions isotopiques du Ca des os et de l'émail dentaire des mammifères. Pour clarifier cette question, nous avons sélectionné une population actuelle de cerfs élaphe (*Cervus elaphus*) originaires du Parc naturel régional des Bauges (Alpes, France), afin qu'elle serve de modèle pour documenter les effets de la physiologie sur la composition isotopique du Ca des tissus minéralisés des cervidés ainsi que des autres mammifères. Nous avons par la suite mené de nouvelles investigations sur la population de rennes (*Rangifer tarandus*) fossiles du gisement de Jaurens (daté du Pléistocène tardif entre 32,6 et 29,7 ka BP et localisé en France), cette population ayant été précédemment décrite comme présentant des compositions isotopiques relativement appauvries en isotopes lourds au regard de l'alimentation herbivore des individus. La combinaison d'analyses de composition isotopique du Ca réalisées sur les os ainsi que sur différentes zones de l'émail dentaire permet de discuter des potentielles sources de variabilité isotopique chez les individus adultes et juvéniles. Les causes de variabilité discutées dans cet article incluent les effets de la gestation, de la lactation, de la genèse des bois, de l'ostéophagie, de l'absorption de minéraux sur des affleurements et de la consommation ciblée de certaines plantes (i.e. écologie pisseur/brouteur). Nos résultats suggèrent que la lactation a un effet sur la composition isotopique de l'os ( $\delta^{44/42}\text{Ca} = +0,19 \pm 0,09 \text{ ‰}$  ; intervalle de confiance à 95 %), tandis que d'autres facteurs tels que la gestation ou la genèse des bois demeurent secondaires. Les micro-échantillonnages réalisés en série sur l'émail dentaire ont permis de détecter les périodes susceptibles d'être influencées par la consommation de lait maternel ou par une alimentation supplémentée en Ca (e.g. ostéophagie, consommation de minéraux naturels). Grâce à cette méthode et à ces avancées, nous avons collecté des données sur les rennes de Jaurens qui sont désormais plus cohérentes avec le niveau trophique de ces animaux (i.e. celui de consommateurs de plantes). Ceci démontre que grâce aux micro-prélèvements en série, il devient possible de démêler les signaux écologiques et physiologiques derrière les compositions isotopiques du Ca de l'émail. Cette méthode permet de pousser encore plus loin les applications possibles des isotopes du Ca dans les domaines de la paléoécologie, de la paléo-physiologie et de la paléo-éthologie.

### 3. Article



Contents lists available at ScienceDirect

## Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/palaeo](http://www.elsevier.com/locate/palaeo)

Invited Research Article

## Calcium isotopic variability of cervid bioapatite and implications for mammalian physiology and diet

A. Hassler<sup>a,\*</sup>, J.E. Martin<sup>a</sup>, G. Merceron<sup>b</sup>, M. Garel<sup>c</sup>, V. Balter<sup>a</sup><sup>a</sup> Univ. Lyon, ENS de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR 5276 Laboratoire de Géologie de Lyon : Terre, Planètes, Environnement, F-69007 46 Allée d'Italie, Lyon, France<sup>b</sup> Laboratoire de Paléontologie, Évolution, Paléoécossystèmes, Paléoprimateologie (PALEVOPRIM), UMR 7262 CNRS & Université de Poitiers, 86073 Poitiers, Cedex 9, France<sup>c</sup> Unité Ongulés Sauvages, Office Français de la Biodiversité (OFB; ex-ONCFS), 5 allée de Bethléem, Z.I. Mayencin, F-38610 Gières, France

## ARTICLE INFO

Editor name: Chennai Guest Editor

## Keywords:

Stable isotopes  
Geochemistry  
Paleoecology  
Lactation  
Mineral supplementation  
Antlerogenesis

## ABSTRACT

There are clues that calcium (Ca) isotope composition of vertebrate bioapatite is influenced by diet and trophic level. These clues however conflict with several cases of mammal species exhibiting Ca isotope compositions which are inconsistent with their trophic levels. These observations support that diet may not be the only factor driving the Ca isotope composition in mammalian enamel and bone. To investigate this question, we selected a modern *Cervus elaphus* population (Bauges Natural Regional Park, Alps, France) to serve as a model for Ca isotope physiology of cervids and other mammals. Subsequently, we reinvestigated the case of the fossil *Rangifer tarandus* population from Jaurens (Late Pleistocene locality, 32.6 to 29.7 kyr BP, France), a population for which abnormal <sup>44</sup>Ca-depleted isotope compositions (regarding the low trophic level of reindeers) have been previously documented. By combining bone samplings and serial enamel micro-samplings, we discuss the main potential sources of Ca isotopic variability in bioapatite of young and adult individuals. This includes the effects of gestation, lactation, antlerogenesis, browser-grazer ecologies, osteophagia and natural mineral licks. Our results suggest an important effect of lactation on bone Ca isotope composition ( $\delta^{44/42}\text{Ca} = +0.19 \pm 0.09\%$ ; 95% confidence interval), whereas other factors such as gestation or antlerogenesis seem more secondary. Our enamel micro sampling method allowed to detect when enamel Ca isotope composition could be affected by milk consumption or mineral supplementation. Thanks to these advances, we collected new data from the Pleistocene reindeers of Jaurens, which are now consistent with their known low trophic level and plant-based diet. This demonstrates that disentangling ecological and physiological signals within enamel Ca isotope compositions is possible by using serial micro-sampling. This approach allows retrieving accurate trophic information from this proxy and truly pushes forward the limits of Ca isotope applications regarding paleoecology, physiology and ethology.

## 1. Introduction

An increasing number of studies suggest that the stable Ca isotope composition of the hydroxylapatite of vertebrate bone and teeth, represents a record of diet within modern and fossil skeletal remains (Clementz et al., 2003; Chu et al., 2006; Reynard et al., 2010; Heuser et al., 2011; Clementz, 2012; Martin et al., 2015, 2017a, b, 2018; Hassler et al., 2018). Body Ca originates mainly from food and water for land animals, but the Ca isotope composition of animals diverges from their food. At the opposite of carbon and nitrogen patterns, heavy Ca isotopes

are discriminated against light Ca isotopes during their routing from food to tissues, notably in bone and enamel (Skulan and DePaolo, 1999; Chu et al., 2006; Hirata et al., 2008; Tacaïl et al., 2014; Heuser, 2016; Heuser et al., 2016). This results in a trophic level effect (hereafter TLE) with bones of herbivorous animals exhibiting more <sup>44</sup>Ca-depleted compositions compared to the plants they consume, and carnivorous predators following the same trend compared to their prey. This ultimately leads to an isotopic clustering of animal taxa as a function of their trophic level, with primary consumers exhibiting a heavier Ca isotope composition than tertiary consumers, and secondary consumers

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [auguste.hassler@ens-lyon.fr](mailto:auguste.hassler@ens-lyon.fr) (A. Hassler), [jeremy.martin@ens-lyon.fr](mailto:jeremy.martin@ens-lyon.fr) (J.E. Martin), [gildas.merceron@univ-poitiers.fr](mailto:gildas.merceron@univ-poitiers.fr) (G. Merceron), [mathieu.garel@ofb.gouv.fr](mailto:mathieu.garel@ofb.gouv.fr) (M. Garel), [vincent.balter@ens-lyon.fr](mailto:vincent.balter@ens-lyon.fr) (V. Balter).<https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2021.110418>

Received 3 June 2020; Received in revised form 13 February 2021; Accepted 2 April 2021

Available online 22 April 2021

0031-0182/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

exhibiting an intermediate isotopic composition. This has been observed in land ecosystems (Chu et al., 2006; Reynard et al., 2010; Martin et al., 2017a, 2018; Hassler et al., 2018; Dodat et al., 2021) and marine ecosystems (Clementz et al., 2003; Clementz, 2012; Martin et al., 2015, 2017b), even though for marine animals the Ca originating from seawater likely buffers dietary Ca intakes. These studies are based on  $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$  or  $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$  analyses of the hydroxylapatite of bone and teeth, commonly expressed as  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  and  $\delta^{44/40}\text{Ca}$ , respectively (equivalent to the variation in ‰ compared to the Ca isotope ratios of a reference material, further detailed in Section 2.6). Moreover, this technique allows to study the ecology of both modern and fossil specimens thanks to the good preservation potential of such mineralized tissues and their Ca (Heuser et al., 2011; Martin et al., 2017a). This body of studies supports that Ca isotopes are a promising tool for diet and trophic inferences in modern and paleontological contexts with a large temporal range of action, providing the fact that mineralized tissues are preserved. However, inferring a TLE within mammalian communities relies on first order observations of Ca isotopic variability among predators and their prey. As highlighted in previous work, many uncertainties remain concerning the mechanisms behind fractionation processes as related to physiology versus environmental sources. As such, not all taxa are strictly following the theoretical isotopic/trophic clustering in the faunas studied so far. For some specific faunas and trophic niches, diet seems hard to constrain with Ca isotopes only (Reynard et al., 2010; Melin et al., 2014). Moreover, bone or enamel Ca isotope compositions sometimes overlap between herbivores and predators, with herbivores occasionally exhibiting isotope compositions more  $^{44}\text{Ca}$ -depleted than predators from the same fauna (e.g. hippopotamidae, mammoths and cervidae; see Martin et al., 2017a, 2018; Dodat et al., 2021). This raises important questions about what can generate such issues, and highlights how critical it is for the accurate use of this proxy to reconcile the evidences of TLE with the occasional decoupling recorded between trophic level and Ca isotope compositions.

The isotopic offset between diet and bone which generates the TLE ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{diet-bone}}$ ) is relatively constant among mammal species with a value of  $-0.54 \pm 0.08\text{‰}$  (2 standard error, 20 individuals from 6 mammal species; reviewed in Tacail et al. (2017)), despite resulting from the combination of numerous body Ca fluxes associated with Ca isotope fractionation (Skulan and DePaolo, 1999; Chu et al., 2006; Hirata et al., 2008; Tacail et al., 2014; Heuser et al., 2016; Tacail, 2017). The most impactful fluxes identified so far are the kidney Ca reabsorption from primary urines (Skulan et al., 2007; Heuser and Eisenhauer, 2010; Morgan et al., 2012; Tacail et al., 2014; Channon et al., 2015; Heuser et al., 2016, 2019; Eisenhauer et al., 2019), the milk production and excretion (Chu et al., 2006; Reynard et al., 2010; Hassler et al., 2021) and the bone mineralization (Skulan and DePaolo, 1999; Skulan et al., 2007; Heuser and Eisenhauer, 2010; Reynard et al., 2010; Morgan et al., 2012; Channon et al., 2015), although the significance of this last parameter has been recently questioned (Tacail, 2017; Tacail et al., 2020; Hassler et al., 2021). Changing these fluxes, like during gestation, lactation (Ramberg Jr et al., 1970; Cross et al., 1995; Giesemann et al., 1998; Karlsson et al., 2001; Wysolmerski, 2002; Vanhouten and Wysolmerski, 2003; Gallego et al., 2006; Kovacs and Fuleihan, 2006; Tacail, 2017) or antlerogenesis (Mitchell et al., 1976; Muir et al., 1987a, b), likely modifies the Ca isotopic equilibrium of the organism, the resulting  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{diet-bone}}$  offset, and could generate TLE discrepancies. Alternatively, the consumption of milk during nursing can also generate TLE discrepancies by changing the diet Ca isotope composition of non-weaned individuals compared to weaned individuals (Chu et al., 2006; Li et al., 2016, 2020; Tacail et al., 2017, 2019). Finally, Ca enriched mineral supplementation such as with mineral licks and osteophagia, as well as the Ca isotopic variability inherent to plants (Holmden and Bélanger, 2010; Gussone and Heuser, 2016; Schmitt, 2016; Moynier and Fujii, 2017; Martin et al., 2018; Griffith et al., 2020), are also able to blur the trophic clustering of Ca isotope compositions. The aim of this study is thus to investigate how these different factors

can affect bone and enamel Ca isotope compositions in modern animals, then to use this background to unravel a case study of TLE discrepancy previously documented.

We carried out the first part of this project by monitoring the bone and enamel Ca isotope compositions of a modern cervid population (red deer, *Cervus elaphus*) inhabiting the Bauges Natural Regional Park (NRP), Alps, (Savoie, France). This modern population then served as a model to discuss TLE discrepancies, and more precisely to discuss the case of the reindeers (*Rangifer tarandus*) from the Pleistocene locality of Jaurens (Corrèze, France). Martin et al. (2017a) showed that reindeers from this locality (dated between 32.6 and 29.7 kyr BP, Guérin et al., 1979) exhibit  $^{44}\text{Ca}$ -depleted compositions in tooth enamel down to a  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of  $-1.75 \pm 0.09\text{‰}$  (2 standard deviation; 3 individuals). This is different from the Ca isotope compositions of the other herbivores of this locality, and closer to the one of lions and wolves (Martin et al., 2017a). In accordance with the documented effects of nursing on the body Ca isotope composition of the young (Chu et al., 2006; Li et al., 2016, 2020; Tacail et al., 2017, 2019), Martin et al. (2017a) proposed that these negative  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values could result from the consumption of maternal milk by reindeers at the time when their analyzed molars were mineralizing (second molars, M2). Although this hypothesis is tempting, no direct evidence was available to prove that this phenomenon was responsible for the  $^{44}\text{Ca}$ -depleted isotope composition reported among Jaurens fossil cervids, leading to this new investigation.

To ensure the completion of our study, it was necessary to assess at which degree the Ca isotope composition of bone and enamel are comparable. Previous studies found differences in  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values between bone and enamel or bone and enameloid (Heuser et al., 2011; Tacail et al., 2014; Martin et al., 2015, 2017a), but it was unclear whether this offset ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-enamel}}$ ) was due to different Ca isotope fractionation coefficient during mineralization ( $\alpha_{\text{blood-bone}}$  and  $\alpha_{\text{blood-enamel}}$ ), to different mineralization timing, or to diagenesis. Our modern red deer population is free of diagenetic influence, and therefore, mineralization timings and differences between  $\alpha_{\text{blood-bone}}$  and  $\alpha_{\text{blood-enamel}}$  are the only factors affecting bone and enamel Ca isotopic differences. In other words, characterizing  $\alpha_{\text{blood-bone}}$  and  $\alpha_{\text{blood-enamel}}$  in red deer allow to accurately compare the different ontogenetic time periods recorded by these two tissues.

## 2. Material and methods

### 2.1. Modern specimens

We studied a total of 21 specimens of wild red deer of two age classes (subadult and adult) and sex (10 males, 11 females), coming from Bauges NRP, Alps, (Savoie, France, 45.69°N, 6.14°E) and slaughtered during the hunting season in 2015 (between October and November) as part of the local hunting activity. In order to identify lactation, gestation and antlerogenesis effects on the Ca isotope composition of mineralized tissues, we analyzed and compared the bone Ca isotope composition of females and males. Our two age classes allow to distinguish specimens free of strong lactation, gestation and antlerogenesis effects (two years old, referred as subadult) from the others (aged of three years or more, referred as adult). Ages of the individuals were estimated based on tooth eruption and attrition stages (Brown and Chapman, 1991a, 1991b; Table S1). The reproductive status of studied females was not directly monitored, but we know that most of females aged of two to three years already gave birth at least once (commonly more than 80% in comparable populations: (Gaillard et al., 2000; Bonenfant et al., 2002; Pellerin et al., 2014)). In addition, a large proportion of the females aged of three years or more are expected to have a fawn each year (about 80%). We can refine these estimations for the red deer population of Bauges NRP as we know the body mass of studied specimens and that fertility is strongly related to body mass in cervids. Females are usually fertile when attaining 80% of the adult body mass (Albon et al., 1986; Pellerin et al., 2014) and are around 30% heavier at the end of autumn if they did



not gave birth to a fawn earlier in the year (Mitchell et al., 1976; Clutton-Brock et al., 1982). These data allow to identify females which were too puny to be fertile, and females which were suspiciously too fat to have nursed a fawn recently. At the light of these data and knowing that the Bauges NRP deer population breed quite actively, we assume that adult females weighting between 65 and 105 kg have given birth to a fawn during the 2015 birth season (Table S1).

Bone samples were collected from mandibles, previously manually cleaned and boiled prior to be integrated to the collection of the PALEVO PRIM laboratory (UMR CNRS 7262 - University of Poitiers, France). For each mandible, bone sample powder was collected few centimeters under the second molar, with the help of a handheld drill (8200 Dremel equipped with a tungsten steel solid carbide bit). In order to remove any trace of dirt or other environmental contaminants, the first layer of bone surface was removed with the drill then cleaned with pure ethanol prior to sampling. Between 0.4 and 0.7 mg of bone powder were sampled and weighted prior to chemical preparation.

Along with bone sampling and in order to investigate intra-tissue and inter-tissue  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  variability, we selected two specimens for serial enamel micro-sampling. The first is an adult male with premolars P2, P3, P4, and molars M1, M2, M3 fully emerged and moderately worn (specimen ID number: UP-15CE5672, lab name: AB). The second is a juvenile female with deciduous premolar DP2, DP3, DP4, and molars M1, M2 fully emerged and with an erupting M3 in ongoing mineralization (specimen ID number: UP-15CE3734, lab name: JVB). The serial micro-samplings performed on these specimens provide snapshots of the enamel Ca isotope composition at different ages, depending on when each enamel zone mineralized. This ultimately allows to identify isotopic anomalies produced by milk consumption, osteophagia, mineral licks or occasional consumption of  $^{44}\text{Ca}$ -depleted plants. These deer specimens (AB and JVB), also had some plant leftovers trapped between their teeth. We collected these rests for elemental concentration analyses.

To assess the effect of antlerogenesis and antler consumption we selected an adult male red deer preserved with its skull, mandible and antlers in the collections of the Confluence Museum (Lyon, France). This specimen (ID number: MHNL-50002207, lab name: SPB) is of unknown European origin and has been sampled following the same bone sampling procedure than specimens from Bauges NRP. One sample has been retrieved from the mandible, the other three were retrieved on the main beam of the right antler, respectively at the base, the middle and the top of the antler.

## 2.2. Fossil specimens

In order to study the trophic position of reindeer from the Late Pleistocene Jaurens fauna and their peculiar Ca isotope composition, we selected four specimens to carry out serial enamel micro-sampling. We focused our efforts on enamel sampling instead of bones in order to limit diagenetic influence. All specimens are part of the paleontological collections of the Laboratory of Geology of Lyon (LGL-TPE, France). This includes two mandibles (one adult and one juvenile) with their associated teeth, and two isolated teeth (lower M1 and a lower DP4) from two different individuals. One of the two mandibles comes from an adult specimen with the teeth P2, P3, P4, M1, M2, M3 fully emerged and with significant tooth wear on the M1 (specimen ID number: UCBL-FSL 451.409, lab name: AJ). The second mandible comes from a juvenile specimen with the teeth DP2, DP3, DP4, M1 fully emerged and with the M2 erupting (specimen ID number: UCBL-FSL 451.389, lab name: JVJ). The isolated teeth are a lower left DP4 (specimen ID number: UCBL-FSL 451.398, lab name: ISO DP4) and lower right M1 (specimen ID number: UCBL-FSL 451.384, lab name: ISO M1), both with a minimal wear level. The lessons learned from modern specimens allow to critically discuss our new and previous (Martin et al., 2017a) enamel Ca isotope data collected on fossil reindeers from Jaurens.

## 2.3. Micro-sampling

We designed two different procedures of serial micro-sampling. For both we use a computer-assisted micro drill device (MicroMill), allowing the sampling of 80–120  $\mu\text{g}$  hydroxylapatite by drilling holes of 350–400  $\mu\text{m}$  wide and about 400  $\mu\text{m}$  depth. Teeth selected for micro-sampling were serially sampled by micro-drilling on the enamel between the apex (i.e. the top) and the neck of the tooth (i.e. the basal most enamel zone), along the growth axis of the best preserved cusp of the lingual face. The apex is mineralizing first whereas the enamel close to the neck is the last part of the enamel to mineralize. This sampling thus maximizes the studied intra-tooth time window and allows a high temporal resolution. When possible we performed serial micro-sampling using a “edge-drilling procedure”. In this case, the tooth (either isolated or extracted from a mandible) was cut along the growth axis in the central part of the cusp by using a Buehler IsoMet Low Speed precision sectioning saw with a diamond-studded circular saw blade. The edge of the enamel was then polished using sandpaper with decreasing grain sizes prior to perform the micro sampling. Sampling zones were located close to the enamel-dentine junction (EDJ) in order to minimize the temporal lag between the mineralization of appositional structures and enamel maturation (Blumenthal et al., 2014; Green et al., 2017; Traylor and Kohn, 2017; Müller et al., 2019). Alternatively, when extracting and cutting teeth was impossible or when the targeted spatial sampling resolution was sufficiently low, enamel has been micro-drilled from the outer side (“outer-drilling procedure”). For this procedure, the one or two first hundreds of  $\mu\text{m}$  of drilled enamel were not collected, in order to collect enamel relatively close to the EDJ similarly as with the edge-drilling procedure. The choice of procedure is reported in Tables S1 and S2.

## 2.4. Thin section and enamel age model

We were allowed to make thin sections on the micro sampled surface of the M1 of AB, JVB (red deer, Bauges) and ISO M1 (reindeer, Jaurens). Teeth were then sliced and polished in order to obtain 100  $\mu\text{m}$  thick sections. Observations in transmitted light microscopy failed to reveal neonatal lines within the enamel layers of the three M1 (AB, JVB, ISO M1), a structure observed in early mineralizing teeth of humans and other mammals that would mark birth (Klevezal and Mina, 1995; Zanolli et al., 2011; Dean et al., 2019). The age model necessary to anchor our enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  data was alternatively based on general observations made on tooth mineralization timing of red deer (Brown and Chapman, 1991b). Such data were not available for reindeer, but similarities between red deer and reindeer tooth eruption timings (Miller, 1972; Brown and Chapman, 1991b; Azorit et al., 2002) allow to use red deer data to build a coarse reindeer age model. As teeth are subject to wear, we spatially anchored our age model on the neck of teeth. The mean mineralization age of each enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  data point is then estimated based on the distance between the sampling zone and the neck of the tooth, on corresponding mineralization timings (Brown and Chapman, 1991b), and on the estimated full height of unworn teeth measured on young specimens. This method assumes a constant enamel mineralization rate along the tooth growth axis and inside tooth families. This method is thus not adapted to discuss inter-individual or intra-tooth differences in tooth mineralization rates and timings but allow for a fairly good estimation considering that enamel micro-samples average a body isotopic record spanning over a month to several months (further discussed in supplementary material T1). For studied red deers, unworn teeth displayed similar crown heights between specimens. Reindeer specimens, however, had unworn molars and premolars approximately 15% smaller than red deer, which has been considered in our age model.

## 2.5. Sample dissolution and ion chromatography

Immediately after sampling, bone and tooth samples were

transferred in Teflon beakers. All further manipulations have been done exclusively in a clean lab or under a laminar flux hood. Modern bone samples were dried with 500  $\mu\text{L}$  of pure ethanol evaporated at 70  $^{\circ}\text{C}$ . No attempt of leaching procedures has been carried out for fossil enamel samples, as previous Ca isotope analyses demonstrated no isotopic differences between leached and non-leached enamel in Jaurens samples (Martin et al., 2017a). All samples were dissolved using a mix of 1 mL of 15 M ultrapure nitric acid ( $\text{HNO}_3$ ) and 300  $\mu\text{L}$  of ultrapure hydrogen peroxide (30%). Beakers were left closed at ambient temperature for 1 h, then were heated at 130  $^{\circ}\text{C}$  during 1 to 2 h more with regular degassing of nitrous fumes. When production of nitrous fumes became limited, 300  $\mu\text{L}$  of ultrapure hydrogen peroxide (30%) were added and samples were left to dry down at 90  $^{\circ}\text{C}$  for a few hours. The presence of organic matter was then tested using 100  $\mu\text{L}$  of ultrapure hydrogen peroxide (30%). No effervescence was detected for any of the samples and solutions were thus left to dry down at 90  $^{\circ}\text{C}$ . Samples selected for elemental concentration analyses were dissolved in 0.5 M ultrapure  $\text{HNO}_3$  then split. A fraction of the solution was reserved for concentration analyses and the rest was dried down at 90  $^{\circ}\text{C}$ . These dried fractions and the samples not selected for concentration analyses were kept for Ca isotope analyses, dissolved in 300–500  $\mu\text{L}$  of 6 M ultrapure hydrochloric acid (HCl) and dried down at 90  $^{\circ}\text{C}$ .

The chromatography procedure used for Ca chemical purification is derived from Tacail et al. (2014). This consists in a double column chromatography, starting with an elution on AG 50WX-12 resin with ultrapure HCl, and followed by an elution on Eichrom Sr-specific resin with an ultrapure  $\text{HNO}_3$  medium. When high level of iron was suspected (e.g. fossil samples) a third column chromatography was performed, using 1 mL of AG1 X8 resin and following a procedure derived from Tacail et al. (2014). Blanks have been realized along the digestion and the chromatography, including total procedural blanks, which have undergone all the steps previously described and chromatography blanks.

## 2.6. Analytical procedures and nomenclature

For more clarity within this paper, the  $n$  notation refers to the number of samples or specimens whereas the  $n^*$  notation specifically refers to number of measurement replicates. The “s.d.” notation refers to “standard deviation”, whereas “s.e.” refers to “standard error”. Concentrations of major and trace elements were measured respectively on an inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (ICP-AES) (ICAP 7400 Series, Thermo Scientific) and on an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) (ICAP-Q, Thermo Scientific). The reliability of measurements has been controlled through a set of blanks and reference material (SRM1486), and by replicating measures to  $n^* = 2$  for each sample.

We measured the Ca isotope ratios ( $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$ ) using a multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometer (MC-ICP-MS, Neptune Plus, Thermo Scientific) following the method described in Tacail et al. (2014). Prior to Ca isotope analyses, Ca purified samples were dissolved and diluted in 0.05 M  $\text{HNO}_3$  in order to set the Ca concentration at 1.25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . This concentration matches that of the ICP Ca Lyon, our in-house bracketing reference material made of Specpure Ca plasma standard solution (Alfa Aesar) and described in previous studies (Tacail et al., 2014, 2017; Martin et al., 2015, 2017a). Unless explicitly mentioned, the Ca isotope compositions reported in this article are all expressed as  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  relatively to ICP Ca Lyon using the following formula:

$$\delta^{44/42}\text{Ca} = \left( \left( \frac{(^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca})_{\text{sample}}}{(^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca})_{\text{ICP Ca Lyon}}} - 1 \right) \times 1000 \right)$$

For easing comparisons with studies using other reference materials,  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  values are converted to  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{SRM915a}}$  in our tables and figures. Based on 71 measures compiled in the appendix of Martin et al. (2018), we converted  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  values to  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{SRM915a}}$

values by adding +0.518 ‰ to  $\delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{ICP Ca Lyon}}$  values. To express a difference of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value between two Ca reservoirs we use the  $\Delta$  notation based on the following formula:

$$\Delta x - y = \delta x - \delta y.$$

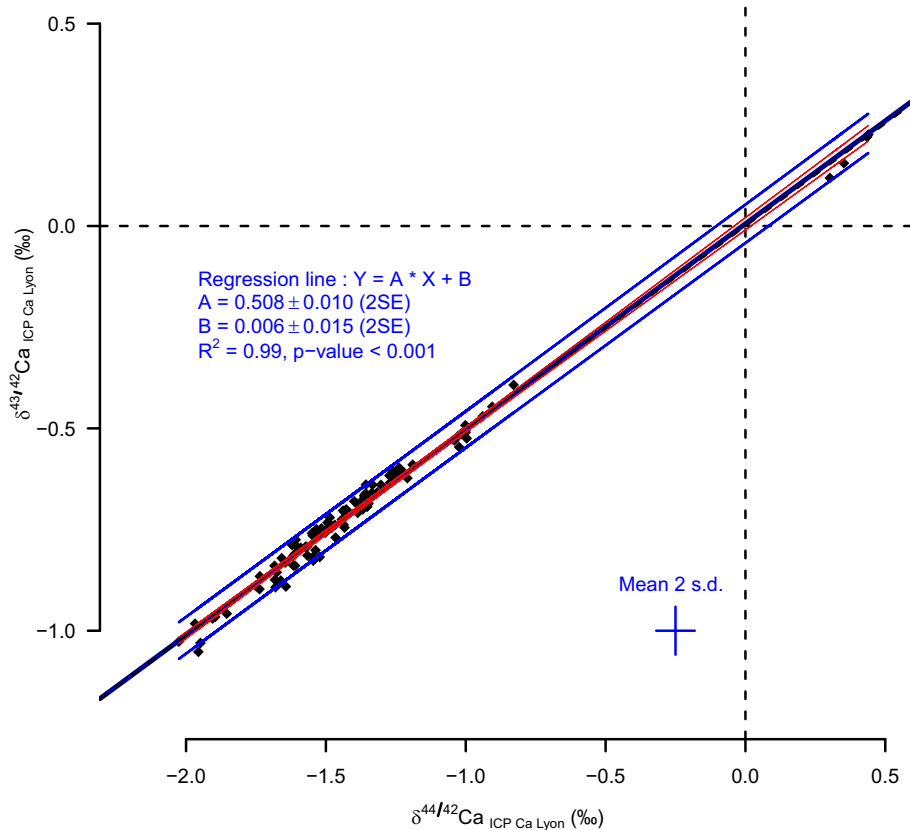
where  $x$  and  $y$  are different Ca reservoirs. Secondary reference materials of different matrix and documented Ca isotope composition have been used to ensure the accuracy of our analytical procedure and chemical purifications. The SRM1486 cow bone meal reference material (NIST) was used in that purpose, as well as the IAPSO sea water (OSIL). The Ca concentration of the blanks have also been measured with the Neptune Plus. All samples and standard measurements have been replicated to a  $n^* = 2$  or more (Tables S1 and S2). Sample Ca isotope compositions are considered different when their  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  mean value ( $\pm 2$  s.e.) do not overlap. Unpaired Wilcoxon rank-sum tests are used to assess if  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of different sample groups (e.g. male versus female  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values) are significantly different. These differences are also expressed in ‰ with a confidence interval calculated from a t-test (Welch’s test variant). These intervals emphasize the degree of confidence around these isotopic differences, but it has to be noted that results of Wilcoxon rank-sum tests are more appropriate to assess the statistical significance of these differences (essentially because of the small size of compared populations).

## 3. Results

### 3.1. Trueness and precision

Chromatography and total blanks display a maximum of 70 ng of Ca. This is several thousand times less than the amount of Ca in our macro-samples (e.g. bone samples) which is thus negligible. Most of our micro-samples (i.e. collected from spatial micro-sampling) contained more than 6250 ng of Ca, and in the worst cases about 3800 ng of Ca. In this case Ca from blanks is not completely negligible but its effect can be considered minimal. Indeed, a simple mass balance calculation shows that even a contamination with environmental Ca of extreme isotopic composition (close to seawater  $\approx 0.41\%$ ; Martin et al. (2015)) affecting an extremely  $^{44}\text{Ca}$ -depleted sample (e.g.  $\delta^{44/42}\text{Ca} = -2.00\%$ ) with 3800 ng of Ca would only generate a +0.04‰ difference. This unlikely +0.04‰ correspond to the maximum of contamination effect possibly expected with our blank levels for the smallest of our micro samples. Such effects can thus be neglected considering the order of magnitude of inter-sample differences discussed below.

The complete Ca isotope dataset of this study includes 104 samples and reference materials for a total of 358 accurate measurements. The correlation between  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  and  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of each of these samples/reference materials follows the predictions from the linear approximation of the exponential mass-dependent fractionation law (Fig. 1), with a slope value of  $0.508 \pm 0.010$  (2 s.e.), an intercept of  $0.006 \pm 0.015$  (2 s.e) and a  $R^2 = 0.99$  ( $p$ -value  $< 0.001$ ). This demonstrates that no mass independent fractionation or mass specific interference has affected our measurements. Along with our different sessions of analysis, the SRM1486 exhibited a mean  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of  $-0.99 \pm 0.13\%$  (2 s.d. inter-session,  $n = 8$  sessions) with a mean intra-session 2 s.d. of 0.08‰ ( $n = 88$  measurements). Our other secondary reference material, the IAPSO exhibited a mean  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of  $+0.38 \pm 0.12\%$  (2 s.d. inter-session,  $n = 5$  sessions) with a mean intra-session 2 s.d. of 0.06‰ ( $n = 14$  measurements). These results are both in the range of previously published data (Table S3) for the SRM1486 (Heuser and Eisenhauer, 2008; Tacail et al., 2016, 2017; Martin et al., 2018) and the IAPSO (Tacail et al., 2014; Martin et al., 2015). By considering all the measurements of samples and reference materials ( $n = 107$ ), the mean intra-sample reproducibility was of  $\pm 0.07\%$  (2 s.d.,  $n = 358$  measurements).



**Fig. 1.** Mass dependency.

Three isotope plot:  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  as a function of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  (‰, expressed relatively to ICP Ca Lyon) for all samples and standards analyzed for Ca isotope compositions in this study. The regression line of these Ca isotope compositions (central blue line) has a y-axis intercept of  $0.006 \pm 0.015$  (‰, 2 s.e.), indistinguishable from theoretical 0‰ intercept. The slope value of this line is  $0.509 \pm 0.016$  (2 s.e.), indistinguishable from the 0.507 slope predicted by the exponential mass-dependent fractionation law (black dotted line). Error bars at the bottom right are average 2 s.d. for  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  and  $\delta^{44/42}\text{Ca}$ . The two most external lines (blue) delimit the prediction interval whereas the two lines (red) around the central line correspond to the 95% confidence interval of the regression line. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

### 3.2. Bone data among modern cervids

The bone sample set from Bauges NRP displays a range of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values between  $-1.62 \pm 0.19\text{‰}$  (2 s.d.,  $n^* = 3$ ) and  $-1.22 \pm 0.04\text{‰}$  (2 s.d.,  $n^* = 2$ ), with a mean 2 s.d. of  $0.09\text{‰}$ . Females red deer have a mean bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of  $-1.36 \pm 0.24\text{‰}$  (2 s.d.,  $n = 11$ ), and males a mean bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of  $-1.41 \pm 0.27\text{‰}$  (2 s.d.,  $n = 10$ ). The  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of female individuals are statistically indistinguishable from males when considering all age classes together (Wilcoxon rank-sum test,  $p$ -value = 0.3494), but this changes when considering adult specimens only (Wilcoxon rank-sum test,  $p$ -value = 0.0499). Isolating females who most likely gave birth during the last birth season from the other females allows for an even clearer distinction (Fig. 2). These six females (later referred as lactating hinds or females) display bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values higher of  $+0.23 \pm 0.08\text{‰}$  (95% confidence interval; Wilcoxon rank-sum test :  $p$ -value < 0.01; Fig. 3) compared to the two adult females in the body mass range which suggest that they did not reproduce recently (later referred as yield hinds). Lactating hinds bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values also differ significantly from adult males (Wilcoxon rank-sum test,  $p$ -value < 0.01; Fig. 3) with a mean bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value higher of  $+0.17 \pm 0.12\text{‰}$  (95% confidence interval). Bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of lactating hinds compared to bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of adult males and yield hinds pulled together are higher of  $+0.19 \pm 0.09\text{‰}$  (95% confidence interval; Wilcoxon rank-sum test :  $p$ -value < 0.01). The three subadult females display a range of bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values which overlap with both lactating and yield adult hinds, with the heaviest subadult females displaying the highest bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values. Finally, the correlation between adult male body mass and bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values is virtually absent ( $r = -0.29$ ,  $p$ -value = 0.49,  $n = 8$ ). We can make no distinction between bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of adult males and subadult males (Wilcoxon rank-sum test,  $p$ -value = 0.18) or between adult males and subadult or yield females (Wilcoxon rank-sum test,  $p$ -value = 0.62).

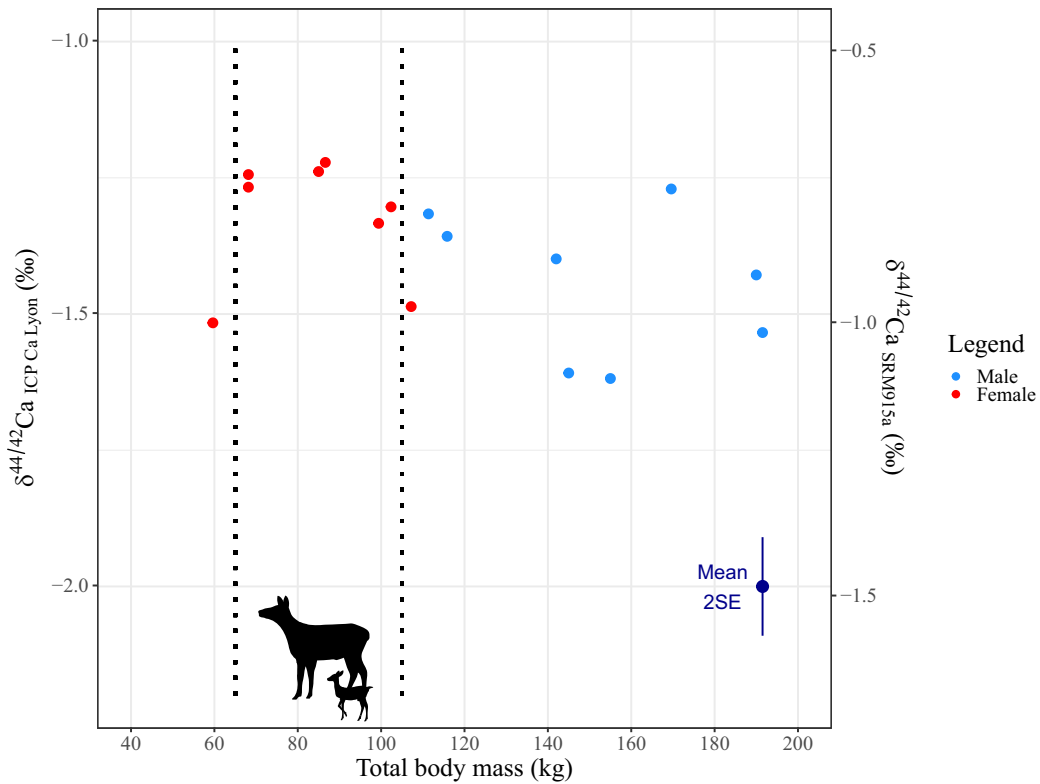
The SPB specimen displays a mandible bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of  $-1.62$

$\pm 0.04\text{‰}$  (2 s.d.,  $n^* = 3$ ), whereas the antler bone displays  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of  $-1.43 \pm 0.02\text{‰}$  (2 s.d.,  $n^* = 4$ ) at the base,  $-1.49 \pm 0.06\text{‰}$  (2 s.d.,  $n^* = 3$ ) in the middle and  $-1.38 \pm 0.06\text{‰}$  (2 s.d.,  $n^* = 4$ ) at the top of the right antler (Fig. 4). Each of the antler  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values is significantly higher from that of the mandible by  $0.13\text{‰}$  or more. Calcium and phosphorus concentrations decrease from the base to the tip of the antlers, whereas magnesium reaches its maximum concentration in the middle part of the antler (Table S4).

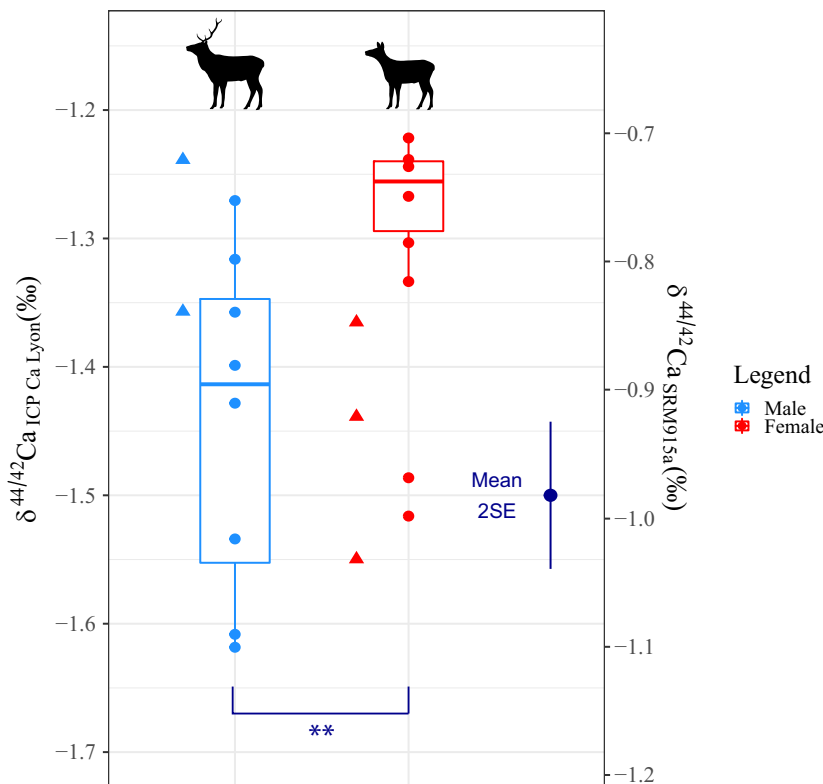
### 3.3. Enamel micro-samples

Enamel and bone Ca isotope data of specimen AB (adult male) and JVB (juvenile female) are reported in Fig. 5. Among these individuals, a majority of enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of most adult parts of M3 and M2 teeth are undistinguishable from bone, whereas the DP4 (when present) and the early mineralizing part (next to the crown apex) of the M1 display  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values which are  $-0.23\text{‰}$  to  $-0.37\text{‰}$  lower than bones. A similar difference is observed within the M1 of the AB specimen, with early mineralizing parts exhibiting a  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value  $-0.22\text{‰}$  lower than late mineralizing parts. Plant remains found between tooth cusps from AB and JVB display a Ca concentration of 1.83 wt% and 0.99 wt%, respectively. The complete  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  dataset of the specimens from the Bauges NRP is reported in Table S1.

Enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of fossil reindeer (Fig. 6) range between  $-1.21 \pm 0.04\text{‰}$  (2 s.d.,  $n^* = 3$ ) and  $-2.03 \pm 0.08\text{‰}$  (2 s.d.,  $n^* = 2$ ). As for studied red deer, specimens with unworn M1 (JVJ and ISO M1) exhibit an important change of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values between early and late mineralizing enamel. The earliest mineralizing part of the M1 displays a  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value lower by  $-0.82\text{‰}$  for JVJ and by  $-0.47\text{‰}$  for ISO M1 compared to the last mineralizing part of the M1. The DP4 enamel of JVJ displays a  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of  $-1.94 \pm 0.06\text{‰}$  (2 s.d.,  $n = 3$ ), undistinguishable from that of the earliest mineralizing part of its M1 ( $-2.03 \pm 0.08\text{‰}$ , 2 s.d.,  $n^* = 2$ ). Fluctuations of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values during the adult

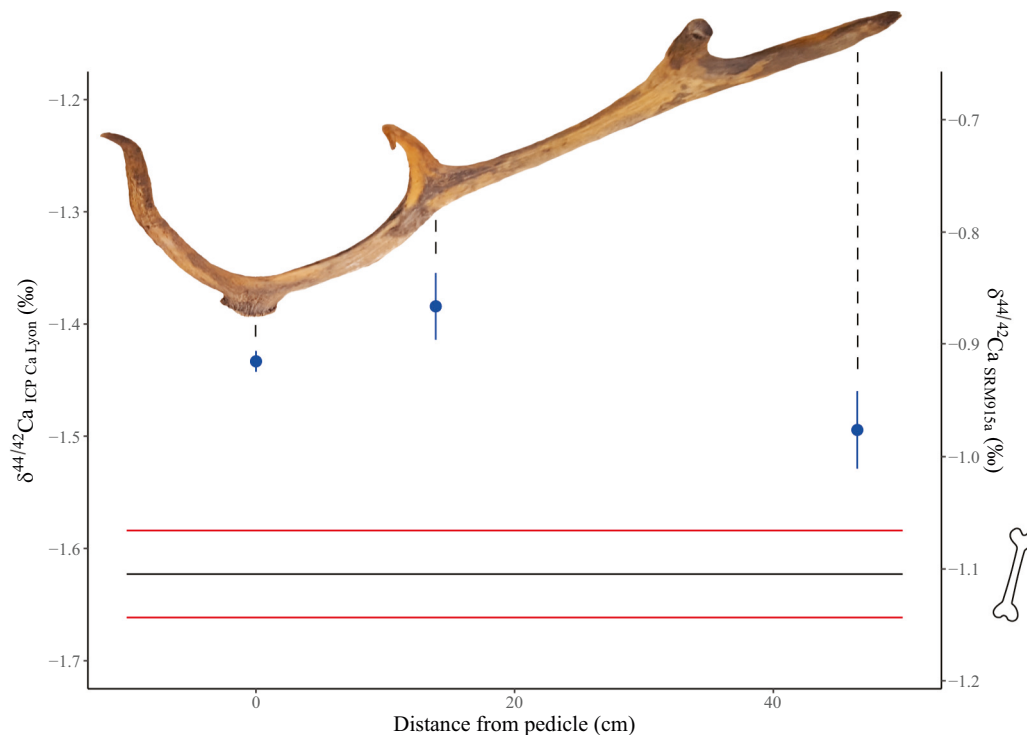


**Fig. 2.** Sex and body mass control over bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values. Bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of adult red deer specimens ( $\geq$  three years old) from Bauges NRP plotted in function of their total body mass. The average double standard error of these measures (Mean 2SE in the graph) is represented at the bottom right of the graph. The two vertical dotted lines mark the limits of body mass (65 and 105 kg) expected from females which supposedly gave birth and lactate during the last birth season preceding their death. Red deer silhouettes are modified from pictures of the public domain accessible in the following website: [www.phylopic.org](http://www.phylopic.org). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 3.** Sex and age control over bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values. Bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of red deer from Bauges NRP grouped by sex and age categories. Adult red deer ( $\geq$  three years old) are represented by dots and sub-adults (two years old) by triangles. Boxplots are plotted from adult male and lactating female data. The degree of significance of the difference between these two groups is represented with stars (\*), with two stars indicating a Wilcoxon rank-sum test:  $p$ -value  $< 0.01$ . The average double standard error of these measures (Mean 2SE in the graph) is represented at the bottom right of the graph. Red deer silhouettes are modified from pictures of the public domain accessible in the following website: [www.phylopic.org](http://www.phylopic.org). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)





**Fig. 4.** Antler Ca isotopic composition. Intra-individual variability of mandible and antler bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values from the SPB specimen. In this graph antler micro-samples are plotted in function of their original position from the sampled antler displayed in photo. Blue error bars represent the 2 s.e. intervals of each sample. The horizontal black and red lines represent respectively the mean mandible bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of the specimen and the limits of its confidence interval ( $\pm 2$  s.e.). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

life of reindeer are also observed within the M3 and the P4 of the AJ specimen. The mean  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value measured on these two teeth is  $-1.56 \pm 0.19\text{‰}$  (2 s.d.,  $n = 3$  for each tooth) with a total range of  $0.22\text{‰}$ . The complete  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  dataset of the specimens from Jaurens is reported in Table S2.

All three DP4 teeth display a pattern of low  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values, relatively stable from the apex to the neck ( $\Delta_{\text{max-min}} = 0.11\text{‰}$ ; intra-teeth 2 s.d. =  $0.11\text{‰}$ ,  $n = 7$ ). The M1 teeth display a different pattern, with AB, JVJ and ISO M1 specimens exhibiting a high amplitude change from low to high  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values from the apex to the neck ( $\Delta_{\text{max-min}} = 0.50\text{‰}$ ; intra-teeth 2 s.d. =  $0.35\text{‰}$ ,  $n = 3$ ). The M1 of JVB displays more stable low  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values ( $\Delta_{\text{max-min}} = 0.17\text{‰}$ ; intra-teeth 2 s.d. =  $0.12\text{‰}$ ,  $n = 7$ ), whereas the M1 of AJ displays stable  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values close to its M2 and M3  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values ( $\Delta_{\text{max-min}} = 0.11\text{‰}$ ; intra-teeth 2 s.d. =  $0.12\text{‰}$ ,  $n = 3$ ).

## 4. Discussion

### 4.1. Comparability of bone and enamel Ca isotope composition

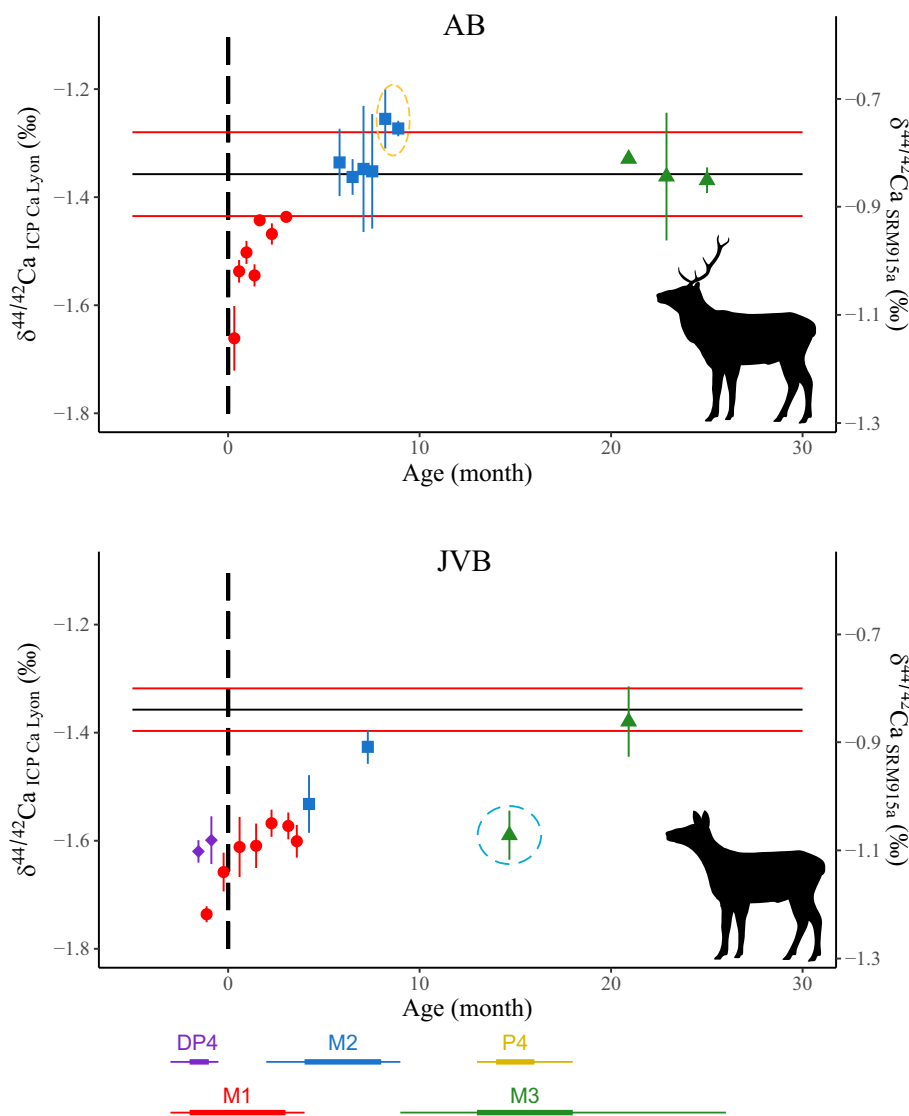
We observe some offsets in  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  bone and enamel values in the M2 and M3 teeth of AB and JVB specimens (Fig. 5), but these offsets tend to be rarer after 5–6 months. The fact that the late mineralizing enamel of the M2 and M3 of red deer specimens AB and JVB display a  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value predominantly identical to their bones (Fig. 5), suggests that a similar Ca isotope fractionation occurs during bone and enamel mineralization (i.e.  $\alpha_{\text{blood-bone}} \approx \alpha_{\text{blood-enamel}}$  and  $\alpha_{\text{diet-bone}} \approx \alpha_{\text{diet-enamel}}$ ), despite that different cellular processes are involved. A similar suggestion arises from human populations who exhibit M3 teeth with a  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{diet-enamel}}$  value similar to the general mammal  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{diet-bone}}$  (Tacaïl et al., 2017), which suggests that this could be a general feature among mammals or even vertebrates. These data consequently support that a  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{bone-enamel}}$  offset, when observed (Heuser et al., 2011; Tacaïl et al., 2014; Martin et al., 2015, 2017a), is more likely caused by diagenetic alteration (for fossil tissues), or by the different mineralization timings of enamel and bone. Indeed, in contexts of variable body Ca isotope composition (e.g. forced by seasonal dietary variations), these

different mineralization timings generate different bone and enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values, with bone sections averaging years of body Ca isotope compositions and enamel micro-samples reflecting week to month periods (see supplementary material T1 for further discussion of the length of these mineralization periods).

### 4.2. Physiological control on $\delta^{44/42}\text{Ca}$ values in adult tissues

#### 4.2.1. Gestation effects

In the red deer population from Bauges NRP, adult females who recently gave birth (referred as lactating hinds) display a mean bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of  $+0.17 \pm 0.12\text{‰}$  (95% confidence interval) higher than adult males (Fig. 3). This is similar to what was previously reported for domestic sheep (Reynard et al., 2010), in which females ( $n = 8$ ) displayed a bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value significantly higher of  $+0.14 \pm 0.08\text{‰}$  (95% confidence interval) compared to males ( $n = 16$ ). The two factors pointed to be the cause of this sexual driven difference in sheep were the accretion of bone during gestation and the excretion of milk (Reynard et al., 2010), as only these two Ca fluxes were thought to be associated with Ca isotope fractionation at this time. However, the very low enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values we record in cervid teeth mineralizing in utero (DP4, early M1, Figs. 5 and 6) suggests that during gestation a mother will preferentially transfer light Ca isotopes through placental Ca transfer. This is also suggested by data from pig umbilical blood (Hassler et al., 2021) and human deciduous teeth (Tacaïl et al., 2017, 2019), although other data point out that it could be representative of the last stage of gestation only (Li et al., 2020). Such trapping of isotopically light Ca by the fetus would have comparatively enriched mother tissues in heavy Ca isotopes (including mineralizing bone or enamel). The most simplistic box model of gestation (a 2 box model with a  $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{fawn-hind}}$  of  $-0.25\text{‰}$  and a hind giving 10% of her Ca to her fawn) gives a  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  shift of  $+0.02$  to  $+0.03\text{‰}$  for the hind, but it has to be noted that this model is very simplistic and amplifies the shift compared to reality (notably by neglecting Ca transfers from the fetus to the hind and the Ca intake of the hind). Among other changes, gestation also triggers higher Ca urinary excretions (Giesemann et al., 1998; Kovacs and Fuleihan, 2006; Reynard et al., 2010), a Ca flux which contributes to lower blood



**Fig. 5.** Enamel and bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  variability of modern red deer.

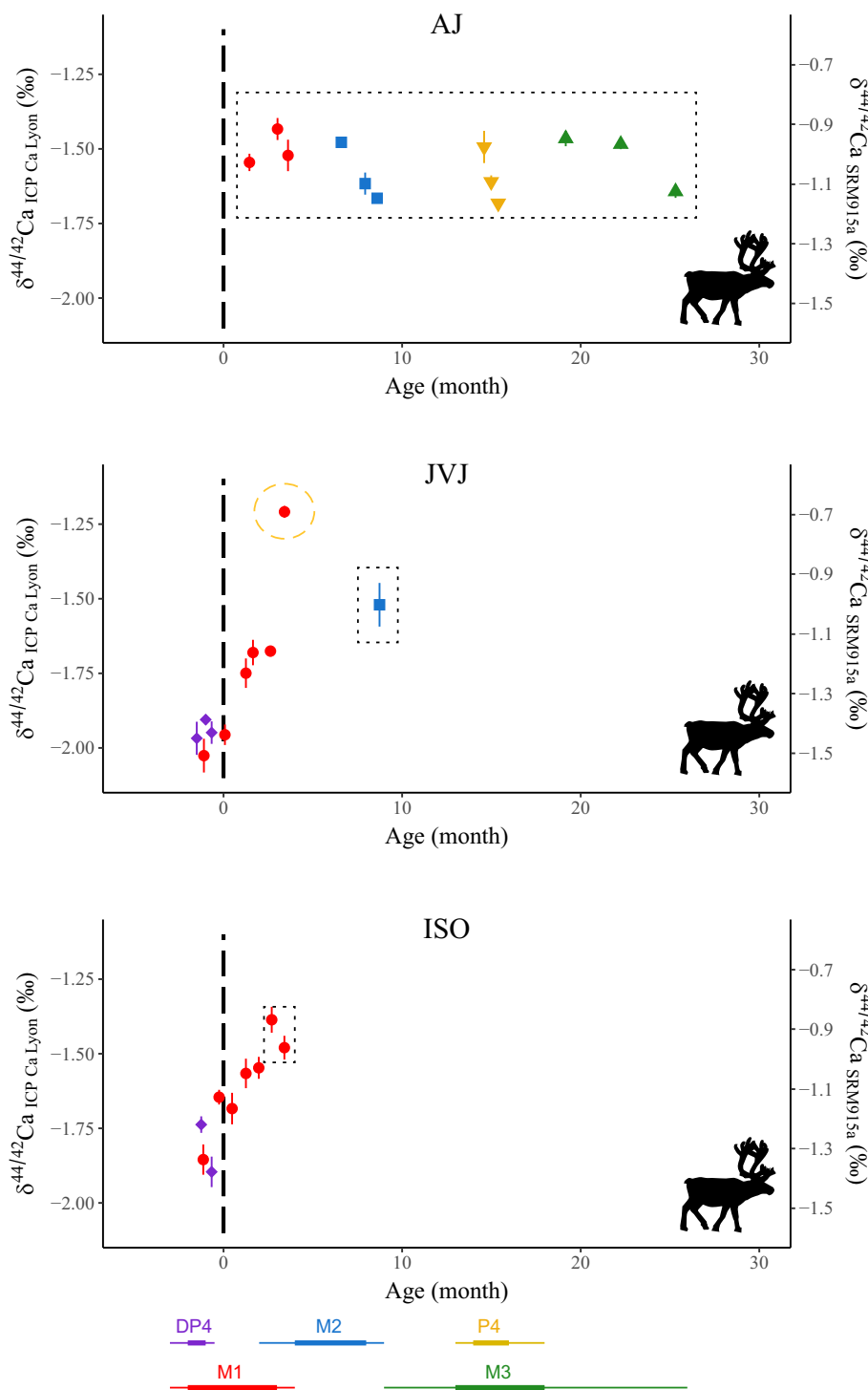
The  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values from bone and enamel micro-samples of AB and JVB specimens (modern red deer, Bauges NRP). The horizontal black and red lines represent respectively the mean bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of each specimen and the limits of their confidence interval ( $\pm 2$  s.e.). Micro-samples from DP4, M1, M2 and M3 teeth are respectively represented by purple diamonds, red points, blue squares and green triangles. Dashed orange and cyan ellipses respectively emphasize periods during which mineral licking and osteophagia events are suspected. Error bars represent the 2 s.e. intervals for each sample. The age model used for temporally anchor enamel micro-samples is described in Section 2.4 and is extrapolated from Brown and Chapman (1991a), with the only exception of enamel mineralizing in utero for which ages are arbitrary. Teeth mineralization timings which served this model are displayed at the bottom of the graph. Note that despite our micro-sampling procedure time averaging likely affects each of these enamel micro-samples (see supplementary material T1). Red deer silhouettes are modified from pictures of the public domain accessible in the following website: [www.phylopic.org](http://www.phylopic.org). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

$\delta^{44/42}\text{Ca}$  values by preferentially exporting heavy Ca isotopes in urines (Skulan et al., 2007; Heuser and Eisenhauer, 2010; Morgan et al., 2012; Tacail et al., 2014; Channon et al., 2015; Heuser et al., 2016, 2019; Tacail, 2017; Eisenhauer et al., 2019). Thus, the consequences of gestation have opposite influences on blood Ca isotope composition, and therefore limit the record of a gestation signal in bone and enamel. Moreover, the recent questioning about the  $\alpha_{\text{blood-bone}}$  amplitude (Tacail, 2017; Tacail et al., 2020; Hassler et al., 2021) also questions the base of the bone accretion effect. Further investigations are necessary on this topic but at the moment these sparse data suggest that differences of bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values between male and female red deer (this study) and sheep (Reynard et al., 2010) have another origin than gestation. Following the same logic, it seems unlikely that gestation effects can significantly disrupt the trophic clustering of adult bone and enamel Ca isotope compositions.

#### 4.2.2. Lactation effects

The amount of Ca provided by the hind to its fawn during the 3 to 8 months of nursing is huge, as a fawn grows to about the half of the hind body mass between its birth and weaning (Table 1; Table S1; Mitchell et al., 1976; Jones et al., 2009). Comparatively, a juvenile red deer usually weighs about 8 kg at birth (Mitchell et al., 1976; Jones et al., 2009) which represents about 8.6% of the mean body mass of adult

hinds from our dataset (Table S1) and consequently implies far less Ca transfers from the hind to the fawn than lactation does. As milk is very depleted in heavy Ca isotopes ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{milk-diet}} = -0.6\text{‰}$ ; Chu et al., 2006; Gussone and Heuser, 2016; Heuser, 2016; Tacail, 2017; Hassler et al., 2021), its excretion can lead to enrich lactating females in heavy Ca isotopes (Reynard et al., 2010; Hassler et al., 2021). Along with important Ca excretion through milk, lactating mammals are subject to higher Ca absorption in the digestive tract, to bone loss and to changes in Ca urinary excretion (Ramberg Jr et al., 1970; Cross et al., 1995; Giesemann et al., 1998; Karlsson et al., 2001; Wysolmerski, 2002; Vanhouten and Wysolmerski, 2003; Kovacs and Fuleihan, 2006; Tacail, 2017). However, such changes in Ca fluxes only secondarily affect the lactation signal, as these changes stay minimal compared to the order of magnitude of milk Ca excretion (Hassler et al., 2021). The lactation should therefore be characterized by higher body  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values in hinds, including within their bones if the nursing lasts for several months (supplementary material T1). In this context, the high bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values reported in lactating hinds (Figs. 2 and 3) seems very compatible with the manifestation of a lactation effect, similarly to what is observed for domestic sheep (Reynard et al., 2010). The important residence time of Ca in bones certainly heavily damps this lactation signal (see supplementary material T1 and Hassler et al., 2021), although the extensive bone remodeling and bone losses usually



**Fig. 6.** Enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  variability of fossil reindeer. The  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values from bone and enamel micro-samples of AJ, JVJ, ISO M1 and ISO DP4 specimens (fossil reindeer). Note that ISO M1 and ISO DP4 are two distinct specimens that have been merged in one graph only for visual convenience. Micro-samples from DP4, M1, M2, M3 and P4 teeth are respectively represented by purple diamonds, red points, blue squares, green triangles and inverted yellow triangles. The dashed orange ellipse emphasizes a period during which mineral licking events are suspected. Dotted boxes contain points identified as providing accurate trophic information (see Section 4.3). Error bars represent the 2 s.e. intervals of each sample. The age model used for temporally anchor enamel micro-samples is described in Section 2.4 and is extrapolated from Brown and Chapman, 1991a, with the only exception of enamel mineralizing in utero for which ages are arbitrary. Teeth mineralization timings which served this model are displayed at the bottom of the graph. Note that despite our micro-sampling procedure time averaging likely affects each of these enamel micro-samples (see supplementary material T1). Reindeer silhouettes are pictures from the public domain accessible in the following website: [www.phylopic.org](http://www.phylopic.org). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

recorded during lactation decreases this residence time and improves the potential of the signal to be recorded (Giesemann et al., 1998; Vanhouten and Wysolmerski, 2003; Kovacs and Fuleihan, 2006; Hassler et al., 2021). Looking at subadult hinds for such a signal is more difficult, as their reproductive success is much more variable and lower than in females of three years and more.. However, higher body mass also suggests higher chance that they gave birth to a fawn during the last birth season (Mitchell et al., 1976; Clutton-Brock et al., 1982; Albon et al., 1986; Pellerin et al., 2014). Thus, the fact that bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of subadult females overlap with both lactating and yield adult hinds suggest that this group includes both nulliparous and primiparous

females (Fig. 3). This is also consistent with the fact that the heaviest subadult female displays the highest  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values, suggesting that this specimen gave birth to a fawn during the last birth season.

Interestingly, the female with the highest body mass in our dataset displays lower bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values despite having an age and body mass suggesting lactating periods in previous birth seasons, as high body mass mean higher reproduction chances (Albon et al., 1986; Pellerin et al., 2014). This suggests that skeletal Ca turnover is intense enough to conceal lactation signals from one year to another in this species, at least within the cortical part of the dentary bone (the bone part analyzed in this study). We lack precise data about bone remodeling rate for red deer

**Table 1**  
Body mass data of red deer from Bauges NRP (in kg).

Sex	Age	Mean	sd	n	min	max
F	A	98.05	12.82	447	81.58	114.52
F	J	52.00	8.75	223	40.73	63.27
F	SA	77.21	9.30	102	65.15	89.27
M	A	150.71	27.90	457	114.87	186.56
M	J	56.40	8.70	218	45.20	67.60
M	SA	96.05	13.66	187	78.44	113.66

Note. This table shows the total body mass data [kg] recorded on 1634 specimens of red deer from Bauges NRP. Age classes referred as adult (A), subadult (SA) and juvenile (J).

dentary bone. However, this fast Ca turnover seems odd considering that the total skeleton would need about 9 years to remove 75% of a lactation signal (see box model described in supplementary material T1 and Fig. S1). The post-lactation bone accretion and the relatively small male/female  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  difference observed so far might help to achieve a quicker concealing of the lactation signal, but further studies are necessary to confirm this dynamic as only one individual suggests this tendency in our dataset. If bone Ca isotope composition proves to be that dynamic, the time interval between last lactation and death, as well as the time interval between consecutive lactations might be critical to preserve a lactation signal within bone Ca isotope composition. Nevertheless, the amount of produced milk, the duration of lactation periods and the size of the skeleton Ca reservoir also likely modulate this sex-driven Ca isotopic difference among mammal species (Hassler et al., 2021). Those factors are probably a key to explain why human populations studied by Reynard et al. (2010, 2013) display non-significant isotopic clustering between sexes, along with the diversity of possible food sources which characterize humans. Such lactation signal is in theory less dampened in enamel than in bones (see supplementary material T1). However, looking for these signals in adult teeth of red deer females seems challenging, as the enamel of the last tooth to mineralize (i.e. the M3) has generally completed its mineralization around 26 months (Brown and Chapman, 1991b), while all females of two-year-old have not yet achieved their first reproduction. We cannot be certain of that concerning the reindeer population of Jaurens. However, our data suggest that any record of a lactation signal within their enamel would result in higher enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values, whereas these reindeers exhibit suspiciously low  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values. We thus conclude that lactation effects on body Ca isotope composition have to be considered when studying mammal populations but cannot be invoked to explain anomalously low bone or enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values.

#### 4.2.3. Antlerogenesis effects and antler records

We report the first comparison between Ca isotope compositions of antlers and the rest of the skeleton (Fig. 4). This pilot investigation highlights that antlers display  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values significantly higher than the rest of the skeleton. As for enamel and bones, the key is to assess whether this difference is the result from differences in Ca isotope fractionation coefficients at mineralization or the result of a different mineralization timing. These data call for further studies, as comparing antlers with bone and enamel could add an additional dimension for studying cervid life history traits using Ca isotopes, allowing to further investigate diet seasonality for example.

With the only data presented in Fig. 4, it seems that antlers could preferentially trap heavy Ca isotopes from blood, although physiological processes generally favor light Ca isotopes (Tacaïl, 2017). If further confirmed, this would indicate that antlerogenesis could lower body Ca isotope composition. Indeed, antlers act primarily as a Ca sink working similarly as lactation and gestation by isolating Ca from the rest of the body, although antlers are also subject to bone remodeling (Bélanger et al., 1967; Muir et al., 1987a; Rolf and Enderle, 1999). However, the fact that lactation proved to have a relatively tenuous influence on bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values, despite involving far bigger Ca fluxes and Ca isotope

fractionation coefficients than antlerogenesis (Mitchell et al., 1976; Muir et al., 1987a, 1987b; Harris et al., 2002; Thomas and Barry, 2005; Li, 2013), suggests that antlerogenesis will not be detectable within the skeleton Ca isotope composition. This is supported by the complete overlap we observe between male red deer, yeld and immature hinds bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values (Fig. 3). An overlap which occurs despite the fact that studied specimens have been slaughtered just when the antlers of males finished their growth (Mitchell et al., 1976), so just when antlerogenesis could had a strong influence on skeleton Ca isotope composition. Although further tests are necessary to prove that enamel stays unaffected too, the end of enamel mineralization occurs before large antlers can grow (Kruuk et al., 2002; Thomas and Barry, 2005) which suggests that enamel will stay largely unaffected by antlerogenesis. In conclusion, none of our data suggests that antlerogenesis could be an important driver of body Ca isotope compositions, or could cause a significant mismatch of Ca isotope compositions and trophic data.

#### 4.3. Nutrition control over bone and enamel $\delta^{44/42}\text{Ca}$ values in modern and fossil cervids

##### 4.3.1. Neonatal life history traits

We discussed how gestation, lactation and antlerogenesis could affect adult bone and enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values, and neither of these phenomena can convincingly explain the low  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values found in reindeer populations (Martin et al., 2017a). However, gestation and lactation not only affect adult Ca isotope composition, they also control juvenile Ca intakes and the Ca isotope composition of their tissues. For the five studied cervids with a preserved DP4 or unworn M1 (AB, JVB, JVJ, ISO M1, ISO DP4), enamel mineralizing in utero systematically exhibits the lowest  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values recorded (Figs. 5, 6). DP4 teeth exhibit stable and low  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values relative to third molars (M3) and adult bones, whereas M1 teeth exhibit various rates of transition from early ontogenetic low  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values to late ontogenetic high  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values. A similar pattern of Ca isotope composition has been previously described in human deciduous teeth, in which a clear link between weaning practices and  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values has been described (Tacaïl et al., 2017). We thus propose that the transition from low  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values in DP4 and in the apex of M1, to high  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values in the neck of the M1, in the M2, M3 and adult bones is characteristic of the transition from maternal Ca transfer (during the gestation then the nursing) to post-weaning Ca intake (adult-like diet). The mineralization timing and enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of red deer and reindeer are consistent with the 3–8 months of weaning age of these species (Miller, 1972; Mitchell et al., 1976; Brown and Chapman, 1991b; Jones et al., 2009). The specimens AB, JVB and ISO M1 all reached the adult Ca isotope composition at the neck of the M1. This suggests that they were weaned before four months considering the length of enamel mineralization (Figs. 5, 6 and supplementary material T1). Data from AJ (Fig. 6) also suggest a relatively early weaning, although the wear of the M1 limits the record of pre-weaning conditions. The JVB specimen constitutes an exception to this early transition in  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values in the M1. For this individual, the increase of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values within the M1 seems flattened (see Fig. 5;  $\Delta_{\text{max-min}} = 0.17\%$ ; intra-tooth 2 s.d. = 0.12‰, n = 7), and enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values only approach bone-like values within the M2 and M3 late mineralizing sections. This suggests a later weaning for this individual (around 8 months), or alternatively an earlier tooth mineralization. The fact that these weaning ages seem consistent with the observations of these species in the wild, supports that Ca isotopes are accurate for detecting in utero, milk feeding and weaning periods among mammals. These data also highlight that some individuals (like JVB) could display a delayed dietary transition to a purely adult diet (i.e. without milk), in a way that the transition is not yet complete when M2 teeth mineralize. This supports that milk consumption could have affected the previously published data of cervids from Jaurens (Martin et al., 2017a) and caused their suspiciously low enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values. For these cervid species,



we consequently advise to favor M3 enamel sampling to infer purely adult trophic information (when accessible). Note that in M3, enamel can then display higher  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values in case of an early breeding and subsequent lactation (see 4.2.2 section). When possible, we thus advise to analyze enamel zones which mineralized after weaning and prior to female sexual maturity. As the position of these zones are difficult to predict, especially for fossil species, we advise to use serial micro-sampling in order to identify early post-weaning periods. This approach provides useful complementary information for ecological and physiological inferences and minimizes the potential of lactating females and nursing to affect trophic inferences based on  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  data.

#### 4.3.2. Osteophagia and mineral licks

Osteophagia (i.e. bone consumption) and the consumption of natural mineral licks are two common sources of mineral supplementation that cervids, and more generally artiodactyls, use during periods of high mineral requirement (e.g. lactation, juvenile growth, antlerogenesis), notably to cope with phosphorus (P) or other element deficiency (Cowan and Brink, 1949; Kjos-Hanssen, 1973; Krausman and Bissonette, 1977; Marie, 1982; Grasman and Hellgren, 1993; Cáceres et al., 2011; Gambín et al., 2017). There is yet no direct measure of mineral supplementation effects on enamel Ca isotope composition in the literature. However, we can confidently assume that, because bones are generally  $^{44}\text{Ca}$ -depleted compared to plant products (Gussone and Heuser, 2016), antler or other bone consumption will result in lower dietary  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values (Gussone and Heuser, 2016; Martin et al., 2017a, 2018). We can roughly estimate that this change of dietary  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value will be of 0 to  $-2\text{‰}$ , depending on the amount of consumed bones and their Ca isotope compositions (Heuser et al., 2011; Gussone and Heuser, 2016). Foraging on mineral licks would have the opposite effect on dietary  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value (about 0 to  $+1\text{‰}$ ), because soils and rocks are generally  $^{44}\text{Ca}$ -enriched compared to plant products (Gussone and Heuser, 2016). These modifications of the dietary Ca isotope composition logically affect the  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of growing enamel, with an intensity that will depend upon the rate of enamel growth and the duration of the mineral supplementation.

The resort to mineral supplementation by red deer from Bauges NRP has not been quantified. However, we know from a red deer population from Spain that about two hundred individuals can consume about 966 g of antlers over 7 months, mainly during lactation, weaning and antlerogenesis periods (Estevez et al., 2008; Gambín et al., 2017). If we consider that antlers contained a maximum of 15% of Ca (Table S4), this would represent about 0.7 g of Ca intake per individual. Considering that mineral supplementations were enhanced by the low P availability in the plants of the study site in Spain (Estévez et al., 2009; Gambín et al., 2017), we can expect a lower to similar intensity of mineral supplementations within the Bauges NRP red deer population. Such Ca intakes seem negligible over a year compared to plant and water sources, which suggests that mineral supplementations likely have a negligible influence on bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values. However, few individuals may have been responsible for most of this bone consumption (individuals were not identified in Gambín et al. (2017)), and cervids from this study likely had access to other bones and mineral sources than monitored antler stacks (Gambín et al., 2017). Therefore, it seems plausible to expect at least short excursions in enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values (negative for osteophagia, positive for mineral licking) for individuals experiencing periods of important supplementation (i.e. lactation, weaning, antlerogenesis). Following this postulate, we suspect that the outlier  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value in the M3 of the JVB specimen has been influenced by osteophagia. This data point is characterized by an isolated low  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value, localized far after weaning in enamel formed around 15 months of age (Fig. 5), a period which could match the peak of supplementation reported in September by Gambín et al. (2017). Finally, we note that the two latest M2  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of AB (at 10 months) seem slightly higher than the average M2, M3 and bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of this specimen (Fig. 5). It is possible that this results from Ca intakes influenced by

mineral licking, but the isotopic difference is tenuous, possibly artefactual, and does not match with the common periods of mineral supplementation recorded in Spain (Gambín et al., 2017).

Reindeer are also known to seasonally resort to mineral supplementation, likely to compensate for the low P, Ca and sodium content of the plants and lichens they consume (Grasman and Hellgren, 1993). Frequent antler chewing are reported in spring during the calving season (Kjos-Hanssen, 1973; Marie, 1982), as well as mineral licks, notably in the summer (Cowan and Brink, 1949). We have no data to quantify these supplementations, but it seems reasonable to suspect they can influence enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values. A possible example is found within the M1 tooth of the JVJ specimen at 5 months (Fig. 6). This enamel zone constitutes the terminal part of the weaning transition, and is characterized by a higher  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value than within the M2 of the specimen (or of any other enamel sample from Jaurens specimens). Because this critical period favors mineral supplementations in cervids (see previous paragraph), we suspect that this positive  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  excursion is the result of mineral licking, although the very limited post-weaning JVJ dataset provides limited evidence for this.

If the effects of mineral supplementation on body Ca isotope composition are further confirmed, this proxy could be used to study this crucial survival behavior among modern and fossil mammals. As such, mineral supplementations however complicate the relation between trophic level and enamel Ca isotope composition. Thus, we emphasize the importance of considering mineral supplementation behaviors when using  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  data for trophic interpretations. We notably suggest a specific attention toward this behavior for the study of artiodactyls from arid or tropical environments, because these environments are generally marked by a low P availability in plants, a trigger for mineral supplementations (Grasman and Hellgren, 1993).

#### 4.3.3. Plant Ca isotopic variability

Identifying and excluding enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  data affected by pre-weaning, lactation and short term mineral supplementation periods allow, with some limits (see previous section), to identify Ca isotope data that are representative of trophic level. However, the important variability of plant Ca isotope compositions can also limit the trophic clustering of enamel and bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  data, by generating isotopic variability among herbivores (Martin et al., 2018). Plant Ca isotope compositions combine a variability between plant organs and between plant taxa (Holmden and Bélanger, 2010; Gussone and Heuser, 2016; Schmitt, 2016; Moynier and Fujii, 2017; Martin et al., 2018; Griffith et al., 2020). The mean offset of  $-0.31 \pm 0.14\text{‰}$  observed between the leaves of dicotyledons and monocotyledons (e.g. grasses) is notably suspected to cause the documented difference of  $-0.18 \pm 0.10\text{‰}$  between the enamel of browser herbivores (i.e. with a leaf-dominated diet) and of grazer herbivores (i.e. with a grass-dominated diet) (Martin et al., 2018). Red deer is described as a mixed feeder, changing seasonally or regionally between more browser to more grazer diets (Hearney and Jennings, 1983; Gebert and Verheyden-Tixier, 2001; Storms et al., 2008; Berlioz et al., 2019). In the Bauges NRP, the grass proportion in the red deer diet has been estimated to change between 20% and 40% from summer to winter (Redjadj et al., 2014), and could be lower during late winter, spring and early summer according to the tendencies observed at the limits of monitored periods (Redjadj et al., 2014). Changing diet proportions from 40% grass and 60% leaves to 10% grass and 90% leaves would change the diet  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value by about  $0.09\text{‰}$ , a result which is relatively close to the post-weaning range of  $0.11\text{‰}$  observed in the enamel record of the AB specimen (the red deer specimen with the most extensive post-weaning enamel record, Fig. 5). Our isotopic data are thus compatible, at the first order, with the known diet variability of this cervid population, although this estimation of  $0.09\text{‰}$  is built upon coarse approximations (notably that consumed grass  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value was exactly  $-0.31\text{‰}$  lower than non-grass food  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value) and needs further investigations. A higher resolution regarding the post-weaning enamel record, and a better constrain of the Ca isotope composition of

food items available at Bauges NRP (especially evergreen trees which are an important food source for these red deer, Redjadj et al. (2014)) would provide  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  data that will be more comparable with  $\delta^{13}\text{C}$  records, dental micro-wear and stomach content data collected so far for this red deer population (Redjadj et al., 2014; Merceron et al., 2021). Such further studies could notably help resolving some discrepancies between dental micro-wear and stomach content estimations (i.e. higher versus lower grass content in the diet, Merceron et al. (2021)), and provide independent complementary information regarding  $\delta^{13}\text{C}$  data (e.g. diet and ecological niche).

Reindeers are also mixed-feeders, but consume lichen during winter and have a generally more browser diet compared to red deer (Hofmann, 1989; Mathiesen et al., 2000), an observation which is notably consistent with the higher  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of reindeers compared to red deers when both co-exist within the same environment (Dodat et al., 2021). After weaning, the AJ specimen (the reindeer with the most extensive post-weaning enamel record) exhibits a  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  range of 0.25‰ (Fig. 6). As for red deer, this isotopic variability is compatible, at the first order, with the consequences expected from changing proportions of grass and other plant items in the diet. Within this browser to grazer-like diet continuum, the lowest enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values would correspond to more grazer-like diet periods, whereas periods with the highest enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values would correspond to more browser-like diet periods. A limit to this hypothesis is the potential occurrence of mineral supplementations which can modify the dietary Ca isotope composition independently of the plants (see Section 4.3.3). In this regard, combining  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  data and  $\delta^{13}\text{C}$  data within a multi-proxy approach (e.g. Martin et al., 2018) would be a solid option to further investigate diet and mineral supplementation seasonality among these cervids.

#### 4.3.4. Trophic position of Pleistocene fossil cervids

The previous discussion sections detail how to identify tooth and enamel parts that should be favored for trophic inter-specific comparisons (by identifying pre- and post-weaning periods, by detecting sections potentially disrupted by short term mineral supplementation, and by providing insight about intra-tooth  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  variability). We applied this technique on three subadult to adult reindeers from the Late Pleistocene locality of Jaurens (AJ, JVJ and ISO M1). The most suited enamel data points for trophic inter-specific comparisons are indicated in Fig. 6. Unfortunately, we do not have access to an extensive M2 and M3 dataset for JVJ and ISO M1 specimens (Fig. 6). Therefore, we lack insight to determine if the enamel data points we selected for trophic inter-specific comparisons are entirely posterior to the weaning transition. Nevertheless, the selected data points of these specimens consistently range within the enamel Ca isotope compositions of AJ, which supports that they are representative of a post-weaning diet. Altogether, the weighted average (per specimen) of selected enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values is +0.18‰ higher than previously published measures (Martin et al., 2017a). They consequently plot within the range of woolly rhinoceroses (*Coelodonta antiquitatis*,  $n = 3$ ) (Wilcoxon rank-sum test,  $p$ -value = 0.1) and steppe bisons (*Bison priscus*,  $n = 3$ ; Wilcoxon rank-sum test,  $p$ -value = 0.2) published by Martin et al. (2017a). This demonstrates that dismissing the data obtained from enamel affected by short term mineral supplementation or milk consumption, based on a serial micro-sampling approach, efficiently resolve the anomaly of  $^{44}\text{Ca}$  depletion previously reported in the enamel of reindeers from Jaurens. Serial micro-sampling is time and resource consuming and thus can hardly be used at the scale of a whole faunal assemblage, but this study proves that this technique is particularly suited to discuss diet and behavior at the individual scale, or when some  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  data are at odds with independently inferred trophic positions or diet.

## 5. Conclusions

In this paper we discussed the behavioral and physiological events likely to affect mammalian enamel and bone Ca isotope compositions,

with two species of cervids as models (*Cervus elaphus*, *Rangifer tarandus*). Our results highlight that lactation is an effective source of Ca isotope variability as this phenomenon produced  $^{44}\text{Ca}$ -enriched isotope composition in bones of lactating females. Our study, however, failed to identify comparable gestation effects, likely because of long Ca residence time in cervid bones, of partial overprinting by lactation effects, and because gestation involves smaller changes in Ca fluxes compared to lactation or less intense Ca isotope fractionation coefficients associated to these fluxes. Similarly, antlerogenesis did not prove to be a significant driver of body Ca isotope composition in red deer. However, our data highlight that antlers display a different Ca isotopic signature than the rest of the skeleton, encouraging further studies. The Ca isotopic composition of enamel mineralizing in utero suggests that Ca transferred from the cervid mother to the fetus during gestation has a similar isotope composition than milk, at least during the closest period prior the birth. The transition from pre-parturition and pre-weaning Ca intakes to adult diet is clearly observed within the enamel of most of the studied individuals. Calcium isotopes can then be efficiently used for assessing weaning ages, providing the fact that no osteophagia is involved early in life, as this phenomenon is also able to generate low bone and enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values (at the opposite of what is expected from mineral licks foraging). Finally, this study demonstrates that serial micro-sampling of enamel is an appropriate method to disentangle part of ecological, physiological and environmental Ca isotope signals. This method allowed to accurately extract trophic information from the enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of the reindeers from the Pleistocene deposit of Jaurens. When possible, we thus encourage the use of this method in order to accurately retrieve diet and trophic signals from enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  data. Such an approach would greatly benefit to paleoecology fields, as it makes Ca isotope data more readily comparable with other diet proxy such as carbon and nitrogen isotopes. Further studies are needed to investigate other cases of discrepancy between  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  data and trophic level, as well as to assess the variability of lactation, gestation and mineral supplementation signals among mammals. However, these results open great perspectives for the study of mammal physiology in addition to clarify the trophic inferences achievable with Ca isotopes.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2021.110418>.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

This research was supported by the TelluS program of CNRS/INSU (DIUNIS project to JEM) and ENS de Lyon. We thank D. Mollex for his help regarding thin section preparation, D. Berthet for allowing access to the specimen curated in the collections of the Musée des Confluences, Lyon, and E. Robert for allowing access to Jaurens specimens curated in the paleontological collections of the LGL-TPE. We would like to thank the OGFH, the Groupement d'Intérêt Cynégétique des Bauges, the Office National des Forêts, as well as the hunters and professionals from the OFB (ex-ONCFS; T. Chevrier and T. Amblard) who contributed to collect red deer data in Bauges NRP. Finally, we thank the two anonymous reviewers, as well as the editors T. Tütken and T. Algeo for their detailed comments that helped to considerably improve the initial version of this work.

## References

- Albon, S.D., Mitchell, B., Huby, B.J., Brown, D., 1986. Fertility in female Red deer (*Cervus elaphus*): the effects of body composition, age and reproductive status. *J. Zool.* 209, 447–460.

- Azorit, C., Analla, M., Carrasco, R., Calvo, J.A., Muñoz-Cobo, J., 2002. Teeth eruption pattern in red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in southern Spain. *An. Biol.* 24, 107–114.
- Bélangier, L.F., Choquette, L.P.E., Cousineau, J.G., 1967. Osteolysis in reindeer antlers; Sexual and seasonal variations. *Calcif. Tissue Res.* 1, 37–43. <https://doi.org/10.1007/BF02008073>.
- Berlioz, E., Azorit, C., Blondel, C., Ruiz, M.S.T., Merceron, G., 2019. Deer in an arid habitat: dental microwear textures track feeding adaptability. *Hystrix. Ital. J. Mammal.* 28, 222–230. <https://doi.org/10.4404/hystrix>.
- Biewener, A.A., 1990. Biomechanics of mammalian terrestrial locomotion. *Science* 250, 1097–1103. <https://doi.org/10.1126/science.2251499>.
- Blaine, J., Chonchol, M., Levi, M., 2015. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1257–1272. <https://doi.org/10.2215/CJN.09750913>.
- Blumenthal, S.A., Cerling, T.E., Christ, K.L., Bromage, T.G., Kozdon, R., Valley, J.W., 2014. Stable isotope time-series in mammalian teeth: in situ  $\delta^{18}\text{O}$  from the innermost enamel layer. *Geochim. Cosmochim. Acta* 124, 223–236. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2013.09.032>.
- Bonenfant, Christophe, Gaillard, Jean-michel, Klein, François, Loison, Anne, 2002. Sex- and age-dependent effects of population density on life history traits of red deer *Cervus elaphus* in a temperate forest. *Ecography* 25, 446–458.
- Brown, W.A.B., Chapman, N.G., 1991a. The dentition of red deer (*Cervus elaphus*): a scoring scheme to assess age from wear of the permanent molariform teeth. *J. Zool. (Lond.)* 224, 519–536.
- Brown, W.A.B., Chapman, N.G., 1991b. Age assessment of red deer (*Cervus elaphus*): from a scoring scheme based on radiographs of developing permanent molariform teeth. *J. Zool. (Lond.)* 225, 85–97. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1991.tb03803.x>.
- Cáceres, I., Esteban-Nadal, M., Bennásar, M., Fernández-Jalvo, Y., 2011. Was it the deer or the fox? *J. Archaeol. Sci.* 38, 2767–2774. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2011.06.020>.
- Channon, M.B., Gordon, G.W., Morgan, J.L.L., Skulan, J.L., Smith, S.M., Anbar, A.D., 2015. Using natural, stable calcium isotopes of human blood to detect and monitor changes in bone mineral balance. *Bone* 77, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.04.023>.
- Chu, N.C., Hendersson, G.M., Belshaw, N.S., Hedges, R.E.M., 2006. Establishing the potential of Ca isotopes as proxy for consumption of dairy products. *Appl. Geochem.* 21, 1656–1667. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2006.07.003>.
- Clementz, M.T., 2012. New insight from old bones: stable isotope analysis of fossil mammals. *J. Mammal.* 93, 368–380. <https://doi.org/10.1644/11-MAMM-S-179.1>.
- Clementz, M.T., Holden, P., Koch, P.L., 2003. Are calcium isotopes a reliable monitor of trophic level in marine settings? *Int. J. Osteoarchaeol.* 13, 29–36. <https://doi.org/10.1002/oa.657>.
- Clutton-Brock, T.H., Iason, G.R., Albon, S.D., Guinness, F.E., 1982. The effects of lactation on feeding behavior in wild red deer hinds. *J. Zool. (Lond.)* 198, 227–236.
- Cowan, I.M., Brink, V.C., 1949. Natural game licks in the rocky mountain national parks of Canada. *Am. Soc. Mammal.* 30, 379–387.
- Cross, N.A., Hillman, L.S., Allen, S.H., Krause, G.F., Vieira, N.E., 1995. Calcium homeostasis and bone metabolism during pregnancy, lactation, and postweaning: a longitudinal study. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 514–523. <https://doi.org/10.1093/ajcn/61.3.514>.
- Dean, M.C., Spiers, K.M., Jan, G., Le Cabec, A., 2019. Synchrotron X-ray fluorescence mapping of Ca, Sr and Zn at the neonatal line in human deciduous teeth reflects changing perinatal physiology. *Arch. Oral Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.05.024>.
- Dodat, P.-J., Tacail, T., Albalat, E., Gomez-Olivencia, A., Couture-Veschambre, C., Holliday, T., Madelaine, S., Martin, J.E., Rmoutilova, R., Maureille, B., Balter, V., 2021. Isotopic calcium biogeochemistry of MIS 5 fossil vertebrate bones: application to the study of the dietary reconstruction of Regourdou 1 Neandertal fossil. *J. Hum. Evol.* 151, 102925. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2020.102925>.
- Eisenhauer, A., Müller, M., Heuser, A., Kolevica, A., Glüer, C.C., Both, M., Laue, C., Hehn, U.V., Kloth, S., Shroff, R., Schrezenmeir, J., 2019. Calcium isotope ratios in blood and urine: a new biomarker for the diagnosis of osteoporosis. *Bone Rep.* 10, 100200. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2019.100200>.
- Estevez, J.A., Landete-Castillejos, T., García, A.J., Ceacero, F., Gallego, L., 2008. Population management and bone structural effects in composition and radiopacity of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) antlers. *Eur. J. Wildl. Res.* 54, 215–223. <https://doi.org/10.1007/s10344-007-0132-0>.
- Estévez, J.A., Ceacero, F., Martínez, A., García, A.J., Landete-Castillejos, T., Gaspar-López, E., López-Parra, J.E., Olgún-Hernández, C.A., Calatayud, A., Gallego, L., 2009. Variación estacional en la composición mineral de plantas y su aplicación a la gestión del ciervo ibérico. In: XXXIV Congreso Nacional de La Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC): Barbastro. Huesca, pp. 596–601.
- Ewbank, J.M., Phillipson, D.W., Whitehouse, R.D., Higgs, E.S., 1964. Sheep in the Iron Age: a method of study. *Proc. Prehist. Soc.* 30, 423–426. <https://doi.org/10.1017/S0079497X0001519X>.
- Fricke, H.C., Clyde, W.C., James, R.O., 1998. Intra-tooth variations in  $\delta^{18}\text{O}$  ( $\text{PO}_4$ ) of mammalian tooth enamel as a record of seasonal variations in continental climate variables. *Geochim. Cosmochim. Acta* 62, 1839–1850.
- Gaillard, J.-M., Festa-Bianchet, M., Yoccoz, N.G., Loison, A., Toigo, C., 2000. Temporal Variation in Fitness Components and Population Dynamics of Large Herbivores. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31, 367–393.
- Gallego, L., Landete-Castillejos, T., García, A., Sanchez, P.J., 2006. Seasonal and lactational changes in mineral composition of milk from Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *J. Dairy Sci.* 89, 589–595. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72122-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72122-1).
- Gambín, P., Ceacero, F., García, A.J., Landete-Castillejos, T., Gallego, L., 2017. Patterns of antler consumption reveal osteophagia as a natural mineral resource in key periods for red deer (*Cervus elaphus*). *Eur. J. Wildl. Res.* 63, 3–39. <https://doi.org/10.1007/s10344-017-1095-4>.
- Gebert, C., Verheyden-Tixier, H., 2001. Variations of diet composition of Red Deer (*Cervus elaphus* L.) in Europe. *Mammal Rev.* 31, 189–201. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2907.2001.00090.x>.
- Giesemann, M.A., Lewis, A.J., Miller, P.S., Akhter, M.P., 1998. Effects of the reproductive cycle and age on calcium and phosphorus metabolism and bone integrity of sows. *J. Anim. Sci.* 76, 796–807. <https://doi.org/10.2527/1998.763796x>.
- Grasman, B.T., Hellgren, E.C., 1993. Phosphorus nutrition in white-tailed deer: nutrient balance, physiological responses, and antler growth. *Ecology* 74, 2279–2296.
- Green, D.R., Smith, T.M., Bidlack, F.B., Green, G.M., Colman, A.S., Tafforeau, P., 2017. Synchrotron imaging and Markov Chain Monte Carlo reveal tooth mineralization patterns. *PLoS One* 12, e0186391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186391>.
- Griffith, E.M., Schmitt, A.D., Andrews, M.G., Fantle, M.S., 2020. Elucidating modern geochemical cycles at local, regional, and global scales using calcium isotopes. *Chem. Geol.* 534, 119445. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2019.119445>.
- Guérin, C., Philippe, M., Vilain, R., 1979. Le gisement Pleistocène supérieur de la grotte de Jaurens à Nespoules, Corrèze, France: historique et généralités. *Nouv. Arch. du Muséum D'Histoire Nat. Lyon* 17, 11–16.
- Gussone, N., Heuser, A., 2016. Biominerals and biomaterial. In: Hoefs, J. (Ed.), *Calcium Stable Isotope Geochemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 111–144.
- Hadjidakis, D.J., Androulakis, I.I., 2006. Bone remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092, 385–396. <https://doi.org/10.1196/annals.1365.035>.
- Harris, R.B., Wall, W.A., Allendorf, F.W., 2002. Genetic consequences of hunting: what do we know and what should we do? *Wildl. Soc. Bull.* 30, 634–643.
- Hassler, A., Martin, J.E., Amiot, R., Tacail, T., Godet, F.A., Allain, R., Balter, V., 2018. Calcium isotopes offer clues on resource partitioning among cretaceous predatory dinosaurs. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285, 20180197. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0197>.
- Hassler, Auguste, Martin, Jeremy E., Ferchaud, Stéphane, Grivault, Doryan, Le Goff, Samuel, Albalat, Emmanuelle, Hernandez, Jean-Alexis, Tacail, Théo, Balter, Vincent, 2021. Lactation and gestation controls on calcium isotopic compositions in a mammalian model. *Metallomics*. <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfab019>.
- Hearney, A.W., Jennings, T.J., 1983. Annual foods of the Red deer (*Cervus elaphus*) and the Roe deer (*Capreolus capreolus*) in the east of England. *J. Zool.* 201, 565–570.
- Heuser, A., 2016. Biomedical application of Ca stable isotopes. In: Hoefs, J. (Ed.), *Calcium Stable Isotope Geochemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 247–260.
- Heuser, A., Eisenhauer, A., 2008. The calcium isotope composition ( $\delta^{44}\text{Ca}$ ) of NIST SRM 915b and NIST SRM 1486. *Geostand. Geoanal. Res.* 32, 311–315. <https://doi.org/10.1111/j.1751-908X.2008.00877.x>.
- Heuser, A., Eisenhauer, A., 2010. A pilot study on the use of natural calcium isotope ( $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ ) fractionation in urine as a proxy for the human body calcium balance. *Bone* 46, 889–896. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.11.037>.
- Heuser, A., Tütken, T., Gussone, N., Galer, S.J.G., 2011. Calcium isotopes in fossil bones and teeth - Diagenetic versus biogenic origin. *Geochim. Cosmochim. Acta* 75, 3419–3433. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.03.032>.
- Heuser, A., Eisenhauer, A., Scholz-Ahrens, K.E., Schrezenmeir, J., 2016. Biological fractionation of stable Ca isotopes in Göttingen minipigs as a physiological model for Ca homeostasis in humans. *Isot. Environ. Health Stud.* 52, 633–648. <https://doi.org/10.1080/10256016.2016.1151017>.
- Heuser, A., Frings-Meuthen, P., Rittweger, J., Galer, S.J.G., 2019. Calcium isotopes in human urine as a diagnostic tool for bone loss: additional evidence for time delays in bone response to experimental bed rest. *Front. Physiol.* 10, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00012>.
- Hirata, T., Tanoshima, M., Suga, A., Tanaka, Y., Nagata, Y., Shinohara, A., Chiba, M., 2008. Isotopic analysis of calcium in blood plasma and bone from mouse samples by multiple collector-ICP-mass spectrometry. *Anal. Sci.* 24, 1501–1507. <https://doi.org/10.2116/analsci.24.1501>.
- Hofmann, R.R., 1989. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia* 78, 443–457. <https://doi.org/10.1007/BF02352565>.
- Holmden, C., Bélanger, N., 2010. Ca isotope cycling in a forested ecosystem. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74, 995–1015. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2009.10.020>.
- Jones, K.E., Bielby, J., Cardillo, M., Fritz, S.A., O'Dell, J., Orme, C.D.L., Safi, K., Sechrest, W., Boakes, E.H., Carbone, C., Connolly, C., Cutts, M.J., Foster, J.K., Grenyer, R., Plaster, C.A., Price, S.A., Rigby, E.A., Rist, J., Teacher, A., Bininda-Emonds, O.R.P., Gittleman, J.L., Mace, G.M., Purvis, A., 2009. PanTHERIA: a species-level database of life history, ecology, and geography of extant and recently extinct mammals. *Ecology* 90, 2648.
- Karlsson, C., Obrant, K.J., Karlsson, M., 2001. Pregnancy and lactation confer reversible bone loss in humans. *Osteoporos. Int.* 12, 828–834.
- Kjos-Hanssen, O., 1973. Reindeer antlers and what they can tell us about the reindeer population. *Nor. Archaeol. Rev.* 6, 74–78. <https://doi.org/10.1080/00293652.1973.9965188>.
- Klevegal, G.A., Mina, M.V., 1995. *Recording Structures of Mammals: Determination of Age and Reconstruction of Life History*. CRC Press.
- Kohn, M.J., 2004. Comment: Tooth enamel mineralization in ungulates: Implications for recovering a primary isotopic time-series, by B. H. Passey and T. E. Cerling (2002). *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 403–405. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(03\)00446-0](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(03)00446-0).
- Kovacs, C.S., Fuleihan, G.E., 2006. Calcium and bone disorders during pregnancy and lactation. *Endocrinol. Metab. Clin.* 35, 21–51. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2005.09.004>.



- Krausman, P.R., Bissonette, J.A., 1977. Bone-chewing behavior of desert mule deer. *Southwest. Nat.* 22, 149–150.
- Kruuk, L.E.B., Slate, J., Pemberton, J.M., Brotherstone, S., Guinness, F., Clutton-Brock, T., 2002. Antler size in red deer: Heritability and selection but no evolution. *Evolution* (N. Y.) 56, 1683–1695. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb01480.x>.
- Li, C., 2013. Histogenetic aspects of deer antler development. *Front. Biosci.* 5, 479–489.
- Li, Q., Thirlwall, M., Müller, W., 2016. Ca isotopic analysis of laser-cut microsamples of (bio)apatite without chemical purification. *Chem. Geol.* 422, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2015.12.007>.
- Li, Q., Nava, A., Reynard, L.M., Thirlwall, M., Bondioli, L., Müller, W., 2020. Spatially-resolved Ca isotopic and trace element variations in human deciduous teeth record diet and physiological change. *Environ. Archaeol.* 1–10 <https://doi.org/10.1080/14614103.2020.1758988>.
- Marie, W., 1982. Antlers—a mineral source in Rangifer. *Acta Zool.* 63, 7–10.
- Martin, J.E., Tacaïl, T., Adnet, S., Girard, C., Balter, V., 2015. Calcium isotopes reveal the trophic position of extant and fossil elasmobranchs. *Chem. Geol.* 415, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2015.09.011>.
- Martin, J.E., Tacaïl, T., Balter, V., 2017a. Non-traditional isotope perspectives in vertebrate palaeobiology. *Palaeontology* 60, 485–502. <https://doi.org/10.1111/pala.12300>.
- Martin, J.E., Vincent, P., Tacaïl, T., Khaldoune, F., Jourani, E., Bardet, N., Balter, V., 2017b. Calcium isotopic evidence for vulnerable marine ecosystem structure prior to the K/Pg extinction. *Curr. Biol.* 1–4 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.043>.
- Martin, J.E., Tacaïl, T., Cerling, T.E., Balter, V., 2018. Calcium isotopes in enamel of modern and Plio-Pleistocene East African mammals. *Earth Planet. Sci. Lett.* 503, 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2018.09.026>.
- Mathiesen, S.D., Haga, E., Kaino, T., Tyler, N.J.C., 2000. Diet composition, rumen papillation and maintenance of carcass mass in female Norwegian reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in winter. *J. Zool.* 251, 129–138. <https://doi.org/10.1017/S0952836900005136>.
- Melin, A.D., Crowley, B.E., Brown, S.T., Wheatley, P.V., Moritz, G.L., Yit Yu, F.T., Bernard, H., DePaolo, D.J., Jacobson, A.D., Dominy, N.J., 2014. Calcium and carbon stable isotope ratios as paleodietary indicators. *Am. J. Phys. Anthropol.* 154, 633–643. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22530>.
- Merceron, G., Berlioz, E., Vonhof, H., Green, D., Garel, M., Tütken, T., 2021. Tooth tales told by dental diet proxies: an alpine community of sympatric ruminants as a model to decipher the ecology of fossil fauna. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 562, 110077. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2020.110077>.
- Miller, F.L., 1972. Eruption and attrition of mandibular teeth in barren-ground caribou. *J. Wildl. Manag.* 606–612.
- Mitchell, B., McCowan, D., Nicholson, I.A., 1976. Annual cycles of body weight and condition in Scottish Red deer, *Cervus elaphus*. *J. Zool.* 180, 107–127. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1976.tb04667.x>.
- Morgan, J.L.L., Skulan, J.L., Gordon, G.W., Romaniello, S.J., Smith, S.M., Anbar, A.D., 2012. Rapidly assessing changes in bone mineral balance using natural stable calcium isotopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 9989–9994. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119587109>.
- Moynier, F., Fujii, T., 2017. Calcium isotope fractionation between aqueous compounds relevant to low-temperature geochemistry, biology and medicine. *Sci. Rep.* 7, 44255. <https://doi.org/10.1038/srep44255>.
- Muir, P.D., Sykes, A.R., Barrell, G.K., 1987a. Calcium metabolism in red deer (*Cervus elaphus*) offered herbage during antlerogenesis: kinetic and stable balance studies. *J. Agric. Sci.* 109, 357–364. <https://doi.org/10.1017/S0021859600080783>.
- Muir, P.D., Sykes, A.R., Barrell, G.K., 1987b. Growth and mineralisation of antlers in red deer (*Cervus elaphus*). *New Zeal. J. Agric. Res.* 30, 305–315. <https://doi.org/10.1080/00288233.1987.10421889>.
- Müller, W., Nava, A., Evans, D., Rossi, P.F., Alt, K.W., Bondioli, L., 2019. Enamel mineralization and compositional time-resolution in human teeth evaluated via histologically-defined LA-ICPMS profiles. *Geochim. Cosmochim. Acta* 255, 105–126. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2019.03.005>.
- Passey, B.H., Cerling, T.E., 2002. Tooth enamel mineralization in ungulates: Implications for recovering a primary isotopic time-series. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66, 3225–3234. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(02\)00933-X](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)00933-X).
- Pasteris, J.D., Wopenka, B., Valsami-Jones, E., 2008. Bone and tooth mineralization: why apatite? *Elements* 4, 97–104. <https://doi.org/10.2113/GSELEMENTS.4.2.97>.
- Pellerin, M., Bonenfant, C., Garel, M., Chevrier, T., Queney, G., Klein, F., Michallet, J., 2014. Dynamique de la population de cerfs du domaine national de Chambord : Analyse temporelle des indicateurs de changement écologique (ICE) (Rapp. d'expertise ONCFS).
- Ramberg Jr., C.F., Mayer, G.P., Kronfeld, D.S., Phang, J.M., Berman, M., 1970. Calcium kinetics in cows during late pregnancy, parturition, and early lactation. *Am. J. Phys.* 1166–1177. Content 219.
- Redjadj, C., Darmon, G., Maillard, D., Chevrier, T., Bastianelli, D., Verheyden, H., Loison, A., Saïd, S., 2014. Intra- and interspecific differences in diet quality and composition in a large herbivore community. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084756>.
- Reynard, L.M., Henderson, G.M., Hedges, R.E.M., 2010. Calcium isotope ratios in animal and human bone. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74, 3735–3750. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.04.002>.
- Rolf, H.J., Enderle, A., 1999. Hard fallow deer antler: a living bone till antler casting? *Anat. Rec.* 255, 69–77. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(19990501\)255:1<69::AID-AR8>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(19990501)255:1<69::AID-AR8>3.0.CO;2-R).
- Schmitt, A.-D., 2016. Earth-surface Ca isotopic fractionations. In: Hoefs, J. (Ed.), *Calcium Stable Isotope Geochemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 145–172.
- Skulan, J., DePaolo, D.J., 1999. Calcium isotope fractionation between soft and mineralized tissues as a monitor of calcium use in vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13709–13713. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13709>.
- Skulan, J., Bullen, T., Anbar, A.D., Puzas, J.E., Ford, L.S., LeBlanc, A., Smith, S.M., 2007. Natural calcium isotopic composition of urine as a marker of bone mineral balance. *Clin. Chem.* 53, 1155–1158. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.080143>.
- Smith, C.E., 1998. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 9, 128–161.
- Smith, T.M., Austin, C., Green, D.R., Joannes-boyau, R., Bailey, S., Dumitriu, D., Fallon, S., Grün, R., James, H.F., Moncel, M., Williams, I.S., Wood, R., Arora, M., 2018. Wintertime stress, nursing, and lead exposure in Neanderthal children. *Sci. Adv.* 4 eaau9483.
- Stevens, R.E., Balasse, M., O'Connell, T.C., 2011. Intra-tooth oxygen isotope variation in a known population of red deer: implications for past climate and seasonality reconstructions. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 301, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2010.12.021>.
- Storms, D., Aubry, P., Hamann, J.-L., Saïd, S., Fritz, H., Saint-Andrieux, C., Klein, F., 2008. Seasonal variation in diet composition and similarity of sympatric red deer *Cervus elaphus* and roe deer *Capreolus capreolus*. *Wildl. Biol.* 14, 237–250. [https://doi.org/10.2981/0909-6396\(2008\)14\[237:svidca\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2981/0909-6396(2008)14[237:svidca]2.0.co;2).
- Tacaïl, T., 2017. Calcium isotope physiology in mammals. PhD thesis. Université de Lyon.
- Tacaïl, T., Albalat, E., Télouk, P., Balter, V., 2014. A simplified protocol for measurement of Ca isotopes in biological samples. *J. Anal. At. Spectrom.* 29, 529. <https://doi.org/10.1039/c3ja50337b>.
- Tacaïl, T., Télouk, P., Balter, V., 2016. Precise analysis of calcium stable isotope variations in biological apatites using laser ablation MC-ICPMS. *J. Anal. At. Spectrom.* 31, 152–162. <https://doi.org/10.1039/C5JA00239G>.
- Tacaïl, T., Thivichon-Prince, B., Martin, J.E., Charles, C., Viriot, L., Balter, V., 2017. Assessing human weaning practices with calcium isotopes in tooth enamel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 6268–6273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704412114>.
- Tacaïl, T., Martin, J.E., Arnaud-Godet, F., Thackeray, J.F., Cerling, T.E., Braga, J., Balter, V., 2019. Calcium isotopic patterns in enamel reflect different nursing behaviors among South African early hominins. *Sci. Adv.* 5 <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax3250> eaax3250.
- Tacaïl, T., Le Houedec, S., Skulan, J.L., 2020. New frontiers in calcium stable isotope geochemistry: Perspectives in present and past vertebrate biology. *Chem. Geol.* <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2020.119471>.
- Thomas, D., Barry, S., 2005. Antler mass of barren-ground caribou relative to body condition and pregnancy rate. *Arct. Inst. North Am.* 58, 241–246.
- Traylor, R.B., Kohn, M.J., 2017. Tooth enamel maturation reequilibrates oxygen isotope compositions and supports simple sampling methods. *Geochim. Cosmochim. Acta* 198, 32–47. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2016.10.023>.
- Vanhouten, J.N., Wysolmerski, J.J., 2003. Low estrogen and high parathyroid hormone-related peptide levels contribute to accelerated bone resorption and bone loss in lactating mice. *Endocrinology* 144, 5521–5529. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0892>.
- Wysolmerski, J.J., 2002. The evolutionary origins of maternal calcium and bone metabolism during lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 267–276.
- Zanolli, C., Bondioli, L., Manni, F., Rossi, P., Macchiarelli, R., 2011. Gestation length, mode of delivery, and neonatal line-thickness variation. *Hum. Biol.* 83, 695–713. <https://doi.org/10.3378/027.083.0603>.

## 4. Perspectives sur les effets de la lactation

Cette étude constitue la première observation de différences de composition isotopique du Ca entre les mâles et les femelles d'une espèce autre que le mouton domestique (Reynard et al., 2010). Plusieurs scénarios sont discutés dans ce papier pour comprendre l'origine de ces différences isotopiques portées par le sexe, mais c'est la lactation qui semble être le candidat le plus pertinent. Cette découverte va tout à fait dans le sens de ce qui a pu être décrit chez les cochons dans le chapitre III et corrobore certaines hypothèses formulées pour le mouton par Reynard et ses collaborateurs en 2010. Il apparaît cependant que les différences inter-sexes de composition isotopique du Ca demeurent relativement ténues à l'échelle des populations chez qui elles ont été documentées jusqu'ici. Dans le cas de cette étude sur le cerf élaphe par exemple, les compositions isotopiques des femelles sont si proches des mâles qu'il n'a été possible d'identifier une différence significative qu'en identifiant la fraction des femelles susceptibles d'avoir allaité récemment. Ceci a des implications importantes sur les stratégies qui peuvent être envisagées pour étudier ces différences chez des espèces fossiles pour lesquelles le sexe des individus fossilisés est inconnu dans l'immense majorité des cas (voir chapitre V). Toujours concernant la lactation, cette étude a également permis de documenter un nouveau cas de mammifère chez qui la transition entre allaitement et sevrage est visible dans l'évolution des compositions isotopiques du Ca de l'émail. Après l'humain (Tacail et al., 2017, 2019 ; Li et al., 2020) et le mouton domestique (Wright, 2014), le cerf élaphe est donc la troisième espèce chez qui les pratiques d'allaitement et de sevrage ont pu être documentées de cette manière. Cela soutient également que le suivi de telles transitions dans l'émail d'espèces fossiles pourrait permettre d'identifier des phases de consommation de lait par le juvénile, et donc la capacité chez l'espèce étudiée de produire du lait.

### C. *Le modèle murin*

#### 1. Introduction

Le modèle d'étude des mammifères le plus courant dans la littérature est de loin celui de la souris grise (*Mus musculus*) et des autres rongeurs de laboratoire (Morse III, 2007 ; Perlman, 2016). Bien que la

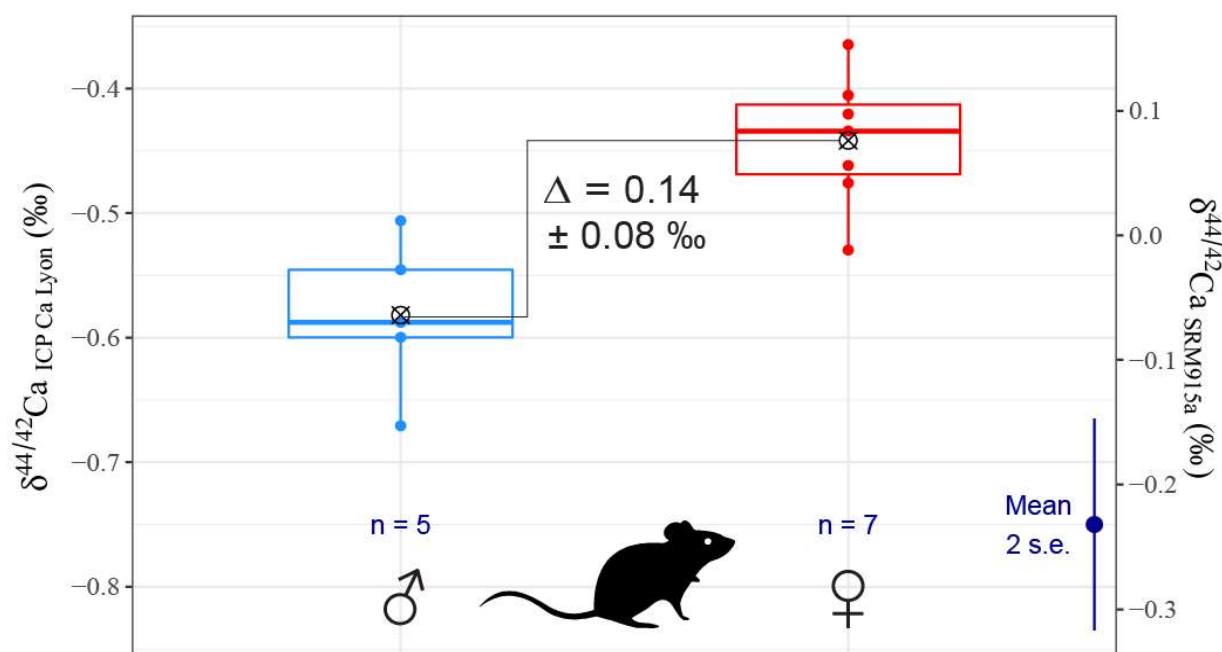
concentration des efforts de recherche sur ce modèle principal est critiquée sous certains aspects, plus d'un siècle de recherches a fourni une quantité impressionnante de données sur la physiologie de ces animaux, à tel point que celle-ci est parfois mieux documentée que celle de l'humain (Morse III, 2007 ; Wald et Wu, 2010 ; Perlman, 2016). Aussi, la souris de laboratoire constitue un candidat de choix pour étudier les effets de la lactation sur la composition isotopique des tissus des mammifères. Ce constat est d'autant plus conforté par les résultats décrits dans le chapitre III, qui suggèrent que les mammifères seront plus susceptibles de manifester des différences de composition isotopique du Ca entre les os d'individus de sexe différent si les femelles passent une fraction importante de leur vie à allaiter des petits. Compte tenu de l'âge de primiparité relativement précoce des souris (4 à 5 mois), de leur durée de gestation (environ 20 jours) et de sevrage (environ 22 jours), du temps moyen séparant chaque portée (environ 67 jours), ainsi que de la longévité qui peut dépasser 5 ans chez ces animaux (Jones et al., 2009 ; Ferrari et al., 2019), on peut considérer qu'une souris femelle passe jusqu'à 30 % de sa vie à allaiter. Bien sûr, ce chiffre n'est atteint que dans des conditions bien particulières, puisque les conditions en laboratoires ou dans le milieu naturel permettent rarement aux souris femelles d'atteindre des âges aussi avancés tout en maintenant une reproduction continue. Toutefois, les résultats publiés par Hirata et al. (2008) suggèrent que les souris voient la valeur de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de leur sang augmenter de l'ordre de +0,75 ‰ en période d'allaitement, un effet encore plus marqué que ce que décrit le chapitre III pour le cochon. En faisant l'hypothèse qu'une souris passe en moyenne 20 % de sa vie à allaiter, et en faisant l'approximation que ces 20 % correspondent également au pourcentage de Ca des os provenant de périodes de lactation, on peut prédire une différence inter-sexes des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'os de l'ordre de 0,2 ‰. Cette estimation est grossière car la dynamique du Ca dans l'os ne fonctionne pas de manière aussi simpliste (voir articles des chapitres III et IV), mais cela donne un ordre d'idée du résultat que l'on pourrait attendre dans une population de souris. Afin de tester la présence de différences inter-sexes de composition isotopique du Ca chez la souris grise, une étude pilote a été menée par l'intermédiaire d'un stage réalisé par Emma Fabre (à l'époque étudiante de L3 Géosciences à Lyon) sous ma supervision.

## 2. Matériel et méthode

La possibilité d'étudier du matériel murin s'est présentée par l'intermédiaire d'études menées sur la morphologie des dents de ces animaux par Cyril Charles et ses collaborateurs (Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon). Les fémurs de 12 individus (5 mâles et 7 femelles) ont pu être collectés, sectionnés au niveau de la diaphyse, puis nettoyés manuellement et chimiquement (à l'aide d'eau MilliQ®, d'éthanol et d'eau oxygénée 30 %). Chaque section ainsi prélevée a par la suite été dissoute, purifiée et analysée en suivant le protocole décrit dans le chapitre II. Le sexe des individus était connu, ce qui n'était pas le cas de l'âge et de l'historique de reproduction de ces derniers.

## 3. Résultats et discussion

Les résultats de ces analyses permettent d'identifier une différence de  $+0,14 \pm 0,08 \text{ ‰}$  (intervalle de confiance à 95 %) entre la valeur moyenne de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  des os des mâles et celle des femelles (figure



**Figure IV.1 – Composition isotopique du Ca des os d'une population de souris grises (*Mus musculus*).** Le repère noir barré au centre des boxplots indique la moyenne par sexe des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'os. L'incertitude autour de la différence  $\Delta$  entre ces moyennes correspond à l'intervalle de confiance à 95 % autour de cette différence (calculé par t-test, variante de Welch). La droite au centre des boxplots marque la médiane, les boîtes sont limitées par les premiers et troisièmes quartiles, et les moustaches s'étendent jusqu'aux données les plus distantes de la médiane (dans la limite de 1,5 fois la distance interquartiles). **Bone Ca isotopic composition of a house mouse population (*Mus musculus*).** The crossed cue point in each boxplot indicates the mean bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of males and females. The uncertainty range given for the  $\Delta$  difference between these means is the 95 % confidence interval of this difference calculated from a t-test (Welch's test variant). The line in the center of boxplots represents the median, while boxes are limited by the first and third quartiles. Whiskers extend up to the farthest data points from the median, in the limit of 1.5 times the interquartile distance.

IV.1). Ces observations sont parfaitement similaires aux différences isotopiques précédemment décrites pour le mouton domestique (Reynard et al., 2010) et le cerf élaphe (section IV.B). Par ailleurs, ces données correspondent tout à fait à l'amplitude des différences inter-sexes de valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  des os que l'on pouvait attendre chez la souris, au vu de la fraction temporelle que les femelles passent à allaiter au cours de leur vie (de l'ordre de 20 %, voir section IV.C.1 ; Jones et al., 2009 ; Ferrari et al., 2019) et des changements de composition isotopique du sang décrits chez cet animal au cours de l'allaitement (Hirata et al., 2008). En revanche, comme pour le cerf ou le mouton, les différences observées demeurent relativement ténues à l'échelle de la variabilité isotopique intra-sexe et de la précision des mesures.

#### 4. Conclusion et perspectives

Cette étude fournit des résultats prometteurs dans la mesure où les résultats soulignent un nouveau cas de différence inter-sexes de valeur de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'os, que celui-ci semble conforme aux prédictions que l'on peut faire à partir des pratiques d'allaitement et du mode de vie de la souris grise, et qu'il s'agit de la première observation d'une telle différence chez un groupe autre que celui des artiodactyles (l'ordre regroupant notamment le cerf et le mouton). Afin d'affiner les résultats de cette étude pilote, il pourrait être pertinent de s'intéresser à une autre population de cette espèce, avec des individus pour lesquels l'historique de reproduction (en particulier celui des femelles) serait connu. Un projet a déjà été formulé en ce sens, qui vise à valoriser des spécimens de souris ayant vécu en conditions contrôlées dans le cadre d'une étude de morphométrie menée par Sabrina Renaud et ses collaborateurs (Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive).

#### *D. Les marsupiaux et les monotrèmes*

##### 1. Introduction générale

Jusqu'à présent, la totalité des études ayant permis d'identifier des différences inter-sexes de valeur de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'os ont porté sur des mammifères placentaires (mouton, souris, cerf : Reynard et al., 2010 ; Hassler et al., 2021a ; section IV.C). C'est également le cas des études ayant permis de décrire des changements de composition isotopique du Ca dans le sang lors de l'allaitement (souris, cochon :



Hirata et al., 2008 ; Hassler et al., 2021b). La finalité de cette thèse étant de développer un outil pour identifier des événements de lactation passés chez des espèces fossiles, y compris non-placentaires (la lactation étant apparue bien avant la gestation au cours de l'évolution), il était important d'explorer si cette dynamique des isotopes du Ca se retrouvait également chez les marsupiaux et les monotrèmes. Cet aspect de ma thèse s'est organisé autour d'une mission de 3 mois réalisée en Australie en 2018, en collaboration avec le Wollongong Isotope Geochronology Laboratory (WIGL, News South Wales), l'université du Queensland (Brisbane, Queensland), le Queensland Museum (Brisbane, Queensland), le Western Australian Museum (Perth, Western Australia) et l'université de Deakin (Geelong, Victoria). Cette mission a permis la collecte et l'analyse de matériel osseux et de lait de marsupiaux et de monotrèmes à partir des collections des différentes institutions précédemment citées. Les résultats de ces analyses sont discutés dans les sous-parties suivantes de cette section IV.D.

## 2. Le wallaby de l'île Eugène

### a) Introduction

Le wallaby de l'île Eugène (tammar wallaby, *Macropus eugenii*) est une espèce marsupiale qui fait partie de la famille des macropodidés, un clade qui intègre les wallabys, les kangourous, les kangourous arboricoles, le quokka ainsi que bien d'autres marsupiaux actuels et fossiles (Weisbecker et Beck, 2015). Comme beaucoup d'espèces de cette famille, le wallaby de l'île Eugène est un herbivore essentiellement pisseur (grazer), vivant en groupe, et dont les périodes d'alimentation sont principalement crépusculaires (Hess, 1980 ; Lentle, 1998). À l'instar des autres marsupiaux, le wallaby de l'île Eugène connaît des gestations relativement courtes, de l'ordre de 27 jours (Tyndale-Biscoe et al., 1988 ; Sharp et al., 2017). À la naissance, le juvénile est hautement nidicole (i.e. autonomie très réduite), son stade de développement s'apparentant à celui d'un embryon humain entamant son dernier trimestre de gestation (Nicholas et al., 2019). Contrairement aux mammifères placentaires chez qui la composition du lait change peu au cours de l'allaitement, à l'exception des différences entre le colostrum et le lait plus mature, l'allaitement du tamar wallaby s'articule autour de quatre phases

au cours desquelles le lait adopte une composition spécifique qui module la croissance et le développement du juvénile (Tyndale-Biscoe et al., 1988 ; Sharp et al., 2017).

La première phase (P1) n'est pas une phase de lactation à proprement parler. Elle s'initie durant la gestation et se manifeste par le développement des quatre glandes mammaires de la femelle, en préparation de l'arrivée du juvénile. À la naissance, le juvénile pèse moins de 0,5 g (une femelle adulte pesant dans les 4 à 5 kg). Bien que très peu développé, ce dernier est capable de se déplacer depuis le canal génital jusqu'à la poche marsupiale où se trouvent les glandes mammaires (Tyndale-Biscoe et al., 1988 ; Sharp et al., 2017). Au terme de cet exploit, le juvénile s'attache à l'une des glandes mammaires et y reste fixé pendant une centaine de jours. C'est ce qu'on appelle la phase P2A durant laquelle le lait maternel, alors produit en petite quantité et constitué essentiellement de glucides complexes avec peu de protéines et de lipides, va ralentir la croissance du juvénile et assurer le développement de ses tissus et organes (Hendry et al., 1998 ; Trott et al., 2003 ; Sharp et al., 2017). La phase P2B s'amorce lorsque le juvénile commence à se détacher du mamelon tout en demeurant exclusivement dans la poche (Hendry et al., 1998 ; Trott et al., 2003 ; Sharp et al., 2017). Cette phase dure une centaine de jours supplémentaires durant laquelle le lait garde une concentration élevée en glucides et faible en lipides et protéines, ces concentrations étant toutefois différentes de celles sécrétées lors de la phase P2A (Brennan et al., 2007a ; Sharp et al., 2017). Durant la dernière phase (P3), la production de lait augmente et le juvénile est devenu suffisamment autonome pour sortir périodiquement de la poche maternelle et commencer à se nourrir de végétaux comme les adultes (Tyndale-Biscoe et al., 1988 ; Hendry et al., 1998 ; Sharp et al., 2017). Cette phase voit la composition du lait maternel changer radicalement en s'appauvrissant en glucides au profit d'un apport élevé en lipides et protéines (Tyndale-Biscoe et al., 1988 ; Hendry et al., 1998 ; Sharp et al., 2017). C'est aussi durant cette période que le juvénile entre dans sa phase de croissance la plus rapide et devient pleinement endotherme (Nicholas et al., 1997 ; Sharp et al., 2017). La phase P3 se termine le plus souvent aux alentours du 315<sup>ème</sup> jour *post-partum* avec le sevrage complet du juvénile, bien que certaines femelles allaitent encore occasionnellement jusqu'à plus de 420 jours *post-partum* (Tyndale-Biscoe et al., 1988 ; Sharp et al., 2017). Le contrôle de la composition du lait sur la croissance du juvénile est très fort, comme le

démontre le développement accéléré des juvéniles précoces nourris avec du lait de phase P3, notamment au niveau de certains organes tel que l'estomac antérieur (Trott et al., 2003 ; Kwek et al., 2009).

Le wallaby de l'île Eugène est un animal qui a concentré beaucoup d'attention concernant l'étude du développement des juvéniles et de la lactation, faisant de cet animal un modèle de l'étude de la lactation marsupiale (Tyndale-Biscoe et al., 1988 ; Kwek et al., 2009 ; Vander Jagt et al., 2016 ; Sharp et al., 2017 ; Lefèvre et al., 2019 ; Nicholas et al., 2019). C'est ce statut qui a motivé la sélection de cette espèce pour mener à bien cette étude des compositions isotopiques du Ca chez les marsupiaux. Ce choix fût également motivé par la capacité de cet animal à maintenir simultanément la production de laits de phases différentes (P2A, P2B, P3), grâce à la prise en charge de cette production par différentes glandes mammaires réservées à des juvéniles d'âges différents (Nicholas, 1988 ; Nicholas et al., 1997, 2012 ; Brennan et al., 2007b ; Wanyonyi et al., 2013 ; Sharp et al., 2017). En effet, grâce à cette aptitude, les femelles adultes sont capables d'allaiter un juvénile vivant en dehors de la poche avec du lait de phase P3, tout en fournissant du lait de phase P2 à un juvénile plus jeune encore inféodé à la poche maternelle. En outre, ces wallabys ont également la capacité de « mettre en pause » le développement d'un embryon afin d'attendre la période la plus favorable pour la naissance (Sharp et al., 2017). Il est donc fréquent que les femelles adultes allaitent simultanément un juvénile en phase P3, un juvénile en phase P2, et qu'un embryon soit maintenu prêt pour poursuivre la gestation et initier la phase P2A lorsque le juvénile précédent aura quitté la poche maternelle. De part ce mode de reproduction, une femelle de wallaby de l'île Eugène peut demeurer presque perpétuellement en lactation si aucun facteur externe (e.g. climat, prédateur) ne vient interrompre sa reproduction. Dans notre modèle de formation des différences inter-sexes de composition isotopique du Ca dans l'os, ce mode de vie constitue un cadre théoriquement idéal pour générer ces différences isotopiques. Afin de tester cette hypothèse, j'ai réalisé une campagne d'échantillonnage et d'analyses sur les os d'une population de wallabys de l'île Eugène.

b) Matériel et méthodes

Les spécimens que j'ai étudiés font partie intégrante des collections du Western Australian Museum à Perth. Il s'agit de 14 adultes (7 mâles, 7 femelles) et de 5 jeunes (4 mâles, 1 femelle). Tous ces spécimens sont issus d'une population insulaire de wallabys originaire de l'île de Garden Island. Cette île, située à environ 5 kilomètres des côtes de Perth, est reliée au continent par une digue et un pont depuis les années 1970. Les spécimens de cette étude proviennent de collections créées dans les années 1920 à 1960, avant la construction de la digue. Comme tous les tamar wallabys d'Australie-Occidentale, ils appartiennent à la sous-espèce *Macropus eugenii derbianus*. Les prélèvements d'os que j'ai réalisés sur ces spécimens (entre 0,5 et 1 mg) ont été effectués sur la base inférieure de la mandibule (figure IV.2) à l'aide d'une foreuse Dremel® équipée d'un foret en carbure de tungstène. La poudre obtenue a subi un traitement et des analyses de composition isotopique du Ca équivalentes à



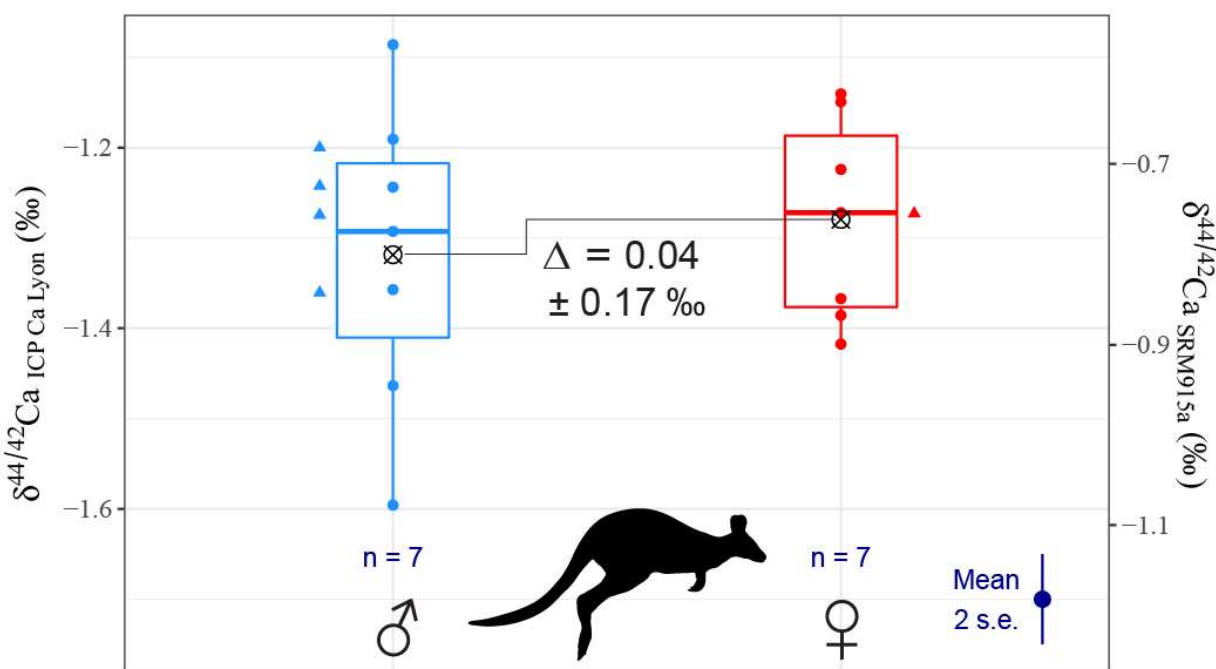
**Figure IV.2 – Photo (éditée) post-prélèvement d'une mandibule de wallaby de l'île Eugène (*Macropus eugenii derbianus*). La pointe métallique indique la zone de prélèvement. Post-sampling photo (edited) of the jaw of a tamar wallaby (*Macropus eugenii*). The metal point indicates the sampling zone.**

la procédure décrite dans le chapitre II, avec l'assistance du Wollongong Isotope Geochronology Laboratory (WIGL, News South Wales).

c) Résultats et discussion

Les résultats de ces analyses sont présentés en figure IV.3. Aucune différence significative de composition isotopique du Ca n'a pu être détectée entre mâles et femelles ( $\Delta = 0,04 \pm 0,17 \text{ ‰}$ , intervalle de confiance à 95 %), ni entre classes d'âges (figure IV.3). En effet, contrairement aux cas du mouton (Reynard et al., 2010), du cerf élaphe et de la souris (sections précédentes de ce chapitre), les valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'os rapportées pour les femelles sont en moyenne centrées sur la gamme de valeurs des mâles et ne sortent pas de cette gamme. Ceci contredit les prédictions faites pour cette espèce, compte tenu de l'aptitude des femelles à allaiter des petits presque continuellement dès leur maturité sexuelle. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour essayer de comprendre cette absence de différences. Tout d'abord, il est sans doute exagéré de considérer que l'allaitement est vraiment continu chez les femelles de cette espèce. En effet, même si ces dernières présentent techniquement cette aptitude, la mort des juvéniles pendant l'allaitement est un phénomène fréquent en cas de pénurie alimentaire, avec des taux de mortalité pouvant dépasser les 80 % (Hess, 1980 ; Chambers, 2009). Or, des périodes de sécheresse modérées à fortes ont été relevées durant la période de constitution de ces collections (<http://www.bom.gov.au/climate/drought/knowledge-centre/previous-droughts.shtml>). Ces événements limitent la continuité réelle entre les périodes de lactation et donc la fraction de temps qu'une femelle passera à allaiter au cours de sa vie. En outre, il peut être inapproprié de considérer que la lactation des wallabys de l'île Eugène se manifeste par un transfert intense de Ca pendant toutes les phases de l'allaitement. En effet, si les gènes codant pour les caséines (les molécules transportant l'essentiel du Ca dans le lait) sont exprimées pendant toutes les phases de la lactation (i.e. P2A, P2B et P3), l'essentiel de la prise de masse du juvénile (environ 80 %) se concentre durant la phase P3 (Nicholas et al., 1997 ; Brennan et al., 2007a ; Sharp et al., 2017). Bien que cette phase soit aussi associée à l'introduction d'herbage dans l'alimentation du juvénile, c'est également la phase où la production de lait est la plus importante. Si la lactation impacte réellement la composition isotopique du Ca du sang des wallabys, il est donc probable que ces

changements isotopiques ne se concentrent que durant la phase P3. Si cela s'avère exact, la fraction de temps durant laquelle les femelles verraient la composition isotopique du Ca de leur sang modifiée s'en trouverait réduite, ce qui limiterait là aussi les chances de propager ces changements isotopiques à l'os. Dans un tel scénario, il est probable que des différences inter-sexes de composition isotopique du Ca de l'os ne soient observables que chez les populations avec une reproduction active sans mortalité juvénile importante, un paramètre inconnu pour les spécimens de cette étude. Le dernier point d'interrogation majeur autour de cette absence de différences isotopiques inter-sexes seraient repose sur l'absence de preuve directe démontrant que le lait des wallabys, ou plus généralement des marsupiaux, subit un fractionnement isotopique du Ca au cours de sa formation tel qu'observé chez



**Figure IV.3 – Composition isotopique du Ca des os d'une population de wallabys de l'île Eugène (*Macropus eugenii*).** Le repère noir barré au centre des boxplots indique la moyenne par sexe des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'os des adultes. Les points alignés avec les boxplots représentent les données des adultes, tandis que les triangles de part et d'autre des boxplots représentent des données issues de jeunes individus (l'âge précis des individus est inconnu). L'incertitude autour de la différence  $\Delta$  entre ces moyennes correspond à l'intervalle de confiance à 95 % autour de cette différence (calculé par t-test, variante de Welch). La droite au centre des boxplots marque la médiane, les boîtes sont limitées par les premiers et troisièmes quartiles, et les moustaches s'étendent jusqu'aux données les plus distantes de la médiane (dans la limite de 1,5 fois la distance interquartiles). **Bone Ca isotopic composition of a tammar wallaby population (*Macropus eugenii*).** The crossed cue point in each boxplot indicates the mean bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of males and females. The dots which are aligned with boxplots represent adult data, whereas triangles next to boxplots represent data from young specimens (the precise age of the specimens is unknown). The uncertainty range given for the  $\Delta$  difference between these means is the 95 % confidence interval of this difference calculated from a t-test (Welch's test variant). The line in the center of boxplots represents the median, while boxes are limited by the first and third quartiles. Whiskers extend up to the farthest data points from the median, in the limit of 1.5 times the interquartile distance.

les mammifères placentaires. Indépendamment des données présentées dans cette thèse, la publication très récente d'une étude portant sur le wombat commun (*Vombatus ursinus*, un autre marsupial) suggère que le fractionnement isotopique du Ca lors de la formation du lait des marsupiaux pourrait être analogue à celui décrit chez les mammifères placentaires, puisque des différences inter-sexes de composition isotopique du Ca de l'émail dentaire ont été rapportées chez ces animaux (Koutamanis et al., 2021). Cette étude documente notamment le cas d'une femelle morte pendant un allaitement et présentant des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  élevées dans l'émail (l'émail de ces animaux croît continuellement), ce qui suggère là aussi que la lactation pourrait avoir un effet comparable chez les différents groupes de mammifères. Le fait que cette étude porte sur l'émail dentaire des wombats, et non pas l'os, n'est toutefois pas anodin. En effet, la composition isotopique du Ca d'émail dentaire en formation est beaucoup plus dynamique que celle de l'os, puisque chaque nouvelle couche d'émail qui minéralise a une composition isotopique qui dérive de celle du sang au moment de la minéralisation. À l'opposé, l'os reminéralise lentement et sa composition isotopique aura donc beaucoup plus d'inertie vis-à-vis des changements de composition isotopique du sang que l'émail en formation. Or, les wallabys de l'île Eugène possèdent aussi des incisives à croissance continue qui pourraient constituer un support de choix pour enregistrer des différences inter-sexes de composition isotopique du Ca. Cette stratégie pourrait donc s'avérer être plus adaptée que les études sur l'os si l'absence de différences inter-sexes de composition isotopique du Ca dans l'os découle bien de durée de lactation ou de phase P3 trop courts pour affecter l'os. Dans l'optique de fournir plus d'éléments de réponse sur la question du fractionnement isotopique lait-sang du Ca, des analyses de lait de marsupiaux ont aussi été menées et sont discutées en section IV.D.4.

### 3. Les monotrèmes

#### a) Introduction

L'échidné à nez court (*Tachyglossus aculeatus*) est l'une des cinq espèces actuelles de l'ordre des monotrèmes, au même titre que l'ornithorynque. Cette espèce se retrouve essentiellement en Australie, tandis que les trois autres espèces actuelles de la famille des tachyglossidés (communément

appelées échidnés à long nez) sont présentes exclusivement en Nouvelle-Guinée. Cet animal est atypique sous bien des aspects. Doté d'épines kératinisées qui complètent dorsalement sa fourrure, il adopte un régime alimentaire insectivore et vit de manière solitaire en dehors des périodes de reproduction. Pour se nourrir, l'échidné à nez court vise principalement les fourmilières et les termitières qu'il est capable de creuser et sur lesquelles il chasse grâce à sa langue vermiforme et collante à l'extrémité (Griffiths, 1978 ; Burke et al., 2002). La mâchoire de l'échidné est dépourvue de dents et la mastication des insectes se fait par l'intermédiaire de la langue et d'épines kératinisées présentes à la base de cet organe (Griffiths, 1978). Les échidnés, et les monotrèmes en général, sont une source inestimable d'informations concernant l'évolution des mammifères. D'une part, parce que ce sont les mammifères actuels avec qui les thériens (i.e. marsupiaux et placentaires) partagent l'ancêtre commun le plus lointain (Oftedal, 2002a, 2020 ; Luo, 2007 ; Weisbecker et Beck, 2015 ; Zhou et al., 2021), et d'autre part parce les monotrèmes possèdent une physiologie qui les rapproche vraisemblablement de celle des premiers mammifères. On constate en effet que les monotrèmes ont un taux métabolique et une température corporelle de repos plus bas que les autres mammifères actuels (Schmid et al., 2003 ; Nicol et Andersen, 2007 ; Grigg et al., 2015). De plus, les monotrèmes pondent des œufs dépourvus de coquille calcifiée (i.e. mode de reproduction ovipare), une caractéristique qui constitue la condition primitive des mammifères (Griffiths, 1978 ; Oftedal, 2002a, 2020 ; Morrow et Nicol, 2012 ; Thomas et al., 2020). Dans le cas de l'échidné, un œuf unique est pondu après environ 20 à 25 jours de gestation, puis incubé dans une poche ventrale pendant une dizaine de jours avant d'éclore (Griffiths, 1978 ; Morrow et Nicol, 2012 ; Morrow et al., 2017). S'ensuit une période d'allaitement où le juvénile reste d'abord plusieurs semaines dans la poche maternelle, avant d'être laissé dans le terrier construit par la mère pour y être allaité périodiquement. La fréquence des visites de la mère pour allaiter le petit s'espace de plus en plus à mesure que le temps passe (Rismiller et McKelvey, 2003 ; Morrow et Nicol, 2012). La durée des excursions de la mère pour se nourrir peut aller de quelques heures à 4 jours dans les 60 jours suivant l'éclosion, et s'étale jusqu'à presque deux semaines peu avant le sevrage, lorsque le juvénile explore déjà fréquemment l'extérieur du terrier maternel (Rismiller et McKelvey, 2003 ; Morrow et Nicol, 2012). La durée de ces différentes phases de



fréquence d'allaitement est variable selon les sous-espèces d'échidnés et les provenances géographiques, mais l'âge de sevrage est généralement compris entre 130 et 160 jours après la naissance (Morrow et Nicol, 2012). À la lumière des quelques données parcellaires disponibles sur ces âges de sevrage, sur le temps moyen entre 2 pontes pour les femelles (plus de 3 ans en moyenne), l'âge moyen de primiparité (entre 5 et 12 ans) et leur espérance de vie (jusqu'à une cinquantaine d'années), on peut estimer que les femelles passent environ 10 % de leur vie à allaiter (Rismiller et McKelvey, 2003 ; Jones et al., 2009). Cette proportion est environ 2 fois inférieure à celle de la souris et 8 fois inférieure à celle du wallaby de l'île Eugène. À cet égard, notre modèle de formation des différences inter-sexes de composition isotopique du Ca des os prédit une faible amplitude voire une absence de ces différences chez l'échidné à nez court.

L'ornithorynque (*Ornithorhynchus anatinus*) est le seul autre représentant des monotrèmes actuels en dehors des échidnés. Présent uniquement dans les cours d'eau de la moitié est de l'Australie (incluant la Tasmanie), cet animal semi-aquatique combine un ensemble de traits particulièrement exotiques chez les mammifères actuels. L'ornithorynque est doté d'un bec semblable en apparence à celui d'un canard, composé d'os, de cartilage et de tissus épidermiques caoutchouteux. Ce bec est également le siège de cellules électro-réceptrices et mécano-réceptrices permettant la détection des invertébrés que l'ornithorynque chasse sous l'eau, dans le sédiment des rivières (Griffiths, 1978). Dans le bec de l'adulte, la mâchoire est dépourvue de dents, ces dernières n'étant présentes que chez les juvéniles mais remplacées par des plaques kératinisées au cours de la croissance (Griffiths, 1978). Les mâles adultes possèdent un aiguillon kératinisé connecté à une glande à venin, situé à la base de la patte arrière (Griffiths, 1978). Les mâles peuvent l'utiliser pour se défendre contre des prédateurs, mais l'utilisent le plus souvent lors de combats avec d'autres mâles ornithorynques (Griffiths, 1978). Enfin, comme évoqué précédemment, cet animal pond des œufs puis allaite ses petits. Durant la période de reproduction (fin de l'hiver, début du printemps), la femelle ornithorynque creuse des terriers dans les berges des rivières dans lesquels elle aménage un nid sous-terrain où elle déposera ses œufs (de 1 à 3 par femelle) après une période de gestation de 13 à 23 jours (Griffiths, 1978 ; Grant et al., 2004 ; Thomas et al., 2020). Le détail des comportements maternels de l'ornithorynque dans le nid n'a pu

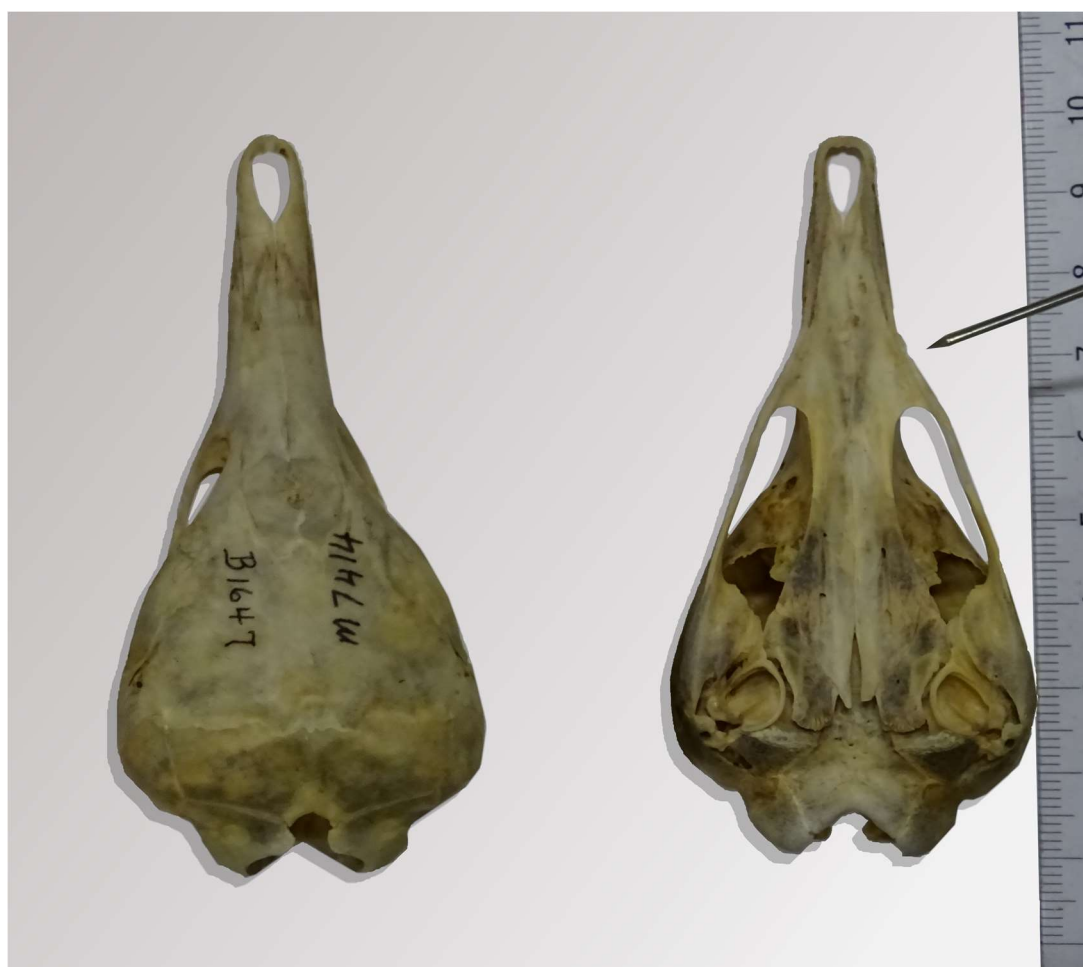
être documenté que très récemment, grâce au succès de programmes de reproduction en captivité (Thomas et al., 2020). Les œufs sont incubés par la mère durant 10 à 12 jours durant lesquels elle quitte périodiquement le nid pendant plusieurs heures pour se nourrir (Thomas et al., 2020). Après l'éclosion, la durée de la période complète d'allaitement des juvéniles est de l'ordre de 132 jours en captivité et comprise entre 3 et 4 mois dans la nature (Grant et al., 2004 ; Thomas et al., 2020). Compte tenu de cet âge de sevrage, des âges auxquels les femelles se reproduisent (entre 2 et 16 ans) et du temps moyen séparant les portées (1 à 2 ans), on peut estimer qu'une femelle ornithorynque passe 15 à 30 % de sa vie à allaiter (Grant et al., 2004 ; Jones et al., 2009 ; Thomas et al., 2020). Cette fraction de temps consacrée à l'allaitement fait donc théoriquement de l'ornithorynque un meilleur candidat que l'échidné pour enregistrer des différences inter-sexes de composition isotopique du Ca dans les os issues de la lactation.

Contrairement aux marsupiaux chez qui il est possible d'observer des phases de production de lait avec des compositions lipidiques, glucidiques et protéiniques différentes (i.e. phases P2 et P3), la littérature ne renseigne pas de telles phases chez les monotrèmes (Griffiths et al., 1984 ; Stannard et al., 2020). Il a toutefois été noté que le lait pouvait être relativement dilué au début de la lactation (12 % de masse solide pour l'échidné à nez court et 8 % pour l'ornithorynque : Griffiths et al., 1969 ; Rant et al., 1983 ; Stannard et al., 2020), mais particulièrement concentré en dehors de cette phase précoce de durée indéterminée (48,9 % de masse solide pour l'échidné à nez court et 39,1 % pour l'ornithorynque : Griffiths et al., 1984 ; Stannard et al., 2020). En outre, contrairement au wallaby de l'île Eugène chez qui l'essentiel de la croissance du jeune a lieu lors de la phase terminale (P3) de la lactation, les échidnés ont une croissance plutôt linéaire et constante au cours de l'allaitement (Rismiller et McKelvey, 2003), et les ornithorynques ont quant à eux une croissance qui s'organise en une phase linéaire de croissance rapide pendant les 20 premiers jours après la naissance puis une phase plus lente durant le reste du développement du juvénile (Manger et al., 1998 ; Thomas et al., 2020). À l'exception des phases précoces de la lactation où le lait est très dilué, il est donc raisonnable d'imaginer que la production de lait et l'excrétion de Ca qui l'accompagne restent relativement importantes tout au long

de la lactation chez les monotrèmes. Dans cette hypothèse, les changements de compositions isotopiques du sang résultant de la lactation peuvent donc se manifester pendant toute cette période.

b) Matériel et méthodes

Les spécimens de monotrèmes dont j'ai étudié la composition isotopique du Ca des os proviennent des collections du Western Australian Museum de Perth dans le cas des échidnés (9 mâles et 9 femelles adultes) et des collections du Queensland Museum de Brisbane dans le cas des ornithorynques (8 mâles et 10 femelles adultes). L'origine géographique et temporelle de ces spécimens est très variée. Les échidnés proviennent de divers endroits d'Australie-Occidentale, tandis que les spécimens d'ornithorynques sont originaires du Queensland et du nord de la Nouvelle-Galles du Sud, bien que la majorité d'entre eux proviennent d'un périmètre de 100 km autour de Brisbane. Les spécimens des



**Figure IV.4 – Photo (éditée) d'un crâne d'échidné à nez court (*Tachyglossus aculeatus*). À gauche le crâne est en vue dorsale (avant prélèvement), à droite il est en vue ventrale (post-prélèvement). La pointe métallique indique la zone de prélèvement. Photo (edited) of the skull of a short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus*). The left photo represents the skull in dorsal view (before the sampling), the right photo represents the skull in ventral view (post-sampling). The metal point indicates the sampling zone.**

deux espèces font partie de collections constituées au cours du siècle dernier. L'essentiel de ces spécimens a été préservé sous la forme de crânes parfois associés au reste du squelette, à l'exception d'une partie importante des ornithorynques (n = 13) qui étaient conservés entiers (i.e. os, peau, tissus mous, fourrure) dans de l'alcool après fixation au formaldéhyde. Les prélèvements d'os que j'ai réalisés sur ces différents spécimens (entre 0,5 et 1 mg) ont été effectués à l'aide d'une foreuse Dremel® équipée d'un foret en carbure de tungstène. Concernant les échidnés, la zone prélevée était située sur le crâne, à la base du museau (figure IV.4). Les prélèvements sur les ornithorynques ont quant à eux été réalisés au niveau de l'encoche située sous le foramen infra-orbitaire pour le cas des crânes conservés sous forme de squelettes secs (figure IV.5), et au niveau du tibia pour les spécimens conservés dans l'alcool (après dissection). La poudre d'os obtenue a subi un traitement et des analyses de composition isotopique du Ca équivalentes à la procédure décrite dans le chapitre II, avec l'assistance du Wollongong Isotope Geochronology Laboratory (WIGL, News South Wales).



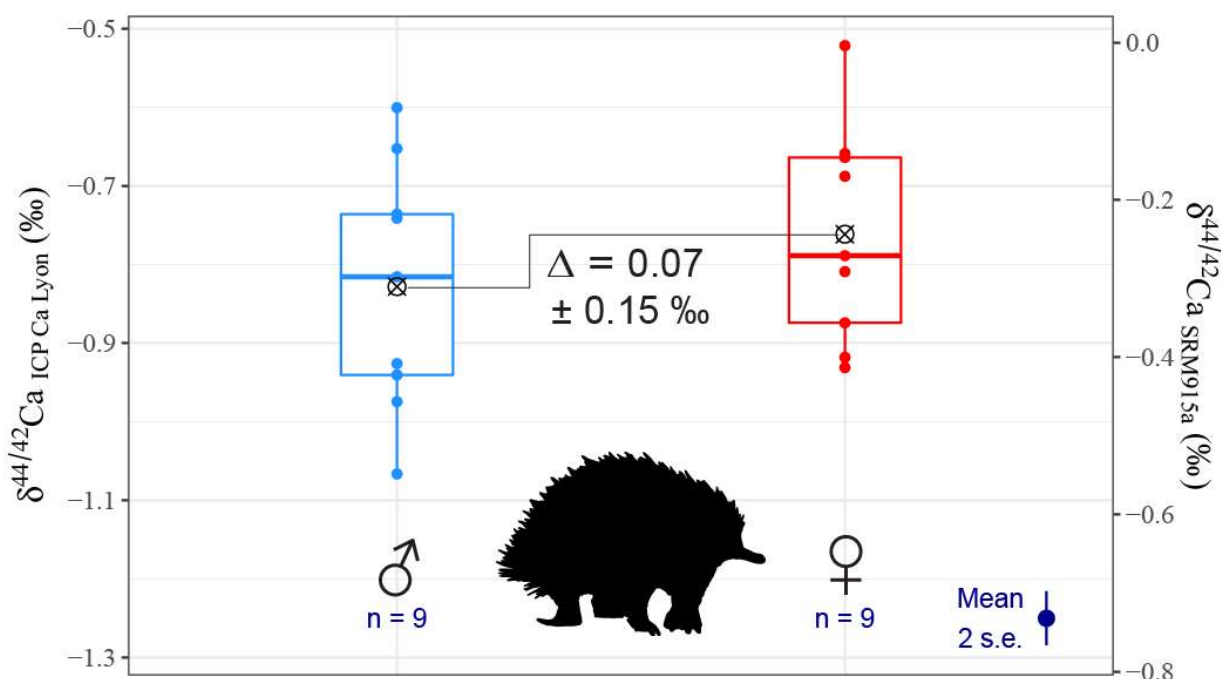
**Figure IV.5 – Photo (éditée) post-prélèvement d'un crâne d'ornithorynque (*Ornithorhynchus anatinus*).** La pointe métallique indique la zone de prélèvement. **Post-sampling photo (edited) of the skull of a platypus (*Ornithorhynchus anatinus*).** The metal point indicates the sampling zone.

c) Résultats et discussion

Les résultats de ces analyses sont synthétisés dans les figures IV.6 et IV.7. En terme de différence inter-sexes de composition isotopique du Ca de l'os, les résultats des analyses sur les échidnés sont plutôt conformes aux prédictions du modèle. En effet, les différences isotopiques sont de petite amplitude entre les sexes, avec trop de variabilité intra-sexe (toutefois dans la gamme de ce qui est classiquement observé chez les mammifères) pour que cette différence soit réellement significative.

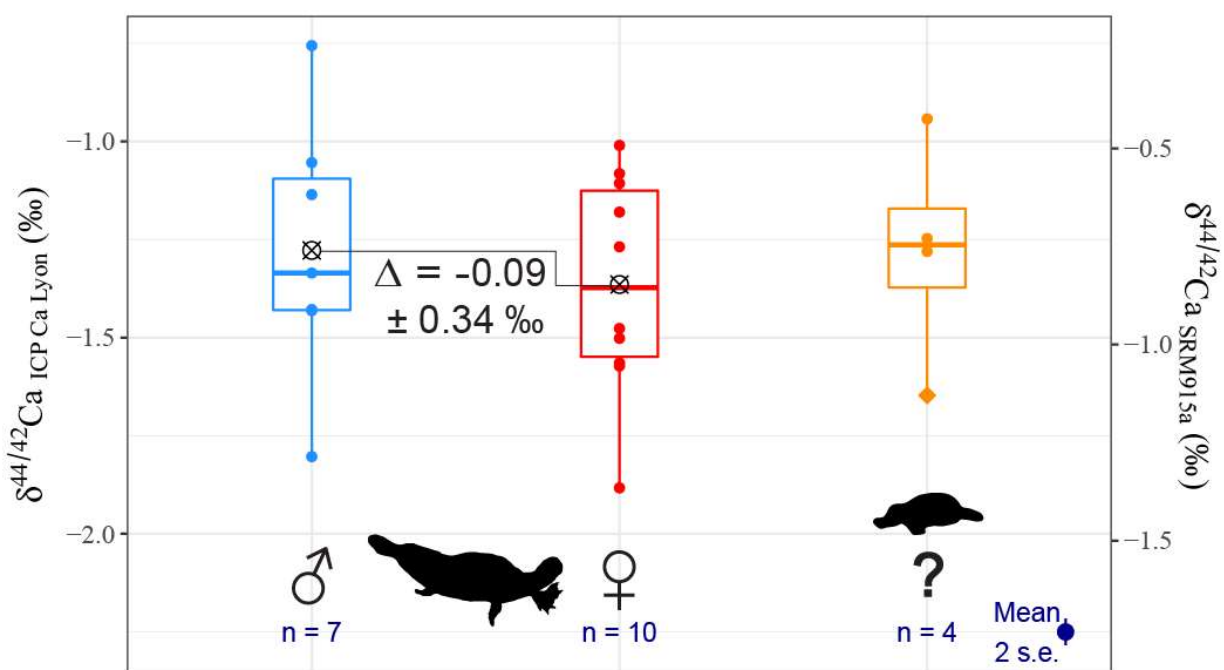
Les résultats concernant l'ornithorynque sont en revanche tout à fait inédits. La gamme des compositions isotopiques du Ca de l'os que révèlent ces analyses dépasse de loin la dispersion intra-spécifique des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  d'os ou d'email généralement documentées. À titre d'exemple, avec ce 1,13 ‰ d'écart relevé entre les valeurs maximales et minimales de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  du jeu de données, cette gamme intra-spécifique dépasse même l'étendue de la gamme interspécifique totale de certaines faunes (e.g. environ 1 ‰ pour les faunes décrites dans Martin et al., 2018). La seule espèce faisant preuve d'une telle variabilité isotopique intra-spécifique jusqu'ici est l'espèce humaine (e.g. Tacail et al., 2021), variabilité qui s'explique notamment par notre dispersion géographique mondiale et la diversité de nos régimes alimentaires, ce qui est donc peu comparable avec l'ornithorynque. De part cette variation, aucune différence isotopique réellement significative ne peut être identifiée entre les sexes chez l'ornithorynque ( $\Delta = -0,09 \pm 0,34$  ‰). C'est d'ailleurs également le cas entre classes d'âges puisque les juvéniles présentent des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  qui se confondent avec celles des adultes (figure IV.7). Ce jeu de données n'est pas construit sur la base d'une population homogène en termes d'origine géographique et temporelle. Or, la variabilité géographique participe probablement à une partie de l'étendue de cette gamme (l'ornithorynque le plus enrichi en  $^{44}\text{Ca}$  est le seul provenant de Nouvelle-Galles du Sud). Toutefois, les facteurs géographiques ne permettent pas d'expliquer une part importante de la variabilité de ces compositions isotopiques. Par exemple, les spécimens provenant de zones géographiques restreintes telle que la périphérie ouest de Brisbane (40 km<sup>2</sup> de système hydrographique contiguë, n = 6 spécimens) ont eux aussi une gamme étendue de valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'os (entre -1,80 et -1,08 ‰). En outre, les compositions isotopiques du Ca de l'os et les dates d'intégration des spécimens dans les collections ne sont pas corrélées en apparence. C'est également

le cas du mode de conservation de ces spécimens. En effet, la gamme des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  des échantillons d'os sec (de -1,80 à -1,05 ‰, n = 7) s'intègre entièrement dans celle des échantillons conservés dans l'alcool après fixation par du formaldéhyde (de -1,88 à -0,76 ‰, n = 13). Une autre source de variabilité isotopique intervient donc ici. Les hypothèses que l'on peut formuler pour expliquer ce phénomène sont à la fois écologiques, physiologiques et environnementales. Le régime alimentaire de l'ornithorynque est composé essentiellement d'invertébrés vivants dans le substrat au fond des rivières (Klamt et al., 2016). Il est possible que ces proies constituent des sources avec des compositions isotopiques du Ca différentes. Toutefois, si aucune étude des compositions isotopiques du Ca des écosystèmes d'eaux douces n'a encore été publiée à ce jour, il semble peu probable que ces différences isotopiques entre invertébrés puissent être assez importantes pour expliquer les différences isotopiques intraspécifiques de l'ornithorynque.



**Figure IV.6 – Composition isotopique du Ca des os d’une population d’échidnés à nez court (*Tachyglossus aculeatus*).** Le repère noir barré au centre des boxplots indique la moyenne par sexe des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l’os. L’incertitude autour de la différence  $\Delta$  entre ces moyennes correspond à l’intervalle de confiance à 95 % autour de cette différence (calculé par t-test, variante de Welch). La droite au centre des boxplots marque la médiane, les boîtes sont limitées par les premiers et troisièmes quartiles, et les moustaches s’étendent jusqu’aux données les plus distantes de la médiane (dans la limite de 1,5 fois la distance interquartiles). **Bone Ca isotopic composition of a short-beaked echidna population (*Tachyglossus aculeatus*).** The crossed cue point in each boxplot indicates the mean bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of males and females. The uncertainty range given for the  $\Delta$  difference between these means is the 95 % confidence interval of this difference calculated from a t-test (Welch’s test variant). The line in the center of boxplots represents the median, while boxes are limited by the first and third quartiles. Whiskers extend up to the farthest data points from the median, in the limit of 1.5 times the interquartile distance.

Du point de vue physiologique, aucun trait de l'ornithorynque ne semble pouvoir expliquer une telle variabilité isotopique entre individus. Sur la base des connaissances actuelles sur le cycle isotopique du Ca dans l'organisme, des changements dans la manière d'excréter le Ca (par voie urinaire par exemple) pourraient être de bons candidats pour générer des effets isotopiques importants (voir chapitre III). Toutefois, ceci impliquerait des différences physiologiques notables concernant ce trait à l'échelle des individus de cette espèce, ce qu'aucune observation ne soutient pour le moment. La thèse environnementale est également assez peu étayée sur la bases des informations disponibles. En effet, la gamme de variabilité des compositions isotopiques des rivières demeure assez restreinte (Schmitt, 2016) et, si les lacs sont capables de présenter une large gamme de compositions isotopiques du Ca,



**Figure IV.7 – Composition isotopique du Ca des os d’une population d’ornithorynques (*Ornithorhynchus anatinus*).** La composition isotopique du Ca des os des individus adultes est représentée à gauche en rouge et bleu. Les juvéniles de sexe indéterminé sont représentés en orange à droite. Le losange représente une donnée d’émail dentaire. Le repère noir barré au centre des boxplots des adultes indique la moyenne par sexe des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l’os. L’incertitude autour de la différence  $\Delta$  entre ces moyennes correspond à l’intervalle de confiance à 95 % autour de cette différence (calculé par t-test, variante de Welch). La droite au centre des boxplots marque la médiane, les boîtes sont limitées par les premiers et troisièmes quartiles, et les moustaches s’étendent jusqu’aux données les plus distantes de la médiane (dans la limite de 1,5 fois la distance interquartiles). **Bone Ca isotopic composition of a platypus population (*Ornithorhynchus anatinus*).** The bone Ca isotopic compositions of adult specimens are identified by the red and blue color on the left side of the graph. Juvenile individuals of unknown sex are represented in orange on the right side of the graph. The diamond represents an enamel data. The crossed cue point in each boxplot indicates the mean bone  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of males and females. The uncertainty range given for the  $\Delta$  difference between these means is the 95 % confidence interval of this difference calculated from a t-test (Welch’s test variant). The line in the center of boxplots represents the median, while boxes are limited by the first and third quartiles. Whiskers extend up to the farthest data points from the median, in the limit of 1.5 times the interquartile distance.

ces derniers tendent plutôt à tirer les valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  vers le haut (au-delà des valeurs positives de l'eau de mer : Schmitt, 2016). Or, les ornithorynques se caractérisent par des compositions isotopiques du Ca de l'os relativement appauvries en isotopes lourds du Ca (figure IV.7), ce qui semble donc peu compatible avec une influence lacustre particulière. Une dernière hypothèse serait d'envisager une influence anthropique capable de modifier localement et/ou temporellement la composition isotopique des sources de Ca des ornithorynques, ou d'affecter le métabolisme de ces derniers de manière à modifier la composition isotopique de leurs os. Le traitement de certaines zones de l'habitat de l'ornithorynque avec de la poudre d'apatite (une méthode utilisée dans le contrôle des pollutions au plomb) pourrait par exemple être un moyen de modifier la composition isotopique du Ca de leur environnement. Cependant, à ma connaissance, aucune archive ne rapporte le recours à une telle méthode dans les zones concernées. Ainsi, si la lactation a bel et bien un effet sur la composition isotopique du Ca du sang et des os des femelles ornithorynques, l'amplitude théorique de cet effet est bien inférieure aux autres variations isotopiques induites chez cet animal. La cause de cette impressionnante variabilité isotopique demeure donc pour le moment un mystère et appelle de futurs projets d'étude visant à comprendre ce phénomène.

#### 4. Le fractionnement isotopique du Ca entre sang et lait

##### a) Introduction

Les résultats obtenus jusqu'ici sur le wallaby de l'île Eugène, l'échidné à nez court et l'ornithorynque ne permettent pas de mettre en lumière de différences inter-sexes de composition isotopique du Ca de l'os. En faisant l'hypothèse que chez ces espèces un fractionnement isotopique du Ca a bien lieu entre le sang et le lait lors de la production de ce dernier (de manière analogue à ce qui est constaté chez les placentaires), l'absence de ces différences inter-sexes chez l'échidné s'intègre plutôt bien dans le modèle de formation de ces différences (chapitre III). En effet, le peu de temps qu'une femelle échidné passe à allaiter au cours de sa vie (section IV.D.3) rend les changements de composition isotopique du Ca du sang trop courts pour pouvoir impacter significativement le Ca de l'os. Par ailleurs, la composition isotopique du Ca des os des ornithorynques est bien trop variable pour que des



différences isotopiques entre mâles et femelles (de l'ordre de ce qui a pu être rapporté chez d'autres mammifères) puissent être remarquables à l'échelle du jeu de données présenté ici. Enfin, l'absence de ces différences isotopiques chez le wallaby de l'île Eugène pose également question. En effet, les femelles de cette espèce peuvent théoriquement passer une large fraction de leur vie à allaiter (section IV.D.2), et la population étudiée ne connaît pas de dispersion intra-sexe importante des compositions isotopiques du Ca de l'os qui aurait pu masquer des différences inter-sexes (c'est même plutôt le contraire, voir figure IV.3). Les hypothèses énoncées en section IV.D.2 pour expliquer l'absence de différences isotopiques chez la population étudiée avancent que les femelles de cette population ont en réalité moins allaité que ce qui est théoriquement possible chez cette espèce (à cause de la mort des juvéniles en période de sécheresse par exemple), et que seule la phase terminale de la lactation (P3) affecte fortement la composition isotopique du sang (i.e. production de lait et croissance du juvénile plus faibles durant les phases P2). Toutefois, on peut également se demander si l'absence apparente de différences inter-sexes de composition isotopique du Ca des os de ces espèces ne découle pas aussi d'une absence de fractionnement isotopique entre le sang et le lait au cours de la lactation. En effet, dans le modèle actuel avancé pour expliquer les différences isotopiques entre mâles et femelles de même espèce (chapitre III), l'un des paramètres essentiels est l'existence d'un fractionnement isotopique du Ca entre le sang et le lait au cours de la formation de ce dernier. En outre, la question se pose aussi de savoir si ce fractionnement isotopique peut changer au cours de la lactation d'un même individu, particulièrement dans le contexte de la lactation polyphasée du wallaby de l'île Eugène. Afin d'approfondir ces questions, j'ai complété les données d'os présentées dans les sections précédentes par des données de lait provenant de ces trois espèces.

#### b) Matériel et méthodes

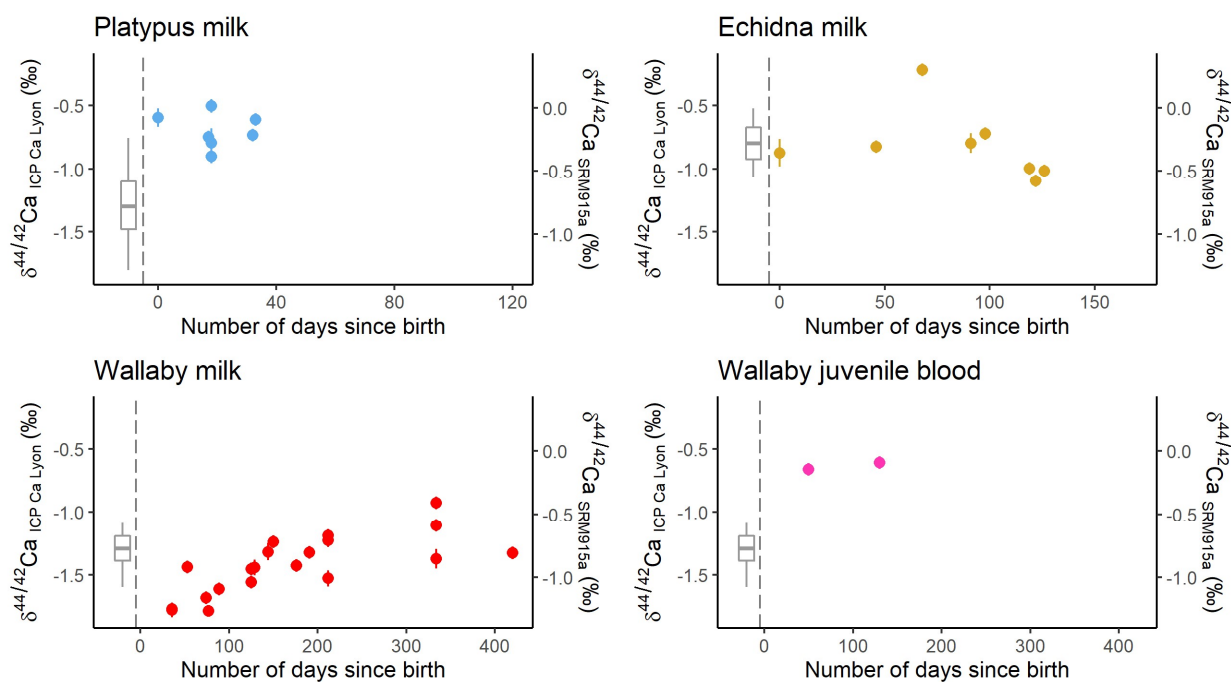
Il n'a pas été possible d'obtenir du lait de populations de même provenance géographique que celles du jeu de données d'os, ni d'échantillons de sang des individus dont proviennent les échantillons de lait. Le lait de wallaby de l'île Eugène est issu d'une population élevée en captivité à proximité de Melbourne et dont les premiers individus étaient originaires de l'île de Kangaroo Island en Australie-Méridionale (les os discutés en section IV.D.2 provenaient de l'île de Garden Island en Australie-

occidentale). Le lait d'échidné est quant à lui issu de spécimens de Tasmanie (les os discutés en section IV.D.3 provenaient d'Australie-occidentale), tandis que le lait d'ornithorynque a été collecté sur des spécimens de Nouvelle-Galles du Sud (les os discutés en section IV.D.3 provenaient essentiellement du Queensland). Ces échantillons de lait ont pu être obtenus grâce à la collaboration de Julie Sharp (Deakin university, Geelong, Victoria), qui m'a permis de prélever les quelques centaines de  $\mu\text{l}$  de lait nécessaires aux analyses de composition isotopiques du Ca à partir de réserves constituées par son équipe lors d'études antérieures. Ces échantillons de lait ont été prélevés à différents moments au cours de la lactation des animaux, après l'injection d'oxytocine chez les individus (une hormone qui déclenche l'éjection du lait chez les mammifères). Deux échantillons de sang de wallaby de l'île Eugène juvéniles ont également été collectés dans ce contexte. Ces échantillons ont subi un traitement et des analyses de composition isotopique du Ca équivalentes à la procédure décrite dans le chapitre II, avec l'assistance du Wollongong Isotope Geochronology Laboratory (WIGL, News South Wales).

#### c) Résultats et discussion

Les résultats de ces analyses sont présentés en figure IV.8. Les comparaisons que l'on peut faire entre les os et le lait au sein de ces trois espèces ne suggèrent pas que le lait de ces animaux possède une composition isotopique du Ca appauvrie en isotopes lourds (i.e. valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  plus basses) par rapport aux os des adultes (comme c'est généralement le cas chez les mammifères). Ces résultats suggèreraient ainsi que le Ca du lait de ces animaux subit peu de fractionnement isotopique lors de sa formation à partir du Ca du sang. Or, cela signifierait que la lactation est peu susceptible d'affecter la composition isotopique du sang de ces animaux et donc de générer des différences inter-sexes de composition isotopique du Ca de l'os. Toutefois, plusieurs points limitent les conclusions qu'il est possible de tirer de ce jeu de données. Tout d'abord, il faut souligner que les populations dont nous avons étudié les os sont très différentes de celles dont nous avons étudié le lait. Toutes proviennent de localités différentes, séparées de 500 à plus de 3000 km, et sont constituées de sous-espèces différentes dans le cas des wallabys et des échidnés (os de wallaby : *Macropus eugenii derbianus*, lait de wallaby : *Macropus eugenii decres* ; os d'échidné : *Tachyglossus aculeatus acanthion*, lait d'échidné : *Tachyglossus aculeatus setosus*). Il est donc probable que la composition isotopique

moyenne du Ca du sang des individus des populations concernées soit différente (e.g. parce que les populations ont une alimentation avec une composition isotopique du Ca différente), ce qui limite les comparaisons qui peuvent être faites entre le lait et les os de ce jeu de données. L'identification d'un fractionnement isotopique du Ca à la formation du lait est particulièrement délicate dans le cas de l'ornithorynque compte tenu de la variabilité isotopique intra-sexe rapportée pour l'os. On notera par ailleurs que si le lait de ces ornithorynques originaires du sud de Nouvelle-Galles du Sud semble relativement enrichi en isotopes lourds du Ca (i.e. valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  relativement élevées), la composition isotopique de ces laits n'est pas si éloignée du seul spécimen de Nouvelle-Galles du Sud dont nous avons analysé l'os ( $\delta^{44/42}\text{Ca} = -0,76 \pm 0,03 \text{ ‰}$ , 2 s.e.). Toutefois, même dans ce cas, les spécimens restent séparés de près de 700 km, ce qui limite là aussi les comparaisons possibles. Enfin, se baser sur des données d'os pour essayer d'estimer des fractionnements entre le sang et le lait est



**Figure IV.8 – Composition isotopique du Ca du lait de monotrèmes (*Ornithorhynchus anatinus* et *Tachyglossus aculeatus*), de marsupiaux ainsi que de sang de marsupiaux juvéniles (*Macropus eugenii*). Les barres d'erreur autour de chaque point correspondent au 2 s.e. des mesures avec un intervalle de confiance minimum fixé à 0,05 ‰. Le boxplot à gauche de chaque graphique représente les données de composition isotopique du Ca documentées pour les os d'adultes de ces espèces et discutées dans les sections précédentes de ce sous-chapitre. Les échantillons à l'origine de ces données sont de provenances géographiques diverses, y compris au sein des espèces. **Monotreme (*Ornithorhynchus anatinus*, *Tachyglossus aculeatus*) and marsupial milk Ca isotopic compositions with the addition of blood Ca isotopic compositions of juvenile marsupials (*Macropus eugenii*).** Error bars are equal to the 2 s.e. of the measures, with a minimum confidence interval established at 0.05 ‰. The boxplot at the left of each graph represents adult marsupials and monotremes bone Ca isotopic compositions discussed in the previous sub-sections of this chapter. Samples from this dataset are from different geographical origins, including within species groups.**

un exercice périlleux. D'une part, parce que l'amplitude du fractionnement isotopique qui a lieu entre le sang et l'os est un sujet encore débattu (Tacail, 2017 ; Tacail et al., 2020 ; voir également chapitres III et IV.B), et d'autre part parce que la composition isotopique de l'os est bien moins dynamique que celle du sang. De part ce fait, la composition de l'os peut dériver des compositions isotopiques de sangs de différentes périodes qui n'avaient pas nécessairement la même composition isotopique qu'au moment de la lactation. En outre, les conditions de prélèvement de lait posent aussi question. La collecte du lait passe en effet classiquement par l'injection d'oxytocine chez ces espèces. Or, aucune étude n'a été menée à ce jour pour déterminer si cette hormone pouvait modifier la composition isotopique du Ca du lait en déclenchant son expulsion. Il a par contre été montré que cette hormone agissait sur la compression des cellules excrétrices de lait et augmentait la perméabilité des jonctions serrées de ces cellules (Moore et al., 1987 ; Nguyen et Neville, 1998). Ces effets peuvent favoriser les échanges de Ca entre le milieu extracellulaire et le lait et donc techniquement participer à limiter les fractionnements isotopiques lait-sang. Pour résoudre la question du fractionnement isotopique lait-sang du Ca de manière non ambiguë, il serait donc nécessaire de mener des études où la composition isotopique du Ca du sang et du lait seraient analysées à partir de prélèvements réalisés de manière synchrone chez des femelles de ces espèces, et de tester si les effets de l'oxytocine sur la composition isotopique du Ca du lait sont réels ou non. Toutefois, l'identification récente de différences inter-sexes de composition isotopique du Ca de l'émail dentaire chez le wombat commun (*Vombatus ursinus*) suggère que le Ca des marsupiaux peut aussi subir un fractionnement isotopique lors de la lactation, de manière similaire à ce qu'on observe chez les placentaires (Koutamanis et al., 2021).

En comparant les molécules impliquées dans la production du lait chez les marsupiaux et les monotrèmes avec celles impliqués dans la lactation chez les mammifères placentaires, on peut s'interroger sur la probabilité que le fractionnement isotopique du Ca à la formation du lait soit analogue chez ces différents mammifères. Chez les placentaires, ce fractionnement semble jusqu'ici être du même ordre de grandeur pour différentes espèces ( $\Delta^{44/42}\text{Ca}_{\text{lait-sang}}$  compris entre -0,6 et -0,3 ‰ : chapitre III, Chu et al., 2006 ; Heuser, 2016 ; Tacail, 2017), bien que cette conclusion se base sur un nombre d'espèces relativement restreint (cochon, espèce humaine et animaux d'élevages laitiers).

Étant donné les similitudes fonctionnelles entre les protéines chargées de transporter le Ca dans le lait de tous les mammifères (les  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\kappa$ -caséines : Nicholas et al., 2012 ; Sharp et al., 2017 ; Oftedal, 2020 ; Stannard et al., 2020), la logique voudrait que les fractionnements isotopiques associés à la formation de ces molécules restent comparables. Cela ne constitue toutefois pas une preuve formelle, d'autant plus au regard de la diversité génétique des séquences codant ces caséines (Rijnkels, 2002 ; Rijnkels et al., 2003 ; Lemay et al., 2009 ; Oftedal, 2020 ; Stannard et al., 2020 ; Zhou et al., 2021). Par ailleurs, la machinerie cellulaire des glandes mammaires ayant jusqu'ici été peu étudiée en dehors des mammifères placentaires (Neville, 2006 ; Cross et al., 2014), il demeure difficile d'établir avec certitude si les protéines impliquées dans ces transports cellulaires de Ca sont les mêmes entre les différentes espèces de mammifères. Il serait par conséquent encore plus hasardeux de faire des suppositions sur l'homogénéité des fractionnements isotopiques du Ca associés à ces transports cellulaires. Dans l'état actuel des connaissances, il est donc difficile de juger de l'existence de différences de fractionnement isotopique du Ca à la formation du lait entre les monotrèmes, les marsupiaux et les placentaires. La solution la plus pertinente pour trancher la question de ce fractionnement isotopique du Ca à la formation du lait reste donc le recours à des prélèvements couplés de sang et de lait.

Si on laisse de côté les comparaisons os/lait pour se concentrer sur la variation des compositions isotopiques du Ca du lait au cours de la période de lactation, on constate une diminution des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  du lait des échidnés vers la fin de la période d'allaitement de ces derniers (figure IV.8). À l'inverse, on constate une augmentation des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  du lait des wallabys durant la phase P3 de la lactation de ces animaux (figure IV.8). Concernant l'ornithorynque, les deux tiers terminaux de la lactation ne sont malheureusement pas documentés par ce jeu de données, ce qui ne permet pas de discuter de ces variations isotopiques temporelles. Pour les wallabys, qui constituent le groupe pour lequel nous avons le plus de données, l'augmentation des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  du lait au cours de la lactation est compatible avec une augmentation de la quantité de Ca excrétée via le lait durant la phase P3. En effet, si un fractionnement isotopique du Ca similaire à celui des placentaires a bel et bien lieu lors de la production du lait par les marsupiaux (comme suggéré par les données d'émail chez le wombat : Koutamanis et al., 2021), le modèle décrit dans le chapitre III indique que plus la quantité de

Ca excrétée via le lait est importante, plus les valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  du sang augmentent. Or, un lait formé à partir d'un sang plus enrichi en isotopes lourds du Ca aura lui aussi des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  plus élevées. L'évolution des concentrations de Ca dans le lait au cours de la lactation a été décrite chez le kangourou roux (*Osphranter rufus*, un autre marsupial macropode), et suggère une diminution de la concentration en Ca dans le lait durant la phase terminale de lactation (Stannard et al., 2020). Il reste à confirmer que ceci se vérifie également pour le wallaby de l'île Eugène, mais si tel en est le cas, cette baisse de concentration en Ca pourrait potentiellement s'accompagner d'une diminution de l'intensité du fractionnement isotopique lait-sang en abaissant le gradient de concentration en Ca entre le liquide extracellulaire et le lait. Il faut noter que l'augmentation de la quantité de Ca exportée via le lait et la diminution de la concentration en Ca dans le lait ne sont pas incompatibles dans la mesure où la production de lait globale semble augmenter durant la phase P3 (Tyndale-Biscoe et al., 1988 ; Hendry et al., 1998 ; Sharp et al., 2017). Ces deux hypothèses ne tiennent toutefois que si un fractionnement isotopique notable du Ca existe entre le sang et le lait des marsupiaux, ce qui est compatible avec les premières données d'émail recueillies sur les wombats (Koutamanis et al., 2021), mais qui reste à confirmer par des analyses couplées sang-lait. Des hypothèses alternatives permettent aussi d'expliquer ces changements dans le lait sans impliquer de fractionnement isotopique du Ca lors de sa formation. Par exemple, étant donné que la composition isotopique du Ca de l'alimentation des individus dont proviennent les échantillons de lait n'a pas été contrôlée, il n'est pas impossible que les changements de composition isotopique du lait résultent de changements liés à l'alimentation des adultes. Enfin, en suivant les prédictions du modèle décrit dans le chapitre III pour les échidnés (i.e. en considérant que le fractionnement isotopique du Ca entre le sang et le lait des monotrèmes est comparable à celui décrit chez les mammifères placentaires), on peut interpréter la baisse des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  du lait durant le dernier tiers de la période comme la conséquence d'une diminution de la quantité de Ca excrété via le lait à cette période. Cette hypothèse est compatible avec la diminution de la fréquence des allaitements constatée chez la femelle à cette période (Rismiller et McKelvey, 2003 ; Morrow et Nicol, 2012). Toutefois, comme pour les wallabys, il est aussi tout à fait possible que ces

variations aient été générées par des changements de composition isotopique du Ca de l'alimentation des femelles durant l'allaitement.

Les deux données de composition isotopique du Ca du sang des juvéniles wallabys sont assez difficiles à réconcilier avec les données de composition de lait, malgré le fait qu'il s'agisse de prélèvements réalisés sur la même population de wallaby et à la même période. En effet, à l'époque des prélèvements, les juvéniles ne quittent pas encore la poche maternelle et on s'attendrait donc à trouver des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  dans leur sang qui seraient proches ou plus négatives que celles du lait maternel. Or, le sang de ces juvéniles présente des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  nettement supérieures à celles du lait collecté durant les mêmes dates post-parturition (de +0,88 à +0,91 ‰ environ). La représentativité des données de composition isotopique du Ca de laits collectés après injection d'oxytocine pose aussi question ici. Toutefois, d'autres hypothèses peuvent également être envisagées. La grande immaturité des juvéniles aux âges considérés (50 et 130 jours) peut notamment être un facteur important. En effet, contrairement aux juvéniles euthériens qui naissent généralement avec un système rénal relativement opérationnel, les reins des jeunes wallabys de l'île Eugène ne deviennent capables de générer des urines concentrées qu'entre le 110<sup>ème</sup> et le 140<sup>ème</sup> jour post-partum (Tyndale-Biscoe et al., 1988). La composition isotopique du Ca dans le sang étant particulièrement affectée par la dynamique de l'excrétion du Ca par les urines (Morgan et al., 2012 ; Channon et al., 2015 ; Tacail, 2017 ; Eisenhauer et al., 2019 ; voir aussi chapitre III), il est possible que les reins immatures de ces juvéniles (notamment dépourvus d'anse de Henle) les maintiennent à des valeurs sanguines de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  relativement élevées en excréant une proportion moindre de Ca lourd que chez un individu mature par les urines.

## 5. Conclusion et perspectives

Si les premières données faisant part de différences intra-spécifiques de composition isotopique du Ca entre mâles et femelles ont récemment été publiées chez les marsupiaux (dans l'émail dentaire de wombats : Koutamanis et al., 2021), il reste encore beaucoup de questions ouvertes concernant le cycle isotopique du Ca chez ces mammifères, tout comme chez les monotrèmes. Tout d'abord, il est

nécessaire de déterminer les causes exactes de l'absence de différences inter-sexes de composition isotopique du Ca dans les os lorsque le modèle en place suggère pourtant que de telles différences devraient exister. Le wallaby de l'île Eugène est au centre de cette question. Si des hypothèses écologiques et physiologiques peuvent être avancées pour l'expliquer (section IV.D.2), il semble nécessaire de mener à bien de nouvelles études pour identifier les causes réelles derrière ces divergences entre modèle et observations. Plusieurs pistes peuvent être envisagées. La piste principale concerne la réalisation d'études portant sur les ossements ou l'émail dentaire d'individus à l'historique de reproduction connu (en particulier l'historique des périodes d'allaitement des femelles), ainsi que l'analyse de prélèvements couplés lait-sang sur des individus allaitant (potentiellement associée à une étude menée sur les effets de l'oxytocine sur la composition isotopique du Ca du lait).

Les données acquises durant cette thèse soulignent le fait que les monotrèmes actuels ne sont pas de bons candidats pour enregistrer des différences inter-sexes de composition isotopique du Ca de l'os. Pour les échidnés il s'agit vraisemblablement d'une conséquence du peu de temps que les femelles passent à allaiter au cours de leur vie, tandis que pour les ornithorynques ce sont les variations intra-sexe de composition isotopique du Ca qui sont trop importantes pour permettre de détecter des différences inter-sexes. Toutefois, il est important de déterminer si des espèces fossiles qui seraient physiologiquement proches des monotrèmes, mais avec des traits d'histoire de vie différents, seraient susceptibles de présenter des différences inter-sexes de composition isotopique du Ca de l'os ou de l'émail (e.g. avec des périodes de lactation qui constituent une fraction importante de la vie des femelles et une absence de forte variabilités intra-sexe des compositions isotopiques du Ca). Les prélèvements couplés lait-sang auraient donc là aussi un intérêt tout particulier chez les monotrèmes, principalement pour porter l'étude des différences inter-sexes de composition isotopique du Ca des tissus minéralisés sur le fossile.

Indépendamment de l'existence de différences inter-sexes de composition isotopique du Ca des tissus minéralisés, l'impressionnante variabilité intra-sexe des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  des os des ornithorynques pose question. Il est crucial d'identifier les causes écologiques, physiologiques, environnementales ou anthropiques de cette variabilité isotopique, non seulement pour mieux comprendre cet animal et son



environnement, mais aussi et surtout pour déterminer si ce qui affecte la composition isotopique du Ca des tissus de l'ornithorynque est susceptible d'affecter d'autres animaux et lesquels. Plusieurs pistes d'études peuvent être envisagées ici. D'une part, l'étude de l'environnement de ces animaux et de leurs proies pourrait permettre d'identifier des causes environnementales, écologiques et/ou anthropiques. Ceci aurait l'avantage de contribuer également aux efforts de recherche déployés pour mieux comprendre les interactions entre cet animal et son écosystème (Klamt et al., 2016), ainsi que de mieux comprendre le cycle isotopique du Ca dans les écosystèmes d'eau douce, un domaine qui demeure encore peu étudié. Une autre manière d'envisager ces questions consisterait à se pencher sur des spécimens vivant en conditions contrôlées (e.g. en captivité) en comparant des données isotopiques collectées sur la nourriture de ces animaux et sur les animaux eux-mêmes (e.g. sang, urine). Toutefois, l'ornithorynque est un animal relativement exigeant en termes de conditions de captivité, et les possibilités d'étudier de tels spécimens sont relativement rares (Hawkins et Battaglia, 2009 ; Thomas et al., 2017, 2020). En outre, il faudrait mettre au point un protocole de collecte d'échantillons organiques qui puisse être adapté à cet animal en étant le moins invasif possible et en limitant les contaminations des échantillons par du Ca environnemental lors de la collecte, une procédure qui nécessiterait sans doute de surmonter plusieurs obstacles techniques.

### *E. Synthèse et discussion de fin de chapitre*

Les données présentées dans ce chapitre ont permis de faire avancer considérablement les connaissances sur la manifestation de différences inter-sexes de composition isotopique du Ca des os chez différentes espèces de mammifères. Si beaucoup de questions restent encore ouvertes concernant les marsupiaux et les monotrèmes (voir section précédente), les études pilotes menées au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence les défis propres à l'étude de ces animaux et de fournir des pistes pour des projets de recherche futurs destinés à mieux les comprendre. Une manière de souligner les cas d'études nécessitant plus d'investigations à l'avenir consiste à comparer les prédictions du modèle présenté dans le chapitre III avec les différences réelles de composition isotopique du Ca entre mâles et femelles de même espèce/population qui sont documentées dans ce chapitre IV et la littérature. Or, pour pouvoir réaliser des prédictions quantitatives fiables des

changements isotopiques de l'organisme lors de la lactation, le modèle décrit dans le chapitre III se base sur une littérature détaillée des flux de Ca du cochon domestique lors de la lactation, et sur une connaissance précise de la vie de ces animaux (e.g. durée de la lactation, durée séparant la naissance de deux portées). Ce genre d'informations détaillées n'est toutefois accessible que pour une poignée d'espèces (e.g. espèce humaine, animaux domestiques : Ramberg Jr et al., 1970 ; Specker et al., 1994 ; Giesemann et al., 1998 ; Kovacs, 2016). Une manière de contourner cette limite au prix de quelques approximations consiste à se contenter de prédictions grossières et non-quantitatives, en résumant la probabilité qu'une espèce a de manifester des différences inter-sexes de composition isotopique du Ca de l'os à une combinaison de données de traits d'histoire de vie clefs facilement accessibles dans la littérature.

Pour réaliser ces prédictions, on considèrera que le fractionnement isotopique du Ca entre le sang et le lait est du même ordre chez tous les mammifères (un point qui nécessite encore d'être éclairci mais qui est suggéré par une partie des données sur le sujet, voir section IV.D.4), et que la composition isotopique du Ca des os moyenne la succession des compositions isotopiques du sang de l'animal au cours de sa vie (affectée ou non d'un fractionnement isotopique à la minéralisation de l'os). Dans ce contexte, l'expression des différences inter-sexes de composition isotopique du Ca osseux devient surtout fonction de la fraction de temps qu'une femelle passe à allaiter au cours de sa vie ( $F_L$ ) et de l'effort de mobilisation de Ca déployé par la femelle pour la production du lait (i.e. la quantité de Ca excrétée via le lait au cours de la lactation normalisée aux autres flux de Ca entrant et sortant de l'organisme). Il est certain qu'en réalité d'autres facteurs tels que le temps séparant les périodes de lactation de la mort de l'animal, la dynamique des changements de flux de Ca associés à la lactation (e.g. urinaire, endogène) ou encore le taux de reminéralisation de l'os, modulent aussi les différences isotopiques inter-sexes du Ca dans l'os (voir chapitre III). Toutefois, on se contentera ici de ces deux seuls facteurs dans le but de pouvoir formuler des estimations pour beaucoup d'espèces de mammifères. Afin de représenter la fraction de temps qu'une femelle passe en lactation au cours de sa vie, on peut faire le calcul suivant :

$$F_L (\%) = \frac{\left( \frac{W_{age}}{IB_{length}}, \max : 100 \% \right) \times (L_{length} - Prim_{age} - ER_{age})}{L_{length}}$$

Où  $F_L$  est la fraction de temps qu'une femelle passe en lactation au cours de sa vie,  $W_{age}$  est l'âge de sevrage des juvéniles (pour weaning age),  $IB_{length}$  est la durée moyenne entre la naissance de deux portées (pour inter-birth length),  $L_{length}$  est la durée de la vie de l'animal (pour life length),  $Prim_{age}$  est l'âge de primiparité moyen de l'animal, et  $ER_{age}$  est l'âge auquel les femelles cessent de se reproduire (pour end reproduction age). Il est nécessaire de fixer le rapport  $W_{age}/IB_{length}$  à un maximum de 100 % pour les espèces ayant des temps moyens entre les naissances plus courts que les âges de sevrage (i.e. l'allaitement de deux portées successives se chevauche). Le wallaby de l'île Eugène fait notamment partie de ces espèces.

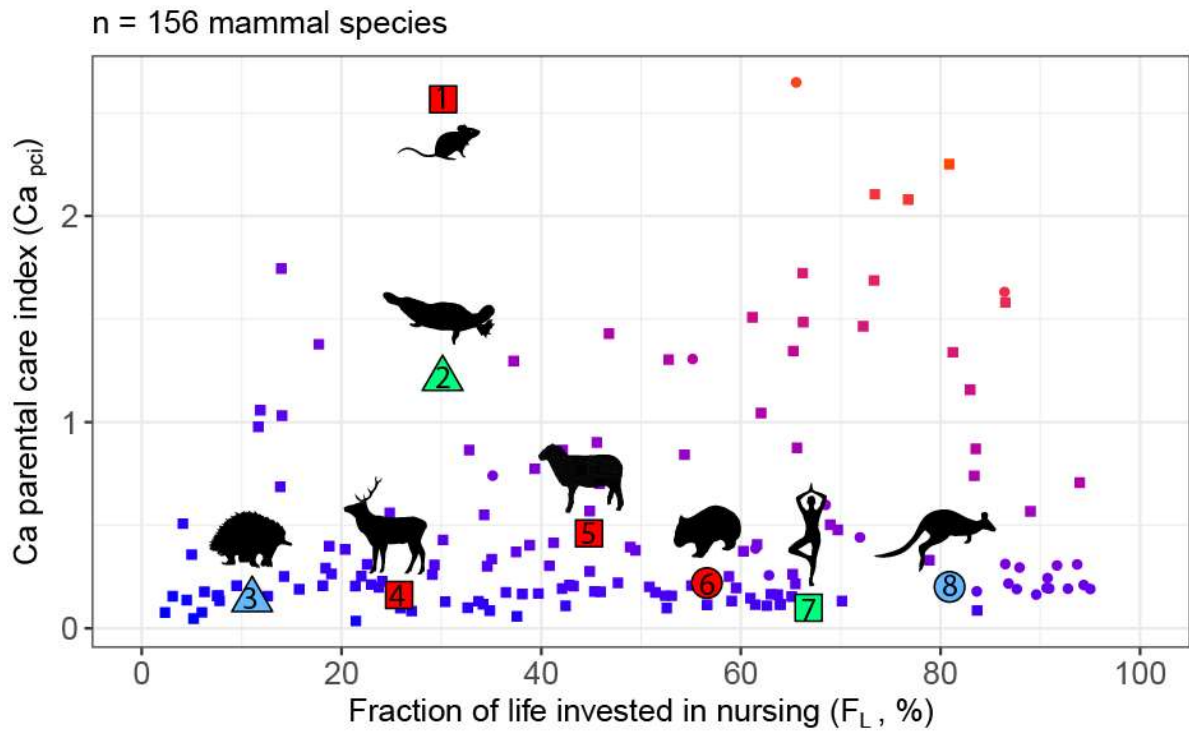
Pour estimer l'effort de mobilisation de Ca déployé par la femelle pour la production de lait chez les espèces pour qui ces flux de Ca ne sont pas documentés, on peut comparer le poids des juvéniles à la naissance avec le poids des juvéniles au moment du sevrage, et ainsi extraire le gain de masse des juvéniles pendant la lactation. La corrélation entre ce gain de masse des juvéniles et les quantités de lait produites par la femelle allaitante a été établie de manière assez fine chez certaines espèces (e.g. pour le cochon domestique : Etienne et al., 2000). Toutefois, même sans aller aussi loin, on peut considérer qu'au premier ordre ce gain de masse des juvéniles rapporté à la masse corporelle de l'adulte sera représentatif du degré d'effort de mobilisation de Ca fourni par la femelle pour allaiter ses petits. On peut matérialiser cette donnée sous la forme d'un indice baptisé « Ca parental care index » ( $Ca_{pci}$ ), calculé avec la formule suivante :

$$Ca_{pci} = \frac{(M_w - M_{nb}) \times LS}{M_{ad}}$$

Où  $M_w$  et  $M_{nb}$  sont respectivement la masse du juvénile au sevrage (pour weaning mass) et la masse du juvénile à la naissance (pour new born mass),  $LS$  est le nombre moyen de juvénile par portée, et  $M_{ad}$  est la masse corporelle de l'adulte. L'hypothèse qui sera faite ici est que la composition isotopique

du Ca du sang de la femelle allaitante sera d'autant plus affectée par la lactation que cet index sera élevé.

Grâce à la base de données PanTHERIA (Jones et al., 2009) complétée de données concernant les espèces étudiées dans ce chapitre IV (Mitchell et al., 1976 ; Leon Hughes et Hall, 1998 ; Manger et al., 1998 ; Rismiller et McKelvey, 2003 ; Ferrari et al., 2019 ; Thomas et al., 2020), il est possible de calculer  $F_L$  et  $Ca_{pci}$  pour près de 156 espèces de mammifères. Pour ce faire, il est néanmoins nécessaire de faire quelques approximations supplémentaires. Ainsi, les résultats présentés dans la figure IV.9 sont obtenus en considérant que la durée de vie d'une femelle est équivalente à la longévité maximum rapportée pour cette espèce (l'espérance de vie moyenne étant très dépendante de la population, cette donnée est rarement renseignée), que les femelles se reproduisent dès leur maturité sexuelle et jusqu'à leur mort, et que chaque cycle de reproduction permet l'allaitement complet jusqu'au sevrage d'un nombre de juvéniles correspondant à la taille moyenne des portées de l'espèce. Dans cette figure IV.9,  $F_L$  est donc largement surestimé par rapport à la fraction de temps que les femelles passent réellement à allaiter au cours de leur vie. Les valeurs de  $F_L$  présentées en figure IV.9 constituent donc plutôt un seuil maximum théorique qu'une donnée représentative de la réalité, ce paramètre étant très variable selon les populations et les individus. Les écarts entre les valeurs de  $F_L$  calculées et les valeurs de  $F_L$  réelles sont importants si l'écart entre l'espérance de vie moyenne des femelles et l'espérance de vie maximale de l'espèce est grand, si les causes d'interruption de la lactation sont fréquentes (e.g. mortalité juvénile) et si les femelles cessent de se reproduire longtemps avant l'âge de longévité maximum rapporté pour cette espèce (e.g. l'espèce humaine). En parallèle, les valeurs de  $Ca_{pci}$  sont moins représentatives de l'effort réel de mobilisation de Ca par la femelle pour la production du lait si les juvéniles de l'espèce concernée se nourrissent d'autre chose que de lait maternel dans des proportions importantes avec l'âge de sevrage complet.



**Figure IV.9 –  $Ca_{pci}$  et  $F_L$  de différentes espèces de mammifères.** Les carrés représentent des placentaires, les cercles des marsupiaux et les triangles des monotrèmes. Les espèces non-numérotées sont celles pour lesquelles l'existence de différences inter-sexes de composition isotopique du Ca des tissus minéralisés n'a pas encore été vérifiée expérimentalement. Plus la couleur de ces points tend vers l'orange (en haut à droite du graphique) et plus ces espèces sont a priori susceptibles de présenter ces différences isotopiques dans l'os. Les espèces numérotées sont celles chez qui l'existence de différences inter-sexes de composition isotopique du Ca des tissus minéralisés a pu être documentée. 1 : *Mus musculus*, 2 : *Ornithorhynchus anatinus*, 3 : *Tachyglossus aculeatus*, 4 : *Cervus elaphus*, 5 : *Ovis aries* (Reynard et al., 2010), 6 : *Vombatus ursinus* (Koutamanis et al., 2021), 7 : *Homo sapiens* (Reynard et al., 2013), 8 : *Macropus eugenii*. En rouge sont représentées les espèces chez qui ces différences isotopiques ont été détectées, et en bleu celles chez qui ces différences isotopiques n'ont pas été détectées. En vert sont représentées les espèces chez qui la variabilité intra-sexe des compositions isotopiques du Ca de l'os est trop importante pour permettre de détecter des différences inter-sexes de composition isotopique du Ca de l'os qui seraient issues de la lactation. Les données des 156 espèces de mammifères représentées ici sont issues de la base de données PanTHERIA (Jones et al., 2009), complétées de données de Mitchell et al., 1976 ; Leon Hughes et Hall, 1998 ; Manger et al., 1998 ; Rismiller et McKelvey, 2003 ; Ferrari et al., 2019 et Thomas et al., 2020.  $Ca_{pci}$  and  $F_L$  of different mammal species. Squares indicate placentals, circles marsupials and triangles monotremes. Unnumbered species are those for which the existence of inter-sex differences of Ca isotopic compositions in mineralized tissues has not yet been tested experimentally. The more these data points tend to be orange (top right of the graph) the more corresponding species should, in theory, exhibit these isotopic differences in bones. Numbered species are those for which the existence of these isotopic differences have been tested experimentally. 1 : *Mus musculus*, 2 : *Ornithorhynchus anatinus*, 3 : *Tachyglossus aculeatus*, 4 : *Cervus elaphus*, 5 : *Ovis aries* (Reynard et al., 2010), 6 : *Vombatus ursinus* (Koutamanis et al., 2021), 7 : *Homo sapiens* (Reynard et al., 2013), 8 : *Macropus eugenii*. Species for which these differences have been identified are in red, and those for which these differences have not been identified are in blue. Species in green represent those for which the intra-sex variability of Ca isotopic compositions in bones are too high to allow the identification of inter-sex Ca isotopic differences in bones that would be the result of lactation. The data of the 156 species presented here come from the PanTHERIA database (Jones et al., 2009), completed with data from Mitchell et al., 1976; Leon Hughes et Hall, 1998; Manger et al., 1998; Rismiller et McKelvey, 2003; Ferrari et al., 2019 and Thomas et al., 2020.

Le postulat qui est fait avec la représentation de la figure IV.9 est que plus une espèce possède un  $F_L$  élevé et plus il sera probable que les perturbations de la composition isotopique du Ca du sang lors de la lactation aient affecté la composition isotopique du Ca de l'os. En parallèle, plus le  $Ca_{pci}$  de l'espèce sera grand et plus l'augmentation des valeurs de  $\delta^{44/42}Ca$  du sang sera théoriquement importante lors de la lactation. Les espèces ayant le plus de potentiel pour présenter des différences inter-sexes de composition isotopique du Ca de l'os sont donc celles situées en haut à droite de la figure IV.9, une zone du graphique qui inclut notamment des souris marsupiales (dasyuridés), des rongeurs (notamment certains campagnols, hamsters et lemmings), des musaraignes et des opossums (en particulier *Monodelphis domestica*). Jusqu'à présent, aucune de ces espèces n'a fait l'objet d'études permettant de vérifier l'existence de telles différences isotopiques. Toutefois, cette représentation a la double fonction de pointer les espèces chez qui ces différences pourraient être recherchées à l'avenir, et les espèces chez qui le sexe pourrait être un facteur confondant pour les études se servant des isotopes du Ca comme d'un marqueur trophique. Ce graphique montre également que même des espèces avec une valeur de  $F_L$  théorique inférieure à 50 % et un  $Ca_{pci}$  moyen inférieur à 1 sont susceptibles de présenter de telles différences dans certaines conditions (i.e. le cerf élaphe et le mouton domestique). Ces conditions incluent notamment une reproduction active des populations étudiées et une faible mortalité des juvéniles avant le sevrage, deux paramètres qui ont pour effet de rapprocher la valeur calculée de  $F_L$  (et présentée dans la figure IV.9) de la fraction réelle de temps qu'une femelle passera à allaiter au cours de sa vie.

Dans l'état actuel des connaissances sur le sujet, le wallaby de l'île Eugène est le seul groupe pour lequel les prédictions du modèle et les observations sont réellement divergentes. Les théories avancées pour expliquer cette contradiction (discutées en section IV.D) peuvent s'expliquer par un décalage entre le  $F_L$  de la figure IV.9 et la fraction réelle de temps qu'une femelle passera à allaiter au cours de sa vie (e.g. mortalité juvénile), ou par la possibilité que seule la phase P3 de la lactation affecte significativement la composition isotopique du sang des femelles wallabys (auquel cas la valeur  $F_L$  à considérer ne devrait prendre en compte que la durée de la phase P3 et pas la durée totale de la lactation). Il est aussi possible que le modèle décrit en chapitre III, qui repose essentiellement sur des

données de mammifères placentaires (i.e. cochon domestique, souris, mouton), ne soit pas adapté aux marsupiaux, notamment parce que le fractionnement isotopique du Ca à la formation du lait est peut être différent entre ces mammifères (voir section IV.D). Les premières données publiées sur le wombat commun (Koutamanis et al., 2021) restent toutefois plutôt compatibles avec le modèle présenté dans le chapitre III (figure IV.9), ce qui soutiendrait plutôt les hypothèses pointant le calcul de  $F_L$  comme cause de cette divergence entre modèle et données expérimentales. Continuer d'explorer ces différences isotopiques inter-sexes chez d'autres espèces de marsupiaux ou poursuivre les investigations sur d'autres populations de wallaby de l'île Eugène seraient des pistes intéressantes à explorer afin d'identifier clairement quelles sont les limites du modèle pour prédire la manifestation de différences inter-sexes de composition isotopique du Ca des tissus minéralisés des marsupiaux. Plus généralement, il serait intéressant de continuer d'étudier les différences inter-sexes de composition isotopique du Ca des tissus minéralisés en explorant différentes combinaisons de valeurs de  $F_L$  et  $Ca_{pci}$  chez d'autres mammifères (placentaires comme marsupiaux). Explorer plus largement cet espace des paramètres permettrait de mieux cerner les limites du modèle et d'interpréter plus finement les implications physio-écologiques derrière la présence ou l'absence des différences inter-sexes de composition isotopique du Ca des tissus minéralisés.







# Chapitre V - Conclusion générale

## A. *Résumé des chapitres III et IV*

L'étude qui constitue le chapitre III de cette thèse (Hassler et al., 2021b) a permis de clarifier les facteurs physiologiques et les traits d'histoires de vie causant l'apparition de différences inter-sexes de composition isotopique du Ca des tissus minéralisés au sein de populations de mammifères adultes conspécifiques. Cette étude suggère que la cause primaire de ces différences est la lactation, par l'intermédiaire de la production de lait appauvri en isotopes lourds du Ca (i.e. valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  du lait plus basses que le sang). Cette production de lait augmente les valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  du sang de la femelle lors de la lactation, ce qui affecte la composition isotopique des tissus, notamment de l'émail dentaire si la minéralisation des dents n'est pas encore terminée, et des os si la ou les périodes de lactation durent assez longtemps. En menant des comparaisons de la composition isotopique du Ca entre des os de mâles et de femelles de même espèce, les études présentées dans le chapitre IV (notamment Hassler et al., 2021a) ont permis de tester l'existence de différences inter-sexes de composition isotopique du Ca des tissus minéralisés chez différentes espèces de mammifères aux traits d'histoire de vie différents (e.g. différentes durée et fréquence des périodes d'allaitement) et aux histoires évolutives distinctes (i.e. placentaires, marsupiaux et monotrèmes). L'existence de ces différences isotopiques inter-sexes semble se confirmer chez plusieurs espèces (cerf élaphe : section IV.B et Hassler et al., 2021a ; souris grise : section IV.C ; mouton domestique : Reynard et al., 2010 ; wombat commun : Koutamanis et al., 2021). Toutefois, les études présentées dans le chapitre IV démontrent aussi que, conformément au modèle du chapitre III, les espèces qui passent peu de temps à allaiter au cours de leur vie ne présentent pas ces différences isotopiques inter-sexes (e.g. l'échidné à nez court : section IV.D.3). Par ailleurs, certaines espèces présentent des différences isotopiques intra-sexe trop grandes pour que des différences isotopiques inter-sexes puissent être identifiées (e.g. l'ornithorynque : section IV.D.3 ; ou encore l'espèce humaine : Reynard et al., 2013), ce qui limite le recours à cette méthode pour identifier des périodes de lactation chez les espèces qui présentent une

telle variabilité intra-sexe des compositions isotopiques du Ca. Les causes exactes de cette variabilité intra-sexe restent encore à déterminer pour l'ornithorynque. Enfin, l'étude du wallaby de l'île Eugène constitue jusqu'ici un cas isolé de divergence entre prédiction du modèle et réalité des observations. En effet, si la durée et l'enchaînement théorique des périodes de lactation chez cette espèce marsupiale suggèrent l'existence de différences inter-sexes de composition isotopique du Ca dans les os, la population étudiée ne présente pas de telles différences, ni de variabilité isotopique intra-sexe suffisamment importante pour avoir masqué les différences isotopiques inter-sexes (section IV.D.2). De nouvelles études sont ainsi nécessaires pour élucider pleinement les causes de cette divergence entre modèle et données réelles (e.g. étude de nouvelles espèces marsupiales, de nouvelles populations de wallaby ayant fait l'objet d'un suivi plus complet, ou analyse de prélèvements couplés lait-sang). En outre, dans la mesure où les monotrèmes actuels ne semblent pas présenter de différences inter-sexes observables de composition isotopique du Ca dans leurs os (conformément au modèle pour l'échidné et du fait de sources inconnues de variabilité isotopique chez l'ornithorynque), des études portant sur le fractionnement isotopique du Ca à la formation du lait de ces animaux (e.g. analyse de prélèvements couplés lait-sang) sont nécessaires pour pouvoir estimer la probabilité que des monotrèmes fossiles ou des espèces à la physiologie proche puissent présenter ces différences isotopiques inter-sexes.

## *B. Perspectives pour l'étude de spécimens fossiles et de l'origine de la lactation*

### 1. Interprétation de l'absence de différences inter-sexes chez les espèces fossiles

S'il reste nécessaire de mener de nouvelles études sur des mammifères actuels pour pleinement comprendre le cycle isotopique du Ca de ces animaux, en particulier chez les monotrèmes et les marsupiaux, un faisceau d'indices suggère tout de même qu'un fractionnement isotopique lait-sang du Ca aurait lieu de manière assez généralisée chez les mammifères. Parmi ces indices, on compte l'observation directe ou indirecte de ces fractionnements chez plusieurs placentaires (Chu et al., 2006

; Hirata et al., 2008 ; Reynard et al., 2010 ; Heuser, 2016 ; Tacail, 2017 ; Hassler et al., 2021b), l'observation de différences inter-sexes de composition isotopique du Ca de l'émail (Koutamanis et al., 2021), et les variations de composition isotopique du Ca du lait qui suivent les changements de production de lait par les femelles de wallabys de l'île Eugène et d'échidnés (section IV.D.4). Dans ce contexte, on peut raisonnablement imaginer que la composition isotopique du Ca des tissus minéralisés d'espèces fossiles sont contraintes par les mêmes facteurs que ce que décrit le modèle du chapitre III, dès lors que ces espèces étaient capables de produire du lait riche en Ca grâce à une machinerie cellulaire proche de celle des mammifères actuels. En cela, il est désormais possible de théoriser sur ce que pourraient être les signaux de la lactation dans les tissus minéralisés de ces espèces fossiles, notamment au regard de la diversité des résultats présentés dans le chapitre IV. Cette thèse souligne entre autres que toutes les espèces connaissant des périodes de lactation ne présenteront pas nécessairement de nettes différences inter-sexes de composition isotopique du Ca des tissus minéralisés (e.g. l'échidné à nez court, l'ornithorynque, le tamar wallaby). Transposé à l'étude des espèces fossiles, cela signifie que l'absence de ces différences isotopiques inter-sexes des tissus minéralisés au sein d'une population fossile ne peut pas être interprétée uniquement comme une incapacité à produire du lait, mais pourrait aussi être la conséquence d'un faible investissement temporel des femelles dans la lactation ou d'un faible flux de Ca de la mère vers le juvénile. Pour rappel également, la seule fonction de la lactation que la méthode présentée ici permet de documenter est celle du transfert de Ca de la mère vers le juvénile et pas la production de lait de manière générale. Il est donc impossible de discuter de l'acquisition des fonctions d'hydratation, de nutrition hors-calcium (e.g. lipides, glucides, protéines) ou de protection immunitaire du lait grâce à la méthode décrite ici (Oftedal, 2002a, b, 2020 ; Stannard et al., 2020 ; Zhou et al., 2021). En outre, il faut garder à l'esprit que les facteurs physiologiques et cellulaires pouvant moduler le fractionnement isotopique du Ca entre le sang et le lait sont encore mal compris, bien que des hypothèses sur les processus physiques en jeu aient été avancées (Moynier et Fujii, 2017 ; Tacail, 2017). Par conséquent, il demeure pour l'instant difficile de déterminer quels sont les paramètres, gènes et protéines indispensables à ce fractionnement isotopique, et donc de déterminer à partir de quelle étape de l'évolution la production

du lait s'est vue associée à ce fractionnement isotopique du Ca. Or, ce fractionnement isotopique lait-sang du Ca est nécessaire pour que des différences inter-sexes de composition isotopique du Ca des tissus minéralisés se manifestent du fait de la lactation, ou que la consommation de lait modifie la composition isotopique du Ca de l'émail dentaire des juvéniles. Si l'évolution des formes de protolactation est passée par des phases où des transferts importants de Ca étaient réalisés de la mère vers le juvénile, mais que ces transferts impliquaient une machinerie cellulaire très différente de celle des mammifères actuels, il n'est pas exclu que ces formes de protolactation n'affectent pas les compositions isotopiques du Ca des tissus minéralisés de la même manière que ce qu'on observe chez les mammifères actuels. Ceci constitue l'une des limites fondamentales de cette méthode d'investigation.

## 2. Limites de l'identification des différences isotopiques inter-sexes dans le registre fossile

Un des constats importants qu'il est nécessaire de faire à partir des études discutées dans le chapitre IV est que, lorsqu'elles sont détectables, les différences inter-sexes de composition isotopique du Ca des tissus minéralisés restent ténues. En effet, chez les groupes étudiés jusqu'ici, celles-ci sont de l'ordre de +0,15 ‰ maximum entre les valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  des tissus minéralisés des deux sexes, avec un degré de recoupement important entre les compositions isotopiques de chaque sexe (chapitre IV ; Reynard et al., 2010 ; Hassler et al., 2021a ; Koutamanis et al., 2021). Avec des jeux de données tels que présentés dans cette thèse (de 12 à 21 individus par espèce), il n'aurait pas été possible d'identifier ces différences isotopiques inter-sexes sans un a priori sur le sexe des individus, voire même parfois sans un a priori sur l'historique de reproduction des femelles (section IV.B, Hassler et al., 2021a). De telles informations sont délicates à obtenir dans le contexte d'espèces fossiles, où l'identification du sexe des individus est soit impossible soit sujette à débat, et où l'historique de reproduction des femelles est complètement inconnu. Pour identifier des différences isotopiques inter-sexes du même ordre que ce qu'on observe dans l'actuel chez des espèces fossiles, il serait donc nécessaire de

constituer une base de données bien plus fournie en individus, de sorte à pouvoir identifier une distribution bimodale des compositions isotopiques du Ca au sein de la population.

Afin de donner un ordre d'idée du type de populations fossiles chez lesquelles on pourrait détecter une distribution bimodale, et pour estimer l'effort de recherche à fournir pour réaliser cette détection, j'ai réalisé plusieurs simulations reproduisant un échantillonnage sur une population où les valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  des tissus minéralisés de chaque sexe suivent une distribution normale, avec un décalage donné entre les valeurs moyennes de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de ces populations. Pour une dispersion intra-sexe des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  proche des cas d'études documentés au cours de cette thèse (écart type = 0,15 ‰), on constate qu'avec un échantillonnage de 30 individus par sexes (ce qui représente déjà un effort d'échantillonnage considérable pour du matériel fossile), une bimodalité significative est détectée (i.e. p-value du test d'immersion de Hartigan < 0,05) dans plus de 80 % des essais lorsque l'écart moyen inter-sexes est de l'ordre de 0,65 ‰ ou plus. Cet écart inter-sexes des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  est bien supérieur aux différences inter-sexes documentées dans l'os au cours de cette thèse (de l'ordre de 0,15 ‰ maximum). Toutefois, cet écart est compris dans la gamme des effets de la lactation sur les compositions isotopiques du sang (+0,4 ‰ : Hassler et al., 2021b ; +0,75 ‰ : Hirata et al., 2008). Si la lactation est maintenue pendant une durée de l'ordre d'un ou plusieurs mois, il est donc techniquement possible que de l'émail dentaire ayant minéralisé durant cette période ait enregistré une part suffisamment importante de ces compositions isotopiques de lactation pour permettre d'identifier une distribution bimodale. L'émail étant par ailleurs le tissu minéralisé à privilégier pour l'étude du fossile du fait de sa résistance à la diagenèse (Wang et Cerling, 1994 ; Kohn et al., 1999 ; Sharp et al., 2000 ; Zazzo et al., 2004 ; Goedert et al., 2016 ; Martin et al., 2017b ; Rey et al., 2017 ; Hassler et al., 2018), cette approche reste donc techniquement envisageable pour des espèces fossiles. La possibilité de détecter cette bimodalité est toutefois très sensible à la dispersion intra-sexe et à l'écart moyen entre les sexes. À titre d'exemple, pour un écart type de chaque sexe fixé à 0,2 ‰, il est nécessaire que l'écart moyen entre les sexes soit de l'ordre de 0,85 ‰ pour obtenir des résultats similaires, ou bien que le nombre d'individus étudiés par sexe soit de l'ordre de 200. Ces deux scénarios sortent largement du cadre de ce qui est attendu et possible pour des populations fossiles. Dans ce

contexte, limiter la variabilité isotopique intra-sexe est donc crucial. Les investigations dans le fossile qui tenteraient cette approche devraient de ce fait favoriser des populations conspécifiques fossiles d'origines géographiques et temporelles les plus contraintes possible (e.g. idéalement une concentration de fossiles résultant d'une mort en masse), et avec de préférence des espèces au régime alimentaire peu diversifié et migrant peu (de sorte à ce que les individus aient des compositions isotopiques du Ca proches en dehors des effets possibles de la lactation). Bien que techniquement possible, la portée de cette approche est donc assez limitée en pratique.

### 3. Approches possibles

#### a) Disposer d'un a priori sur le sexe

Une alternative à cette approche consisterait à disposer d'un a priori sur le sexe des individus. Or, si le dimorphisme sexuel est courant chez les mammifères actuels, notamment au niveau de la taille des individus (Mori et al., 2020), il n'en reste pas moins très difficile à déceler chez les espèces fossiles, notamment à cause des difficultés liées à la définition typologique des espèces fossiles (Jin et al., 2006 ; Ladevèze et al., 2011 ; Mallon, 2017). En conséquence, cette alternative ne permet pas d'élargir de beaucoup le champ des espèces chez qui ces investigations pourraient être menées, et nécessiterait vraisemblablement de mener en parallèle une étude détaillée des variations morphologiques de la population étudiée. Or, ceci impliquerait de disposer de fossiles suffisamment abondants et bien préservés, ce qui constitue une contrainte supplémentaire. D'autres méthodes géochimiques pouvant permettre d'identifier le sexe des individus pourraient trouver un intérêt ici, notamment celles concernant les isotopes du Fe et du Cu. Cela nécessiterait toutefois de disposer de données confirmant le lien entre les compositions isotopiques de ces éléments et le sexe chez d'autres mammifères que l'espèce humaine, et que ces différences puissent être préservées dans l'émail au cours du temps, ce qui pour l'instant ne semble pas se confirmer (Albarède et al., 2011 ; Jaouen et al., 2012, 2017 ; Jaouen et Balter, 2014).

## b) Limites et opportunités du mode de formation de l'émail dentaire

Comme mentionné précédemment, le support minéral à privilégier pour ces études serait l'émail dentaire, notamment parce que, comparé à l'os, ce tissu est relativement résistant vis-à-vis de la diagenèse (Wang et Cerling, 1994 ; Kohn et al., 1999 ; Sharp et al., 2000 ; Zazzo et al., 2004 ; Heuser et al., 2011 ; Amiot et al., 2014 ; Goedert et al., 2016 ; Martin et al., 2017b ; Rey et al., 2017 ; Hassler et al., 2018). Toujours par rapport à l'os, ce tissu a aussi l'avantage d'être plus sensible aux changements de composition isotopique du Ca du sang à condition que l'émail dentaire soit encore dans sa phase de minéralisation au moment de ces changements. Ce constat suit ce qui a été établi pour d'autres systèmes isotopiques et élémentaires (Passey et Cerling, 2002 ; Kohn, 2004 ; Pasteris et al., 2008 ; Green et al., 2017 ; Trayler et Kohn, 2017 ; Smith et al., 2018), et s'illustre notamment par l'observation des transitions de compositions isotopiques du Ca liées au sevrage dans l'émail dentaire (Wright, 2014 ; Tacail et al., 2017, 2019 ; Li et al., 2020 ; Hassler et al., 2021a), alors que ces mêmes transitions ne sont pas détectées dans les os (Reynard et al., 2013 ; Hassler et al., 2021b). Si cette sensibilité présente l'avantage de permettre d'identifier des écarts plus nets de compositions isotopiques du Ca entre les femelles ayant allaité et les individus n'ayant pas allaité (typiquement plus proches des écarts de +0,4 ‰ à +0,75 ‰ des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  identifiés dans le sang durant l'allaitement : Hirata et al., 2008 ; Hassler et al., 2021b), cette approche nécessite toutefois de cibler une zone de l'émail dont l'âge de formation correspond à une période d'allaitement chez l'animal.

Plusieurs stratégies d'échantillonnage peuvent être avancées pour maximiser les chances de cibler la bonne zone de l'émail. Dans un premier temps, cibler les dents qui se forment tardivement permet de maximiser les chances que l'individu étudié ait atteint sa maturité sexuelle au moment de la formation de la dent, et donc qu'il ait pu allaiter s'il s'agit d'une femelle. Cette stratégie peut prendre différentes formes selon le mode de renouvellement dentaire de l'espèce étudiée. Les dents dont l'émail se forme en continu constituent d'excellentes candidates (e.g. les dents des wombats), au même titre que les dents tardives des espèces polyphyodontes (i.e. les dents sont remplacées de nombreuses fois au cours de la vie). Puisque les thérapsides non-mammaliens adoptent assez largement ce dernier mode de remplacement dentaire (Kemp, 2005 ; Cisneros et al., 2015 ; Leblanc et al., 2018 ; Norton et al.,



2020), cette stratégie semble bien adaptée à l'étude de ce groupe. En outre, les espèces chez qui la chronologie de remplacement dentaire a pu être finement décrite constituent des cibles de choix pour ce type d'étude (e.g. Norton et al., 2020). Cette approche est en revanche potentiellement plus problématique pour l'étude de la plupart des mammifères chez qui les dents ne se remplacent qu'une fois (i.e. diphyodonte) ou jamais (i.e. monophyodontes). En effet, les dents de ces animaux se forment le plus souvent avant la maturité sexuelle des individus, et seules les dents à la minéralisation la plus tardive de certaines espèces ont le potentiel d'enregistrer des compositions isotopiques du Ca caractérisant des périodes de lactation (e.g. la molaire M3 chez le cerf élaphe: Brown et Chapman, 1991). Toutefois, comme les dents de ces animaux se renouvellent moins souvent, ces dernières constituent un support de choix pour préserver les transitions allaitement/sevrage des périodes juvéniles, ce qui permet d'étudier les capacités et pratiques de lactation par ce biais chez ces espèces plutôt que par le biais de l'identification de différences inter-sexes ou de périodes d'allaitement chez les femelles adultes.

En complément d'un choix judicieux des dents sélectionnées pour les analyses de composition isotopique du Ca de l'émail, deux stratégies d'échantillonnage principales peuvent être envisagées. La première solution consiste à échantillonner une section d'émail le long de l'axe de croissance de ce tissu minéral. Cette stratégie a pour avantage de limiter le nombre d'échantillons à réaliser en maximisant les chances de prélever une fraction d'émail ayant minéralisé pendant une période de lactation. En revanche, cette méthode augmente aussi les chances de prélever de l'émail non-affecté par des périodes de lactation, diminuant ainsi les écarts de composition isotopique du Ca entre les femelles ayant allaité et les autres individus de la population. En fonction du degré de mélange entre ces émails de compositions isotopiques différentes, ceci pourrait conduire aux mêmes problèmes qu'évoqués pour l'os en l'absence de sexes identifiés, à savoir une incapacité à identifier des distributions bimodales et donc à identifier des distributions de compositions isotopiques du Ca imputables à la lactation.

La seconde solution qui semble plus adaptée consiste à réaliser un échantillonnage en plusieurs points de l'émail (i.e. micro-échantillonnage spatial ou en série). Cette méthode présente le double avantage

d'être moins destructive pour l'échantillon (dans l'émail les prélèvements de ce type peuvent être réduits à des micro-forages de surface inférieurs à 400  $\mu\text{m}$  de rayon) et de garantir une meilleure sensibilité à la détection de différences de composition isotopique du Ca au sein de la dent et entre les dents (de l'individu ou entre les individus). Néanmoins, cette approche implique d'augmenter le nombre de prélèvements et d'analyses réalisées par spécimen, bien que cet impact en termes de coûts et de temps soit mitigé par la diminution du nombre de spécimens à étudier (par comparaison avec la taille des populations d'étude qu'implique les autres alternatives évoquées dans ce chapitre). En théorie, la composition isotopique du Ca de l'émail d'une dent analysée en de multiples points devrait être relativement stable chez un mâle dont la nourriture ne varie pas, et devrait être marquée par des excursions plus ou moins étendues de hautes valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  chez les femelles adultes ayant vécu des périodes de lactation. Suivant la durée des périodes de lactation, leurs espacements et le rythme de minéralisation de l'émail, ces périodes pourraient être soit limitées à des zones précises de l'émail, soit plus largement étendues. Dans un contexte où les sections d'émail affectées par la lactation seraient d'étendue limitée (i.e. périodes de lactations courtes et discontinues, avec un rythme rapide de minéralisation de l'émail), l'existence d'excursions positives des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'émail chez certains spécimens (identifiés a posteriori comme des femelles) et l'absence de ces excursions chez d'autres (identifiés a posteriori comme des mâles) pourraient être un motif suggérant que l'espèce en question allaitait ses petits. La présence chez tous les individus de la population étudiée de valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'émail stables à l'échelle individuelle (i.e. à l'échelle de la dent ou des dents de l'individu) peut quant à elle être interprétée comme une incapacité des femelles à allaiter les juvéniles, du moins au sens d'une lactation qui s'accompagne d'un transfert de beaucoup de Ca et d'un fractionnement isotopique associé. Toutefois, de telles observations pourraient également se manifester si les périodes de lactation des femelles étaient longues, continues ou associées à un rythme lent de minéralisation de l'émail. Pour faire la distinction entre ces deux scénarios aux implications bien différentes, un moyen serait de disposer d'émail minéralisant précocement (de préférence avant la maturité sexuelle et après le sevrage potentiel de l'individu), de manière à identifier une composition isotopique de l'émail qui précéderait l'influence de périodes d'allaitement des femelles (avec des

valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  typiquement inférieures). Une autre solution consisterait à comparer les valeurs moyennes de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'émail minéralisant tardivement entre les individus, de sorte à identifier une distribution bimodale de ces valeurs dans la population dans le cas où les compositions isotopiques du Ca de l'émail des femelles seraient fortement affectées par des périodes d'allaitement.

c) Approches complémentaires

Observer des motifs de variation des compositions isotopiques du Ca de l'émail ou des distributions de ces compositions isotopiques dans la population qui correspondraient aux effets attendus de la lactation (voir section précédente) constituerait un argument fort pour suggérer qu'une espèce est capable de lactation. En outre, cela permettrait de documenter certains traits d'histoire de vie et comportements liés à la lactation (e.g. durées relative des périodes d'allaitement, temps séparant les naissances). Toutefois, étant donné que les compositions isotopiques du Ca de l'émail sont aussi liées à l'alimentation, des changements d'ordre alimentaire au cours de la vie des individus pourraient aussi techniquement générer des excursions positives des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'émail de manière à ressembler à celles que pourrait engendrer la lactation. Il en va de même pour certains comportements de supplémentation en minéraux que peuvent adopter les mammifères (e.g. absorption de sels minéraux chez les cervidés : section IV.B, Hassler et al., 2021a). Le fait qu'au sein d'une même espèce ces excursions ne concernent qu'une fraction des individus serait un premier pas dans le sens des périodes d'allaitements plutôt que de changements alimentaires. Toutefois, on peut aussi imaginer avoir recours à d'autres proxys alimentaires afin de privilégier l'un ou l'autre des scénarios. La composition isotopique du carbone (C) de l'émail pourrait par exemple constituer un bon candidat, puisque la composition isotopique du C est théoriquement moins affectée par la production de lait de la femelle que les isotopes du Ca, et qu'elle dépend majoritairement de l'alimentation. Le recours à ce type de démarche complémentaire nécessiterait toutefois d'être discutée en tenant compte de la destructivité de ces analyses supplémentaires, de leur nécessité pour discuter des motifs de distribution des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'émail, ainsi que de l'histoire diagénétique des fossiles.

Une autre alternative, qui dépend cette fois de la disponibilité du matériel dentaire, consisterait à comparer à la fois la succession des compositions isotopiques du Ca dans l'émail formé post-partum (i.e. durant la période théorique d'allaitement et de sevrage) et dans l'émail formé après la maturité sexuelle (i.e. durant la période théorique de lactation chez les femelles). Identifier à la fois la transition allaitement/sevrage et des excursions positives de valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'émail dans l'émail déposé tardivement serait un signal très fort suggérant des capacités de lactation chez l'espèce qui présenterait de tels motifs. Le renouvellement dentaire polyphyodonte des thérapsides non-mammaliens limite les opportunités de disposer de dents d'âges si différents au sein des populations de ce groupe à moins de disposer de spécimens morts relativement jeunes. Toutefois, les agrégations conspécifiques de spécimens adultes et juvéniles, tels que décrits pour les cynodontes *Thrinaxodon* et *Galesaurus* ou le mammaliaforme *Kayentatherium* (Jasinowski et Abdala, 2017 ; Hoffman et Rowe, 2018), pourraient constituer une très belle opportunité de mener ce type d'investigation. En effet, en étant constituées de spécimens d'âges différents, de la même espèce, provenant de la même zone géographique et dont la mort est vraisemblablement survenue au même moment, ce type d'assemblage semble remplir toutes les conditions nécessaires pour pouvoir tirer un maximum d'informations de la composition isotopique du Ca de ces fossiles. En outre, ces mêmes agrégations suggèrent justement des comportements de soins parentaux (Jasinowski et Abdala, 2017 ; Zachos et al., 2018). Il serait donc particulièrement intéressant de pouvoir documenter l'existence de potentielles capacités et pratiques de lactations associées à ces regroupements (Jasinowski et Abdala, 2017 ; Zachos et al., 2018). Une telle découverte chez *Thrinaxodon* par exemple signifierait que l'acquisition par les thérapsides de capacités de lactation, avec une fonction de transfert de Ca aux juvéniles, serait antérieure à l'apparition des premiers mammaliaformes. Toutefois, l'accès à de tels spécimens pour ces analyses sera sans doute rendu complexe du fait de leur rareté, de la petite taille des dents des juvéniles (< 1 mm) et du caractère précieux des dents des cynodontes pour étudier leur phylogénie (Kemp, 2005 ; Zachos et al., 2018).

#### 4. Premières investigations dans le fossile

Les différentes données acquises sur les mammifères modernes au cours de cette thèse ont permis de préparer le terrain pour des études futures tournées vers le fossile et les origines de la lactation. Si le déroulement de cette thèse n'a pas permis de réaliser ces travaux sur le fossile, il a toutefois été possible d'initier une étude visant à documenter les compositions isotopiques du Ca chez plusieurs espèces du Trias et du Jurassique incluant des dinosaures et des thérapides. Le jeu de spécimens sélectionné pour cette étude n'a pas été conçu pour répondre à des questions autour des capacités de lactation et des stratégies de reproduction des thérapides (seuls 4 spécimens de thérapides d'espèces différentes ont été étudiés). Toutefois, cette étude a permis de mettre en lumière un regroupement par espèces des valeurs de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  de l'émail de plusieurs dinosaures sauropodomorphes, un résultat qui suggère des différences de préférences alimentaires entre ces espèces et qui souligne que de l'émail préservé dans ces gisements fossilifères a conservé au moins une partie de sa composition isotopique d'origine. Cette étude a été réalisée en collaboration avec Priyanka Davechand, Grant Bybee et Jonah Nathaniel Choiniere de l'Université du Witwatersrand (Johannesbourg, Afrique du sud), et fait l'objet d'un résumé publié lors de la conférence annuelle de la Goldschmidt 2021 (Davechand et al., 2021).

#### *C. Conclusion*

Les études réalisées au cours de cette thèse ont permis de faire avancer considérablement les connaissances concernant les effets de la lactation sur la composition isotopique du Ca de l'organisme, en particulier chez la femelle mammifère adulte. Il est désormais clair que la lactation joue un rôle important dans la variabilité des compositions isotopiques du Ca des tissus minéralisés des mammifères, à la fois aux stades précoces de la vie (avec les effets de la consommation de lait maternel puis du sevrage sur la composition isotopique du Ca de l'émail du juvénile : Wright, 2014 ; Tacail et al., 2017, 2019 ; Li et al., 2020 ; Hassler et al., 2021a), mais aussi à l'âge adulte pour les femelles qui allaitent leurs petits (Hirata et al., 2008 ; Reynard et al., 2010 ; Hassler et al., 2021b, a). Cette combinaison d'effets et leur enregistrement dans un tissu minéralisé relativement résistant à la diagenèse (i.e.

l'émail dentaire), font des isotopes du Ca un outil à fort potentiel pour étudier les pratiques et capacités d'allaitement d'espèces disparues, y compris parmi les premiers mammifères et les thérapsides non-mammaliens. La possibilité d'étudier à la fois l'allaitement du point de vue du juvénile et de la femelle adulte permet notamment d'adapter la stratégie d'étude en fonction des fossiles disponibles et des dents préservées chez ces spécimens (notamment en fonction de leur mode de renouvellement dentaire), ce qui fait des isotopes du Ca un outil particulièrement polyvalent et flexible. Cet outil n'est toutefois pas sans limites, et son utilisation pour documenter l'existence de périodes d'allaitement passées chez des espèces fossiles nécessite de sélectionner des spécimens et des populations remplissant un certain nombre de prérequis (e.g. fossiles d'origines géographiques et temporelles proches) et d'adopter des approches conçues spécifiquement pour les espèces cibles (notamment en fonction du mode de renouvellement dentaire des spécimens et du nombre de spécimens disponibles pour analyse). En outre, un champ important de recherche reste ouvert concernant l'étude des espèces modernes et des fractionnements isotopiques du Ca qui les affectent. De nouvelles études menées sur les marsupiaux et les monotrèmes pourraient notamment permettre de mieux cerner le fractionnement isotopique lait-sang qui a lieu chez ces animaux. Ces études dans l'actuel pourront permettre de mieux interpréter les données qui pourront être acquises sur des espèces fossiles dans le futur, que ce soit du point de vue de l'écologie des espèces (e.g. leur régime alimentaire) ou de leur capacité à produire du lait.

# Bibliographie

- Abdala F., Rubidge B. S. et van Den Heever J. (2008) The oldest therapsids (therapsida, eutheriodontia) and the early diversification of therapsida. *Palaeontology* **51**, 1011-1024.
- Agatemor C. et Beauchemin D. (2011) Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review. *Anal. Chim. Acta* **706**, 66-83.
- Akhtar A. A. et al. (2020) A record of the  $\delta^{44/40}\text{Ca}$  and [Sr] of seawater over the last 100 million years from fossil elasmobranch tooth enamel. *Earth Planet. Sci. Lett.* **543**, 116354.
- Albarède F. (2009) *Geochemistry: An Introduction*. 2nd éd., Cambridge University Press.
- Albarède F. et al. (2011) Isotopic evidence of unaccounted for Fe and Cu erythropoietic pathways. *Metallomics* **3**, 926-933.
- Allègre C. J. (2008) *Isotope Geology*, Cambridge University Press.
- Allin E. F. (1975) Evolution of the mammalian middle ear. *J. Morphol.* **147**, 403-437.
- Alroy J. (1999) The Fossil Record of North American Mammals: Evidence for a Paleocene Evolutionary Radiation. *Syst. Biol.* **48**, 107-118.
- Ambrose S. H. (1991) Effects of diet, climate and physiology on nitrogen isotope abundances in terrestrial foodwebs. *J. Archaeol. Sci.* **18**, 293-317.
- Amiot R. et al. (2014) Environment and ecology of East Asian dinosaurs during the Early Cretaceous inferred from stable oxygen and carbon isotopes in apatite. *J. Asian Earth Sci.* **98**, 358-370.
- Amiot R. et al. (2004) Latitudinal temperature gradient during the Cretaceous Upper Campanian-Middle Maastrichtian:  $\delta^{18}\text{O}$  record of continental vertebrates. *Earth Planet. Sci. Lett.* **226**, 255-272.
- Amiot R. et al. (2006) Oxygen isotopes from biogenic apatites suggest widespread endothermy in Cretaceous dinosaurs. *Earth Planet. Sci. Lett.* **246**, 41-54.
- Amiot R. et al. (2011) Oxygen isotopes of East Asian dinosaurs reveal exceptionally cold Early Cretaceous climates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 5179-5183.
- Arman P. et al. (1974) The composition and yield of milk from captive red deer (*Cervus elaphus* L.). *Reproduction* **37**, 67-84.
- Arnold R. et al. (2016) Measurement of the double-beta decay half-life and search for the neutrinoless double-beta decay of  $^{48}\text{Ca}$  with the NEMO-3 detector. *Phys. Rev. D* **93**, 1-9.
- Asher R. J. et al. (2005) Stem lagomorpha and the antiquity of glires. *Science* **307**, 1091-1094.
- Asher R. J., Horovitz I. et Sánchez-Villagra M. R. (2004) First combined cladistic analysis of marsupial mammal interrelationships. *Mol. Phylogenet. Evol.* **33**, 240-250.
- Austin C. et al. (2013) Barium distributions in teeth reveal early-life dietary transitions in primates. *Nature* **498**, 216-219.
- Bakker R. T. et Galton P. M. (1974) Dinosaur Monophyly and a new class of vertebrates. *Nature* **248**, 168-172.
- Balasse M. et Tresset A. (2002) Early Weaning of Neolithic Domestic Cattle (Bercy, France) Revealed by Intra-tooth Variation in Nitrogen Isotope Ratios. *J. Archaeol. Sci.* **29**, 853-859.
- Balter V. (2004) Allometric constraints on Sr/Ca and Ba/Ca partitioning in terrestrial mammalian trophic chains. *Oecologia* **139**, 83-88.
- Balter V. et al. (2006) Box-modeling of  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  in mammals. *Oecologia* **147**, 212-222.
- Balter V. et al. (2019) Calcium stable isotopes place Devonian conodonts as first level consumers. *Geochem. Persp. Lett.* **10**, 36-39.

- Bao Z. et al. (2020) Chromatographic purification of Ca and Mg from biological and geological samples for isotope analysis by MC-ICP-MS. *Int. J. Mass Spectrom.* **448**, 116268.
- Barrick R. E. et Showers W. J. (1994) Thermophysiology of *Tyrannosaurus rex*: Evidence from oxygen isotopes. *Science* **265**, 222-224.
- Beck R. M. D. et Baillie C. (2018) Improvements in the fossil record may largely resolve current conflicts between morphological and molecular estimates of mammal phylogeny. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **285**, 9-11.
- Benoit J. et al. (2017) Endocranial Casts of Pre-Mammalian Therapsids Reveal an Unexpected Neurological Diversity at the Deep Evolutionary Root of Mammals. *Brain. Behav. Evol.* **90**, 311-333.
- Benoit J., Manger P. R. et Rubidge B. S. (2016) Palaeoneurological clues to the evolution of defining mammalian soft tissue traits. *Sci. Rep.* **6**, 25604.
- Benton M. J. (2005) *Vertebrate palaeontology*. 3rd éd., Blackwell Publishing Ltd.
- Bernard A. et al. (2010) Regulation of Body Temperature by Some Mesozoic Marine Reptiles. *Science* **328**, 1379-1382.
- Bininda-Emonds O. R. P. et al. (2007) The delayed rise of present-day mammals. *Nature* **446**, 507-512.
- Blacburn D. G., Hayssen V. et Murphy C. J. (1989) The origins of lactation and the evolution of milk: a review with new hypotheses. *Mamm. Rev.* **19**, 1-26.
- Blättler C. L. et al. (2011) Significant increases in global weathering during Oceanic Anoxic Events 1a and 2 indicated by calcium isotopes. *Earth Planet. Sci. Lett.* **309**, 77-88.
- Bocherens H. et Drucker D. (2003) Trophic Level Isotopic Enrichment of Carbon and Nitrogen in Bone Collagen : Case Studies from Recent and Ancient Terrestrial Ecosystems. *Int. J. Osteoarchaeol.* **13**, 46-53.
- Boulyga S. F. et al. (2007) Optimization and application of ICPMS with dynamic reaction cell for precise determination of  $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$  isotope ratios. *Anal. Chem.* **79**, 7753-7760.
- Brazier J. M. et al. (2015) Calcium isotope evidence for dramatic increase of continental weathering during the Toarcian oceanic anoxic event (Early Jurassic). *Earth Planet. Sci. Lett.* **411**, 164-176.
- Brennan A. J. et al. (2007a) The Tammar Wallaby : A Model to Examine Endocrine and Local Control of Lactation. *IUBMB Life* **59**, 146-150.
- Brennan A. J. et al. (2007b) The Tammar Wallaby and Fur Seal : Models to Examine Local Control of Lactation. *J. Dairy Sci.* **90**, E66-E75.
- Britton K. et al. (2012) Stable isotope analysis of well-preserved 120,000-year-old herbivore bone collagen from the Middle Palaeolithic site of Neumark-Nord 2, Germany reveals niche separation between bovids and equids. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **333-334**, 168-177.
- Brown S. T. et al. (2020) High-temperature kinetic isotope fractionation of calcium in epidosites from modern and ancient seafloor hydrothermal systems. *Earth Planet. Sci. Lett.* **535**, 116101.
- Brown W. A. B. et Chapman N. G. (1991) Age assessment of red deer (*Cervus elaphus*): from a scoring scheme based on radiographs of developing permanent molariform teeth. *J. Zool. Lond.* **225**, 85-97.
- Bryant J. D. et al. (1996) Biologic and climatic signals in the oxygen isotopic composition of Eocene-Oligocene equid enamel phosphate. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **126**, 75-89.
- Burke D. et al. (2002) Win-shift and win-stay learning in the short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus*). *Anim. Cogn.* **5**, 79-84.
- Burton J. H., Price T. D. et Middleton W. D. (1999) Correlation of Bone Ba/Ca and Sr/Ca due to Biological Purification of Calcium. *J. Archaeol. Sci.* **26**, 609-616.
- Carrier D. R. (1987) The Evolution of Locomotor Stamina in Tetrapods: Circumventing a Mechanical Constraint. *Paleobiology* **13**, 326-341.
- Cerling T. E. et al. (1997) Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary. *Nature* **389**, 153-158.



- Chambers B. K. (2009) Human disturbance affects the ecology and population dynamics of the tammar wallaby, *Macropus eugenii*, on Garden Island, Western Australia. The University of Western Australia.
- Chanat E., Martin P. et Ollivier-Bousquet M. (1999)  $\alpha$ (S1)-casein is required for the efficient transport of  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus of mammary epithelial cells. *J. Cell Sci.* **112**, 3399-3412.
- Channon M. B. et al. (2015) Using natural, stable calcium isotopes of human blood to detect and monitor changes in bone mineral balance. *Bone* **77**, 69-74.
- Chen B. et al. (2013) Permian ice volume and palaeoclimate history: Oxygen isotope proxies revisited. *Gondwana Res.* **24**, 77-89.
- Chen Z. Q. et Benton M. J. (2012) The timing and pattern of biotic recovery following the end-Permian mass extinction. *Nat. Geosci.* **5**, 375-383.
- Chu N. C. et al. (2006) Establishing the potential of Ca isotopes as proxy for consumption of dairy products. *Appl. Geochem.* **21**, 1656-1667.
- Cisneros J. C. et al. (2015) *Tiarajudens eccentricus* and *Anomocephalus africanus*, two bizarre anomodonts (Synapsida, Therapsida) with dental occlusion from the Permian of Gondwana. *R. Soc. open sci.* **2**, 150090.
- Clark C. T., Horstmann L. et Misarti N. (2020) Evaluating tooth strontium and barium as indicators of weaning age in Pacific walrus. *Methods Ecol. Evol.* **11**, 1626-1638.
- Clayton R. N. (1993) Oxygen isotopes in meteorites. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **21**, 115-149.
- Clementz M. T. (2012) New insight from old bones: stable isotope analysis of fossil mammals. *J. Mammal.* **93**, 368-380.
- Clementz M. T., Holden P. et Koch P. L. (2003) Are calcium isotopes a reliable monitor of trophic level in marine settings? *Int. J. Osteoarchaeol.* **13**, 29-36.
- Codron D. et al. (2012) Ontogenetic niche shifts in dinosaurs influenced size, diversity and extinction in terrestrial vertebrates. *Biol. Lett.* **8**, 620-623.
- Comar C. L. et al. (1957) Strontium Metabolism and Strontium-Calcium Discrimination in Man. *Exp. Biol. Med.* **95**, 386-391.
- Coplen T. B. (2011) Guidelines and recommended terms for expression of stable-isotope-ratio and gas-ratio measurement results. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **25**, 2538-2560.
- Crompton A. W. et Luo Z. (1993) Relationships of the Liassic Mammals *Sinoconodon*, *Morganucodon oehleri*, and *Dinnetherium*. In *Mammal Phylogeny* (éd. F. S. Szalay, M. J. Novacek, et M. C. McKenna). Springer-Verlag, New York. p. 30-44.
- Cross B. M. et al. (2014) Cellular calcium dynamics in lactation and breast cancer: from physiology to pathology. *Am. J. Physiol. Physiol.* **306**, C515-C526.
- Damiani R. et al. (2003) Earliest evidence of cynodont burrowing. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **270**, 1747-1751.
- Dansgaard W. et al. (1993) Evidence for general instability of past climate from a 250-kyr ice-core record. *Nature* **364**, 218-220.
- Darwin C. (2004) *On the Origin of Species, 1859*. 1st éd., Routledge, London.
- Davechand P. et al. (2021) Jurassic ecology: An insight into dietary dynamics using Ca stable isotopes. In *Goldschmidt2021 • Virtual • 4-9 July*.
- DeNiro M. J. et Epstein S. (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta* **45**, 341-351.
- DePaolo D. J. (2004) Calcium Isotopic Variations Produced by Biological, Kinetic, Radiogenic and Nucleosynthetic Processes. *Rev. Mineral. Geochemistry* **55**, 255-288.
- Devine A. et al. (2002) Effects of vitamin D metabolites on intestinal calcium absorption and bone turnover in elderly women. *Am. J. Clin. Nutr.* **75**, 283-288.

- Dodat P.-J. et al. (2021) Isotopic calcium biogeochemistry of MIS 5 fossil vertebrate bones : application to the study of the dietary reconstruction of Regourdou 1 Neandertal fossil. *J. Hum. Evol.* **151**, 102925.
- Drake M. J. et Richter K. (2002) Determining the composition of the Earth. *Nature* **416**, 39-44.
- Druhan J. L., Lammers L. et Fantle M. S. (2020) On the utility of quantitative modeling to the interpretation of Ca isotopes. *Chem. Geol.*
- Eckhart L. et al. (2008) Identification of reptilian genes encoding hair keratin-like proteins suggests a new scenario for the evolutionary origin of hair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 18419-18423.
- Eisenhauer A. et al. (2019) Calcium isotope ratios in blood and urine: A new biomarker for the diagnosis of osteoporosis. *Bone Reports* **10**, 100200.
- Eldridge M. D. B. et al. (2019) An emerging consensus in the evolution, phylogeny, and systematics of marsupials and their fossil relatives (Metatheria). *J. Mammal.* **100**, 802-837.
- Elias R. W., Hirao Y. et Patterson C. C. (1982) The circumvention of the natural biopurification of calcium along nutrient pathways by atmospheric inputs of industrial lead. *Geochim. Cosmochim. Acta* **46**, 2561-2580.
- Ernest S. K. M. (2003) Life History Characteristics of Placental Nonvolant Mammals: Ecological Archives E084-093. *Ecology* **84**, 3402.
- Etienne M. et al. (2000) Production laitière de la truie : Estimation , composition , facteurs de variation et évolution. *Journées la Rech. Porc. en Fr.* **32**, 253-264.
- Fantle M. S. et Tipper E. T. (2014) Calcium isotopes in the global biogeochemical Ca cycle: Implications for development of a Ca isotope proxy. *Earth-Science Rev.* **129**, 148-177.
- Farkaš J. et al. (2007) Calcium isotope record of Phanerozoic oceans: Implications for chemical evolution of seawater and its causative mechanisms. *Geochim. Cosmochim. Acta* **71**, 5117-5134.
- Farquhar G. D., Ehleringer J. R. et Hubick K. T. (1989) Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 503-537.
- Ferrari M., Lindholm A. K. et König B. (2019) Fitness Consequences of Female Alternative Reproductive Tactics in House Mice (*Mus musculus domesticus*). *Am. Nat.* **193**, 106-124.
- Fietzke J. et al. (2004) Direct measurement of <sup>44</sup>Ca/<sup>40</sup>Ca ratios by MC-ICP-MS using the cool plasma technique. *Chem. Geol.* **206**, 11-20.
- Fontaine G. H. et al. (2009) Effects of operating conditions and matrix on mass bias in MC-ICPMS. *J. Anal. At. Spectrom.* **24**, 637-648.
- Fuller B. T. et al. (2006) Detection of Breastfeeding and Weaning in Modern Human Infants With Carbon and Nitrogen Stable Isotope Ratios. *Am. J. Phys. Anthropol.* **129**, 279-293.
- Fuller B. T., Richards M. P. et Mays S. A. (2003) Stable carbon and nitrogen isotope variations in tooth dentine serial sections from Wharram Percy. *J. Archaeol. Sci.* **30**, 1673-1684.
- Gallego L. et al. (2006) Seasonal and lactational changes in mineral composition of milk from Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *J. Dairy Sci.* **89**, 589-595.
- Giesemann M. A. et al. (1998) Effects of the reproductive cycle and age on calcium and phosphorus metabolism and bone integrity of sows. *J. Anim. Sci.* **76**, 796-807.
- Gilbert C., Sealy J. et Sillen A. (1994) An Investigation of Barium, Calcium and Strontium as Palaeodietary Indicators in the Southwestern Cape, South Africa. *J. Archaeol. Sci.* **21**, 173-184.
- Goedert J. et al. (2018) Euryhaline ecology of early tetrapods revealed by stable isotopes. *Nature* **558**, 68-72.
- Goedert J. et al. (2016) Preliminary Investigation of Seasonal Patterns Recorded in the Oxygen Isotope Compositions of Theropod Dinosaur Tooth Enamel. *Palaios* **31**, 10-19.
- Le Goff S. et al. (2021) Determination of magnesium isotopic ratios of biological reference materials via multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **35**.

- González-Martín I. et al. (2001) Differentiation of dietary regimens of Iberian swine by means of isotopic analysis of carbon and sulphur in hepatic tissue. *Meat Sci.* **58**, 25–30.
- Gordon G. W. et al. (2014) Predicting multiple myeloma disease activity by analyzing natural calcium isotopic composition. *Leukemia* **28**, 2112–2115.
- Grant T. R., Griffiths M. et Temple-Smith P. D. (2004) Breeding in a Free-ranging Population of Platypuses, *Ornithorhynchus anatinus*, in the Upper Shoalhaven River, New South Wales—a 27 Year Study. *Proc. Linn. Soc. New South Wales* **115**, 227–234.
- Grasby S. E., Sanei H. et Beauchamp B. (2011) Catastrophic dispersion of coal fly ash into oceans during the latest Permian extinction. *Nat. Geosci.* **4**, 104–107.
- Green D. R. et al. (2017) Synchrotron imaging and Markov Chain Monte Carlo reveal tooth mineralization patterns. *PLoS One* **12**, e0186391.
- Grice K. et al. (2005) Photic zone euxinia during the Permian-Triassic superanoxic event. *Science* **307**, 706–709.
- Griffith E. M. et al. (2020) Elucidating modern geochemical cycles at local, regional, and global scales using calcium isotopes. *Chem. Geol.* **534**, 119445.
- Griffiths M. et al. (1984) Constituents of Platypus and Echidna Milk, with Particular Reference to the Fatty-Acid Complement of the Triglycerides. *Aust. J. Biol. Sci.* **37**, 323–329.
- Griffiths M. (1978) *The Biology of the Monotremes.*, Academic Press Inc., New York.
- Griffiths M., McIntosh D. L. et Coles R. E. A. (1969) The mammary gland of the echidna, *Tachyglossus aculeatus* with observations on the incubation of the egg and on the newly-hatched young. *J. Zool. Lond.* **158**, 371–386.
- Grigg G. C. et al. (2015) The Evolution of Endothermy and Its Diversity in Mammals and Birds. *Physiol. Biochem. Zool.* **77**, 982–997.
- Grigoryan R. et al. (2020) High-precision isotopic analysis of Mg and Ca in biological samples using multi-collector ICP-mass spectrometry after their sequential chromatographic isolation – application to the characterization of the body distribution of Mg and Ca isotopes in mice. *Anal. Chim. Acta* **1130**, 137–145.
- Guan Q. et al. (2020) Determination of  $\delta^{44}/^{40}\text{Ca}$  and  $\delta^{56}/^{54}\text{Fe}$  in Geological Materials Combined with a Simplified Method for their Separation Using a Single TODGA Resin Column. *Geostand. Geoanalytical Res.* **44**, 669–683.
- Gussone N. et al. (2020) Calcium Isotopes in Deep Time: Potential and Limitations. *Chem. Geol.*, 119601.
- Gussone N. et al. (2016) Calcium Stable Isotope Geochemistry. In (éd. J. Hoefs). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Gussone N. et Heuser A. (2016) Biominerals and biomaterial. In *Calcium Stable Isotope Geochemistry* (éd. J. Hoefs). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 111–144.
- Halicz L. et al. (1999) High-precision measurement of calcium isotopes in carbonates and related materials by multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICP-MS). *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, 1835–1838.
- Halliday T. J. D. et al. (2019) Rapid morphological evolution in placental mammals post-dates the origin of the crown group. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **286**, 20182418.
- Hallström B. M. et Janke A. (2010) Mammalian Evolution May not Be Strictly Bifurcating. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 2804–2816.
- Hansard S. L. et al. (1966) Placental Transfer and Fetal Utilization of Calcium in Developing Swine. *J. Nutr.* **89**, 335–340.
- Hassler A. et al. (2018) Calcium isotopes offer clues on resource partitioning among Cretaceous predatory dinosaurs. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **285**, 20180197.
- Hassler A. et al. (2021a) Calcium isotopic variability of cervid bioapatite and implications for mammalian physiology and diet. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **573**, 110418.

- Hassler A. et al. (2021b) Lactation and gestation controls on calcium isotopic compositions in a mammalian model. *Metallomics* **13**, mfab019.
- Hawkins M. et Battaglia A. (2009) Breeding behaviour of the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*) in captivity. *Aust. J. Zool.* **57**, 283-293.
- Hayssen V. et Blackburn D. G. (1985)  $\alpha$ -Lactalbumin and the origins of lactation. *Evolution* **39**, 1147-1149.
- He D. et al. (2019) A practical method for measuring high precision calcium isotope ratios without chemical purification for calcium carbonate samples by multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Chem. Geol.* **514**, 105-111.
- Hedges R. E. M. et Reynard L. M. (2007) Nitrogen isotopes and the trophic level of humans in archaeology. *J. Archaeol. Sci.* **34**, 1240-1251.
- Hendry K. A. K. et al. (1998) Autocrine inhibition of milk secretion in the lactating tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *J. Mol. Endocrinol.* **21**, 169-177.
- Hess R. W. (1980) Ecology of the kangaroo island wallaby, *Macropus eugenii* (Desmarest), in Flinders Chase national park, Kangaroo Island. University of Adelaide.
- Heuser A. et al. (2016a) Analytical Methods. In *Calcium Stable Isotope Geochemistry* (éd. J. Hoefs). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 23-73.
- Heuser A. et al. (2016b) Biological fractionation of stable Ca isotopes in Göttingen minipigs as a physiological model for Ca homeostasis in humans. *Isotopes Environ. Health Stud.* **52**, 633-648.
- Heuser A. (2016) Biomedical Application of Ca Stable Isotopes. In *Calcium Stable Isotope Geochemistry* (éd. J. Hoefs). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 247-260.
- Heuser A. et al. (2011) Calcium isotopes in fossil bones and teeth - Diagenetic versus biogenic origin. *Geochim. Cosmochim. Acta* **75**, 3419-3433.
- Heuser A. et al. (2019) Calcium isotopes in human urine as a diagnostic tool for bone loss: Additional evidence for time delays in bone response to experimental bed rest. *Front. Physiol.* **10**, 12.
- Heuser A. et al. (2002) Measurement of calcium isotopes ( $\delta^{44}\text{Ca}$ ) using a multicollector TIMS technique. *Int. J. Mass Spectrom.* **220**, 385-397.
- Heuser A. et Eisenhauer A. (2010) A pilot study on the use of natural calcium isotope ( $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ ) fractionation in urine as a proxy for the human body calcium balance. *Bone* **46**, 889-896.
- Heuser A. et Eisenhauer A. (2008) The calcium isotope composition ( $\delta^{44/40}\text{Ca}$ ) of NIST SRM 915b and NIST SRM 1486. *Geostand. Geoanalytical Res.* **32**, 311-315.
- Hillenius W. J. et Ruben J. A. (2004) The evolution of endothermy in terrestrial vertebrates: Who? When? Why? *Physiol. Biochem. Zool.* **77**, 1019-1042.
- Hinojosa J. L. et al. (2012) Evidence for end-Permian ocean acidification from calcium isotopes in biogenic apatite. *Geology* **40**, 743-746.
- Hirata T. et al. (2008) Isotopic analysis of calcium in blood plasma and bone from mouse samples by multiple collector-ICP-mass spectrometry. *Anal. Sci.* **24**, 1501-1507.
- Hoefs J. (2009) *Stable Isotope Geochemistry*. 6<sup>e</sup> éd., Springer Berlin Heidelberg.
- Hoffman E. A. et Rowe T. B. (2018) Jurassic stem-mammal perinates and the origin of mammalian reproduction and growth. *Nature* **561**, 104-108.
- Holland G. et Bandura D. (2005) Reaction cells and high resolution. Determination of  $^{44}\text{Ca}$ -isotope markers for parasitoid studies using dynamic reaction cell ICPMS. In *Plasma Source Mass Spectrometry Current Trends and Future Developments* p. 89-98.
- Hoppe P. et Zinner E. (2000) Presolar dust grains from meteorites and their stellar source. *J. Geophys. Res. Sp. Phys.* **105**, 10371-10385.
- Hopson J. A. (1973) Endothermy, Small Size, and the Origin of Mammalian Reproduction. *Am. Nat.* **107**, 446-452.

- Horsky M., Irrgeher J. et Prohaska T. (2016) Evaluation strategies and uncertainty calculation of isotope amount ratios measured by MC ICP-MS on the example of Sr. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 351–367.
- Howcroft R., Eriksson G. et Lidén K. (2012) Conformity in diversity? Isotopic investigations of infant feeding practices in two iron age populations from Southern Öland, Sweden. *Am. J. Phys. Anthropol.* **149**, 217–230.
- Hu Y. et al. (2005) Large Mesozoic mammals fed on young dinosaurs. *Nature* **433**, 149–152.
- Humphrey L. T. (2014) Isotopic and trace element evidence of dietary transitions in early life. *Ann. Hum. Biol.* **41**, 348–357.
- Humphrey L. T. et al. (2008a) Tracking Dietary Transitions in Weanling Baboons (*Papio hamadryas anubis*) Using Strontium/Calcium Ratios in Enamel. *Folia Primatol.* **79**, 197–212.
- Humphrey L. T. et al. (2008b) Unlocking evidence of early diet from tooth enamel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 6834–6839.
- Humphrey L. T., Dean M. C. et Jeffries T. E. (2007) An evaluation of changes in strontium/calcium ratios across the neonatal line in human deciduous teeth. In *Dental Perspectives on Human Evolution* (éd. S. E. Bailey et J.-J. Hublin). Springer. p. 303–319.
- Huttenlocker A. K., Rega E. et Sumida S. S. (2010) Comparative anatomy and osteohistology of hyperelongate neural spines in the sphenacodontids Sphenacodon and Dimetrodon (Amniota: Synapsida). *J. Morphol.* **271**, 1407–1421.
- Itoh H. et al. (1967) Placental transfer of calcium in pregnant sows on normal and limited-calcium rations. *J. Anim. Sci.* **26**, 335–340.
- Ivakhnenko M. F. (2003) Eotherapsids from the east European placket (Late Permian). *Paleontol. J.* **37**, S339–S465.
- Vander Jagt C. J. et al. (2016) Gene expression in the mammary gland of the tammar wallaby during the lactation cycle reveals conserved mechanisms regulating mammalian lactation. *Reprod. Fertil. Dev.* **28**, 1241.
- Jakubowski N. et al. (2011) Inductively coupled plasma- and glow discharge plasma-sector field mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **26**, 693.
- Jaouen K. et al. (2019) Exceptionally high  $\delta^{15}\text{N}$  values in collagen single amino acids confirm Neandertals as high-trophic level carnivores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 4928–4933.
- Jaouen K. et al. (2012) Fe and Cu stable isotopes in archeological human bones and their relationship to sex. *Am. J. Phys. Anthropol.* **148**, 334–340.
- Jaouen K. et Balter V. (2014) Menopause effect on blood Fe and Cu isotope compositions. *Am. J. Phys. Anthropol.* **153**, 280–285.
- Jaouen K., Herrscher E. et Balter V. (2017) Copper and zinc isotope ratios in human bone and enamel. *Am. J. Phys. Anthropol.* **162**, 491–500.
- Jasinoski S. C. et Abdala F. (2017) Aggregations and parental care in the Early Triassic basal cynodonts *Galesaurus planiceps* and *Thrinaxodon liorhinus*. *PeerJ* **5**, e2875.
- Jenkins F. A. et Parrington F. R. (1976) The Postcranial Skeletons of The Triassic Mammals *Eozostrodon*, *Megazostrodon* and *Erythrotherium*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **273**, 387–431.
- Jenkins S. G. et al. (2001) Nitrogen and carbon isotope fractionation between mothers, neonates, and nursing offspring. *Oecologia* **129**, 336–341.
- Jin M. et al. (2006) The mammal fauna in the Early Cretaceous Jehol Biota : implications for diversity and biology of Mesozoic mammals. *Geol. J.* **41**, 439–463.
- Joint Committee for Guides in Metrology (2008) Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. *JCGM* **100**, 116.
- Jones K. E. et al. (2021) Adaptive landscapes challenge the “lateral-to-sagittal” paradigm for mammalian vertebral evolution. *Curr. Biol.* **31**, 1883–1892.e7.

- Jones K. E. et al. (2009) PanTHERIA: a species-level database of life history, ecology, and geography of extant and recently extinct mammals. *Ecology*, 90:2648.
- Kamen M. D. (1951) *Radioactive tracers in biology: An introduction to tracer methodology*. éd. L. F. Fieser et M. Fieser, Academic Press Inc., New York.
- Kammerer C. F. (2016) Systematics of the Rubidgeinae (Therapsida: Gorgonopsia). *PeerJ* **4**, e1608.
- Kast E. R. (2020) Development and application of biogenic mineral-bound nitrogen isotope measurements to the million-year timescale. Princeton.
- Kawasaki K., Lafont A. et Sire J. (2011) The Evolution of Milk Casein Genes from Tooth Genes before the Origin of Mammals. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2053–2061.
- Kawasaki K. et Weiss K. M. (2003) Mineralized tissue and vertebrate evolution: The secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 4060–4065.
- Kemp T. S. (1982) *Mammal-Like Reptiles and the Origin of Mammals.*, Academic Press.
- Kemp T. S. (2005) *The Origin and Evolution of Mammals.*, Oxford university press.
- Kemp T. S. (1980) The Primitive Cynodont Procynosuchus : Structure , Function and Evolution of the Postcranial Skeleton. *Philos. Trans. of the R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* **288**, 217–258.
- Kemp T. S. (1979) The Primitive Cynodont Procynosuchus: Functional Anatomy of the Skull and Relationships. *Philos. Trans. of the R. Soc. of London. Ser. B, Biol. Sci.* **285**, 73–122.
- Kermack K. A., Mussett F. et Rigney H. W. (1981) The skull of *Morganucodon*. *Zool. J. Linn. Soc.* **71**, 1–158.
- Klamt M. et al. (2016) Trophic relationships of the platypus: Insights from stable isotope and cheek pouch dietary analyses. *Mar. Freshw. Res.* **67**, 1196–1204.
- Knutsen E. M. et Oerlemans E. (2020) The last dicynodont? Re-assessing the taxonomic and temporal relationships of a contentious Australian fossil. *Gondwana Res.* **77**, 184–203.
- Koch P. L. (2007) Isotopic study of the biology of modern and fossil vertebrates. In *Stable isotopes in ecology and environmental science* (éd. R. Michener et K. Lajtha). Blackwell Publishing Ltd. p. 99–154.
- Koch P. L., Fisher D. C. et Dettman D. (1989) Oxygen isotope variation in the tusks of extinct proboscideans: a measure of season of death and seasonality. *Geology* **17**, 515–519.
- Koch P. L., Tuross N. et Fogel M. L. (1997) The Effects of Sample Treatment and Diagenesis on the Isotopic Integrity of Carbonate in Biogenic Hydroxylapatite. *J. Archaeol. Sci.* **24**, 417–429.
- Kohn M. J. (2004) Comment: Tooth enamel mineralization in ungulates: Implications for recovering a primary isotopic time-series, by B. H. Passey and T. E. Cerling (2002). *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**, 403–405.
- Kohn M. J., Schoeninger M. J. et Barker W. W. (1999) Altered states: Effects of diagenesis on fossil tooth chemistry. *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**, 2737–2747.
- Korte C. et Kozur H. W. (2010) Carbon-isotope stratigraphy across the Permian-Triassic boundary: A review. *J. Asian Earth Sci.* **39**, 215–235.
- Koutamanis D., Roberts G. L. et Dosseto A. (2021) Inter- and intra-individual variability of calcium and strontium isotopes in modern Tasmanian wombats. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **574**, 110435.
- Kovacs C. S. (2016) Maternal mineral and bone metabolism during pregnancy, lactation, and post-weaning recovery. *Physiol. Rev.* **96**, 449–547.
- Krachler M., Rossipal E. et Micetic-Turk D. (1999) Concentrations of trace elements in sera of newborns, young infants, and adults. *Biol. Trace Elem. Res.* **68**, 121–135.
- Kumar S. et al. (1994) Milk composition and lactation of  $\beta$ -casein-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 6138–6142.
- Kwek J. H. L. et al. (2009) Cross-fostering of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) pouch young accelerates fore-stomach maturation. *Mech. Dev.* **126**, 449–463.

- Ladevèze S. et al. (2011) Earliest evidence of mammalian social behaviour in the basal Tertiary of Bolivia. *Nature* **474**, 832-86.
- Lambert J. B. et al. (1985) Bone diagenesis and dietary analysis. *J. Hum. Evol.* **14**, 477-482.
- Lambert J. B. et al. (1984) Copper and barium as dietary discriminants: the effects of diagenesis. *Archaeometry* **26**, 131-138.
- Lanping F. et al. (2018) A rapid and simple single-stage method for Ca separation from geological and biological samples for isotopic analysis by MC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **33**, 413-421.
- Leblanc A. R. H. et al. (2018) Dental ontogeny in extinct synapsids reveals a complex evolutionary history of the mammalian tooth attachment system. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **285**, 20181792.
- LEE-THORP J. A. (2008) ON ISOTOPES AND OLD BONES\*. *Archaeometry* **50**, 925-950.
- Lee W. H. et al. (2011) Simple isotopic method using oral stable or radioactive tracers for estimating fractional calcium absorption in adult women. *Osteoporos. Int.* **22**, 1829-1834.
- Lefèvre C. et al. (2019) Comparative analysis of milk microRNA in the therian lineage highlights the evolution of lactation. *Reprod. Fertil. Dev.* **31**, 1266-1275.
- Lefèvre C. M., Sharp J. a et Nicholas K. R. (2010) Evolution of lactation: ancient origin and extreme adaptations of the lactation system. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **11**, 219-38.
- Leichliter J. N. et al. (2021) Nitrogen isotopes in tooth enamel record diet and trophic level enrichment: Results from a controlled feeding experiment. *Chem. Geol.* **563**, 120047.
- Lemay D. G. et al. (2009) The bovine lactation genome: Insights into the evolution of mammalian milk. *Genome Biol.* **10**, 1-18.
- Lentle R. . (1998) Feeding strategies of the tammar wallaby (*Macropus eugenii* Desmarest). .
- Leon Hughes R. et Hall L. S. (1998) Early development and embryology of the platypus éd. P. R. Manger et J. D. Pettigrew. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* **353**, 1101-1114.
- Lewis J. et al. (2018) Collision Course: Accurate and precise measurements of stable and radiogenic calcium isotopes using the collision cell MC-ICPMS, Proteus. In *American Geophysical Union, Fall Meeting 2018* p. V43A-03.
- Li M. et al. (2018) High-precision Ca isotopic measurement using a large geometry high resolution MC-ICP-MS with a dummy bucket. *J. Anal. At. Spectrom.* **33**, 1707-1719.
- Li Q. et al. (2020) Spatially-Resolved Ca Isotopic and Trace Element Variations in Human Deciduous Teeth Record Diet and Physiological Change. *Environ. Archaeol.*, 1-10.
- Li Q., Thirlwall M. et Müller W. (2016) Ca isotopic analysis of laser-cut microsamples of (bio)apatite without chemical purification. *Chem. Geol.* **422**, 1-12.
- Lisiecki L. E. et Raymo M. E. (2005) A Pliocene-Pleistocene stack of 57 globally distributed benthic  $\delta^{18}\text{O}$  records. *Paleoceanography* **20**, 1-17.
- Liu F. et al. (2020) A practical guide to the double-spike technique for calcium isotope measurements by thermal ionization mass spectrometry (TIMS). *Int. J. Mass Spectrom.* **450**, 116307.
- Long C. A. (1969) The Origin and Evolution of Mammary Glands. *Bioscience* **19**, 519-523.
- Long C. A. (1972) Two Hypotheses on the Origin of Lactation. *Am. Nat.* **106**, 141-144.
- Longinelli A. (1984) Oxygen isotopes in mammal bone phosphate: A new tool for paleohydrological and paleoclimatological research? *Geochim. Cosmochim. Acta* **48**, 385-390.
- Lough S. A., Rivera J. et Comar C. L. (1963) Retention of Strontium, Calcium, and Phosphorus in Human Infants. *Exp. Biol. Med.* **112**, 631-636.
- Lucas S. G. (2017) Permian tetrapod extinction events. *Earth-Science Rev.* **170**, 31-60.

- Luo Z. X. et al. (2011) A Jurassic eutherian mammal and divergence of marsupials and placentals. *Nature* **476**, 442-445.
- Luo Z. X. et al. (2003) An Early Cretaceous Tribosphenic Mammal and Metatherian Evolution. *Science* **302**, 1934-1940.
- Luo Z. X. (2007) Transformation and diversification in early mammal evolution. *Nature* **450**, 1011-1019.
- Luo Z. X., Cifelli R. L. et Kielan-Jaworowska Z. (2001) Dual origin of tribosphenic mammals. *Nature* **409**, 53-57.
- Luo Z. X. et Crompton A. W. (1994) Transformation of the Quadrate ( Incus ) through the Transition from Non-Mammalian Cynodonts to Mammals. *J. Vertebr. Paleontol.* **14**, 341-374.
- Luo Z. X., Crompton A. W. et Lucas S. G. (1995) Evolutionary origins of the mammalian promontorium and cochlea. *J. Vertebr. Paleontol.* **15**, 113-121.
- Luo Z. X. et Wible J. R. (2005) A late Jurassic digging mammal and early mammalian diversification. *Science* **308**, 103-107.
- Mahan B. et al. (2020) Longitudinal biometal accumulation and Ca isotope composition of the Göttingen minipig brain. *Metallomics* **12**, 1585-1598.
- Mallon J. C. (2017) Recognizing sexual dimorphism in the fossil record : lessons from nonavian dinosaurs. *Paleobiology* **43**, 495-507.
- Manger Paul R., Hall L. S. et Pettigrew John D. (1998) The development of the external features of the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*) éd. P. R. Manger et J. D. Pettigrew. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* **353**, 1115-1125.
- Marechal C. N., Telouk P. et Albarede F. (1999) Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chem. Geol.* **156**, 251-273.
- Marshall B. D. et DePaolo D. J. (1989) Calcium isotopes in igneous rocks and the origin of granite. *Geochim. Cosmochim. Acta* **53**, 917-922.
- Martin J. E. et al. (2018) Calcium isotopes in enamel of modern and Plio-Pleistocene East African mammals. *Earth Planet. Sci. Lett.* **503**, 227-235.
- Martin J. E. et al. (2015) Calcium isotopes reveal the trophic position of extant and fossil elasmobranchs. *Chem. Geol.* **415**, 118-125.
- Martin J. E. et al. (2020) Calcium isotopic ecology of Turkana Basin hominins. *Nat. Commun.* **11**, 3587.
- Martin J. E. et al. (2017a) Calcium Isotopic Evidence for Vulnerable Marine Ecosystem Structure Prior to the K/Pg Extinction. *Curr. Biol.* **27**, 1641-1644.e2.
- Martin J. E., Tacail T. et Balter V. (2017b) Non-traditional isotope perspectives in vertebrate palaeobiology. *Palaeontology* **60**, 485-502.
- Martin J. E., Vance D. et Balter V. (2014) Natural variation of magnesium isotopes in mammal bones and teeth from two South African trophic chains. *Geochim. Cosmochim. Acta* **130**, 12-20.
- Mather I. H. (2011) Milk Lipids: Milk Fat Globule Membrane. In *Encyclopedia of Dairy Sciences, Second edition* p. 680-690.
- McClellan H. L., Miller S. J. et Hartmann P. E. (2008) Evolution of lactation: Nutrition v. protection with special reference to five mammalian species. *Nutr. Res. Rev.* **21**, 97-116.
- Meija J. et al. (2016) Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **88**, 265-291.
- Melin A. D. et al. (2014) Calcium and carbon stable isotope ratios as paleodietary indicators. *Am. J. Phys. Anthropol.* **154**, 633-643.
- Meredith R. W. et al. (2011) Impacts of the cretaceous terrestrial revolution and KPg extinction on mammal diversification. *Science* **334**, 521-524.



- van der Merwe N. J. (1982) Carbon isotopes, photosynthesis, and archaeology: different pathways of photosynthesis cause characteristic changes in carbon isotope ratios that make possible the study of prehistoric human diets. *Am. Sci.* **70**, 596-606.
- Metzger C. A., Terry D. O. et Grandstaff D. E. (2004) Effect of paleosol formation on rare earth element signatures in fossil bone. *Geology* **32**, 497-500.
- Minagawa M. et Wada E. (1984) Stepwise enrichment of  $^{15}\text{N}$  along food chains: Further evidence and the relation between  $\delta^{15}\text{N}$  and animal age. *Geochim. Cosmochim. Acta* **48**, 1135-1140.
- Mitchell B., McCowan D. et Nicholson I. A. (1976) Annual cycles of body weight and condition in Scottish Red deer, *Cervus elaphus*. *J. Zool.* **180**, 107-127.
- Modesto S. P. et al. (2011) The last « pelycosaur »: A varanopid synapsid from the *Pristerognathus* Assemblage Zone, Middle Permian of South Africa. *Naturwissenschaften* **98**, 1027-1034.
- Modesto S. P. et Anderson J. S. (2004) The phylogenetic definition of reptilia. *Syst. Biol.* **53**, 815-821.
- Modesto S. P. et Botha-Brink J. (2010) A burrow cast with *Lystrosaurus* skeletal remains from the lower Triassic of South Africa. *Palaios* **25**, 274-281.
- Moore D. M. et al. (1987) Effect of calcium on oxytocin-induced contraction of mammary gland myoepithelium as visualized by NBD-phalloidin. *J. Cell Sci.* **88**, 563-569.
- Morgan J. L. L. et al. (2011) High-Precision Measurement of Variations in Calcium Isotope Ratios in Urine by Multiple Collector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **83**, 6956-6962.
- Morgan J. L. L. et al. (2012) Rapidly assessing changes in bone mineral balance using natural stable calcium isotopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 9989-9994.
- Mori E., Mazza G. et Lovari S. (2020) *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. éd. J. Vonk et T. Shackelford, Springer International Publishing, Cham.
- Morrow G. E., Jones S. M. et Nicol S. C. (2017) General and Comparative Endocrinology Frozen embryos ? Torpor during pregnancy in the Tasmanian short-beaked echidna *Tachyglossus aculeatus setosus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **244**, 139-145.
- Morrow G. E. et Nicol S. C. (2012) Maternal care in the tasmanian echidna (*Tachyglossus aculeatus setosus*). *Aust. J. Zool.* **60**, 289-298.
- Morse III H. C. (2007) Building a Better Mouse : One Hundred Years of Genetics and Biology. In *The Mouse in Biomedical Research (Second Edition)* (éd. J. G. Fox, M. T. Davisson, F. W. Quimby, S. W. Barthold, C. E. Newcomer, et A. L. Smith). Elsevier Inc. p. 1-11.
- Moser-Veillon P. B. et al. (2001) Calcium Fractional Absorption and Metabolism Assessed Using Stable Isotopes Differ between Postpartum and Never Pregnant Women. *J. Nutr.* **131**, 2295-2299.
- Moynier F. et Fujii T. (2017) Calcium isotope fractionation between aqueous compounds relevant to low-temperature geochemistry, biology and medicine. *Sci. Rep.* **7**, 44255.
- Murphy W. J. et al. (2001) Resolution of the early placental mammal radiation using bayesian phylogenetics. *Science* **294**, 2348-2351.
- Nehlich O. et al. (2011) Application of sulphur isotope ratios to examine weaning patterns and freshwater fish consumption in Roman Oxfordshire, UK. *Geochim. Cosmochim. Acta* **75**, 4963-4977.
- Nelson B. K. et al. (1986) Effects of diagenesis on strontium, carbon, nitrogen and oxygen concentration and isotopic composition of bone. *Geochim. Cosmochim. Acta* **50**, 1941-1949.
- Neville M. C. (2006) Lactation and Its Hormonal Control. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (éd. J. D. Neill). Elsevier Inc. p. 2993-3054.
- Newham E. et al. (2020) Reptile-like physiology in Early Jurassic stem-mammals. *Nat. Commun.* **11**, 5121.
- Nguyen D. D. et Neville M. C. (1998) Tight Junction Regulation in the Mammary Gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **3**, 233-246.

- Nicholas K. et al. (2012) The tammar wallaby : A model system to examine domain-specific delivery of milk protein bioactives. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 547-556.
- Nicholas K. et al. (1997) The Tammar Wallaby : A Model to Study Putative Autocrine-Induced Changes in Milk Composition. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2**, 299-310.
- Nicholas K. R. (1988) Asynchronous dual lactation in a marsupial, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 529-536.
- Nicholas K. R. et al. (2019) Guiding Development of the Neonate: Lessons from Mammalia. In *Nestle Nutrition Institute Workshop Series* p. 203-215.
- Nicol S. et Andersen N. A. (2007) The life history of an egg-laying mammal, the echidna (*Tachyglossus aculeatus*). *Ecoscience* **14**, 275-285.
- Nilsson M. A. et al. (2004) Marsupial relationships and a timeline for marsupial radiation in South Gondwana. *Gene* **340**, 189-196.
- Nobrega J. A. et al. (1997) Direct determination of major and trace elements in milk by inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **12**, 1243-1246.
- Norton L. A. et al. (2020) Tooth replacement patterns in the Early Triassic epicynodont *Galesaurus planiceps* (Therapsida, Cynodontia). *PLoS One* **15**, e0243985.
- O'Leary M. H. (1988) Carbon Isotopes in Photosynthesis. *Bioscience* **38**, 328-336.
- O'Meara R. N. et Asher R. J. (2016) The evolution of growth patterns in mammalian versus nonmammalian cynodonts. *Paleobiology* **42**, 439-464.
- Oelkers E. H., Pogge Von Strandmann P. A. E. et Mavromatis V. (2019) The rapid resetting of the Ca isotopic signatures of calcite at ambient temperature during its congruent dissolution , precipitation , and at equilibrium. *Chem. Geol.* **512**, 1-10.
- Oftedal O. T. (2013) *Advanced Dairy Chemistry*. éd. P. L. H. McSweeney et P. F. Fox, Springer US, Boston, MA.
- Oftedal O. T. (2020) The Evolution of Lactation in Mammalian Species. In *Milk, Mucosal Immunity, and the Microbiome: Impact on the Neonate, Nestlé Nutr. Inst. Workshop Series (vol 94)* (éd. P. L. Ogra, W. A. Walker, et B. Lönnerdal). Karger Medical and Scientific Publishers. p. 1-10.
- Oftedal O. T. (2012) The evolution of milk secretion and its ancient origins. *Animal* **6**, 355-368.
- Oftedal O. T. (2002a) The Mammary Gland and Its Origin During Synapsid Evolution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **7**, 225-252.
- Oftedal O. T. (2002b) The origin of lactation as a water source for parchment-shelled eggs. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **7**, 253-266.
- Oftedal O. T. (2000) Use of maternal reserves as a lactation strategy in large mammals. *Proc. Nutr. Soc.* **59**, 99-106.
- Oftedal O. T., Don Bowen W. et Boness D. J. (1993) Energy Transfer by Lactating Hooded Seals and Nutrient Deposition in Their Pups during the Four Days from Birth to Weaning. *Physiol. Zool.* **66**, 412-436.
- Parrington F. R. (1971) On the Upper Triassic Mammals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **261**, 231-272.
- Passey B. H. et Cerling T. E. (2002) Tooth enamel mineralization in ungulates: Implications for recovering a primary isotopic time-series. *Geochim. Cosmochim. Acta* **66**, 3225-3234.
- Pasteris J. D., Wopenka B. et Valsami-Jones E. (2008) Bone and tooth mineralization: Why apatite? *Elements* **4**, 97-104.
- Payne J. L. et al. (2010) Calcium isotope constraints on the end-Permian mass extinction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 8543-8548.
- Pecher C. (1941) Biological Investigations with Radioactive Calcium and Strontium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **46**, 86-91.

- Perlman R. L. (2016) Mouse Models of Human Disease: An Evolutionary Perspective. *Evol. Med. Public Heal.* **1**, 170-176.
- Perrin D. R. (1955) The chemical composition of the colostrum and milk of the sow. *J. Dairy Res.* **22**, 103-107.
- Peterson B. J. et Fry B. (1987) Stable Isotopes in Ecosystem Studies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **18**, 293-320.
- Petrova M. V. et al. (2020) Human mercury exposure levels and fish consumption at the French Riviera. *Chemosphere* **258**, 127232.
- Pianka E. R. (2017) On r- and K-Selection. *Univ. Chicago Press Am. Soc. Nat.* **104**, 592-597.
- Pietruszka A. J. et Reznik A. D. (2008) Identification of a matrix effect in the MC-ICP-MS due to sample purification using ion exchange resin : An isotopic case study of molybdenum. *Int. J. Mass Spectrom.* **270**, 23-30.
- Pond C. M. (1977) The Significance of Lactation in the Evolution of Mammals. *Evolution* **31**, 177.
- Price T. D. et al. (1992) Diagenesis in prehistoric bone: Problems and solutions. *J. Archaeol. Sci.* **19**, 513-529.
- Ramberg Jr C. F. et al. (1970) Calcium kinetics in cows during late pregnancy, parturition, and early lactation. *Am. J. Physiol. Content* **219**, 1166-1177.
- Rant T. R., Griffiths M. et Leckie R. M. C. (1983) *Ornithorhynchus anatinus* (Monotremata), in Waters of Eastern New South Wales. *Aust. J. Zool.* **31**, 881-889.
- Rey K. et al. (2017) Oxygen isotopes suggest elevated thermometabolism within multiple Permo-Triassic therapsid clades. *Elife* **6**, e28589.
- Reynard B. et Balter V. (2014) Trace elements and their isotopes in bones and teeth: Diet, environments, diagenesis, and dating of archeological and paleontological samples. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **416**, 4-16.
- Reynard B., Lécuyer C. et Grandjean P. (1999) Crystal-chemical controls on rare-earth element concentrations in fossil biogenic apatites and implications for paleoenvironmental reconstructions. *Chem. Geol.* **155**, 233-241.
- Reynard L. M. et al. (2013) Calcium isotopes in juvenile milk-consumers. *Archaeometry* **55**, 946-957.
- Reynard L. M., Henderson G. M. et Hedges R. E. M. (2010) Calcium isotope ratios in animal and human bone. *Geochim. Cosmochim. Acta* **74**, 3735-3750.
- Reynard L. M. et Tuross N. (2015) The known, the unknown and the unknowable: Weaning times from archaeological bones using nitrogen isotope ratios. *J. Archaeol. Sci.* **53**, 618-625.
- Richards M. P. et al. (2003) Sulphur isotopes in palaeodietary studies: a review and results from a controlled feeding experiment. *Int. J. Osteoarchaeol.* **13**, 37-45.
- Richards M. P., Mays S. et Fuller B. T. (2002) Stable Carbon and Nitrogen Isotope Values of Bone and Teeth Reflect Weaning Age at the Medieval Wharram Percy Site , Yorkshire , UK. *Am. J. Phys. Anthropol.* **119**, 205-210.
- Riggs E. S. (1934) A New Marsupial Saber-Tooth from the Pliocene of Argentina and Its Relationships to Other South American Predacious Marsupials. *Trans. Am. Philos. Soc.* **24**, 1-32.
- Rijnkels M. et al. (2003) Multispecies comparative analysis of a mammalian-specific genomic domain encoding secretory proteins. *Genomics* **82**, 417-432.
- Rijnkels M. (2002) Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **7**, 327-345.
- Rinaldi N. (2018) A Ground-Truthing Study of the Nitrogen Isotopic Composition of Enamel Bound Organic Matter in Modern Bison Teeth. Princeton.
- Rismiller P. D. et McKelvey M. W. (2003) Body mass, age and sexual maturity in short-beaked echidnas, *Tachyglossus aculeatus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **136**, 851-865.
- Roberts S. B. et al. (1988) Effect of weaning on accuracy of doubly labeled water method in infants. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **254**, R622-R627.

- Romaniello S. J. et al. (2015) Fully automated chromatographic purification of Sr and Ca for isotopic analysis. *J. Anal. At. Spectrom.* **30**, 1906-1912.
- Romer A. S., Price L. W. et Price L. I. (1940) *Review of the Pelycosauria (Vol. 28.)*, Geological Society of America.
- Roskov Y. et al. (2019) Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist. *Species 2000 Nat. Leiden, Netherlands*, [www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019](http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019).
- Rossipal E. et al. (2007) Investigation of the transport of trace elements across barriers in humans: studies of placental and mammary transfer. *Acta Paediatr.* **89**, 1190-1195.
- Rougier G. W., Qiang J. et Novacek M. J. (2010) A New Symmetrodont Mammal with Fur Impressions from the Mesozoic of China. *Acta Geol. Sin. - English Ed.* **77**, 7-14.
- Rougier G. W., Wible J. R. et Novacek M. J. (1998) Implications of Deltatheridium specimens for early marsupial history. *Nature* **396**, 459-463.
- Rozefelds A. C. et al. (2011) New evidence of large Permo-Triassic dicynodonts (Synapsida) from Australia. *J. Vertebr. Paleontol.* **31**, 1158-1162.
- Rubidge B. S. et Sidor C. A. (2001) Evolutionary Patterns among Permo-Triassic Therapsids. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **32**, 449-480.
- Russell W. A., Papanastassiou D. A. et Tombrello T. A. (1978) Ca isotope fractionation on the Earth and other solar system materials. *Geochim. Cosmochim. Acta* **42**, 1075-1090.
- Ruta M. et al. (2013) The radiation of cynodonts and the ground plan of mammalian morphological diversity. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **280**, 20131865.
- Saunders A. et Reichow M. (2009) The Siberian Traps and the End-Permian mass extinction: A critical review. *Chinese Sci. Bull.* **54**, 20-37.
- Sauzéat L. et al. (2021) Inter-comparison of stable iron, copper and zinc isotopic compositions in six reference materials of biological origin. *Talanta* **221**, 121576.
- Schiller M., Paton C. et Bizzarro M. (2012) Calcium isotope measurement by combined HR-MC-ICPMS and TIMS. *J. Anal. At. Spectrom.* **27**, 38-49.
- Schmid J. et al. (2003) Field energetics of free-living, lactating and non-lactating echidnas (*Tachyglossus aculeatus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **136**, 903-909.
- Schmitt A.-D. (2016) Earth-Surface Ca Isotopic Fractionations. In *Calcium Stable Isotope Geochemistry* (éd. J. Hoefs). Springer, Berlin, Heidelberg. p. 145-172.
- Schoeninger M. J. et DeNiro M. J. (1984) Nitrogen and carbon isotopic composition of bone collagen from marine and terrestrial animals. *Geochim. Cosmochim. Acta* **48**, 625-639.
- Schroeder H. A., Tipton I. H. et Nason A. P. (1972) Trace metals in man: Strontium and barium. *J. Chronic Dis.* **25**, 491-517.
- Sharp J. A. et al. (2017) The tammar wallaby: A marsupial model to examine the timed delivery and role of bioactives in milk. *Gen. Comp. Endocrinol.* **244**, 164-177.
- Sharp J. A., Lefèvre C. et Nicholas K. R. (2007) Molecular evolution of monotreme and marsupial whey acidic protein genes. *Evol. Dev.* **9**, 378-392.
- Sharp Z. D., Atudorei V. et Furrer H. (2000) The effect of diagenesis on oxygen isotope ratios of biogenic phosphates. *Am. J. Sci.* **300**, 222-237.
- Shemesh A. (1990) Crystallinity and diagenesis of sedimentary apatites. *Geochim. Cosmochim. Acta* **54**, 2433-2438.
- Shroff R. et al. (2021) Naturally Occurring Stable Calcium Isotope Ratios in Body Compartments Provide a Novel Biomarker of Bone Mineral Balance in Children and Young Adults. *J. Bone Miner. Res.* **36**, 133-142.
- Shroff R. et al. (2020) Stable calcium isotopes: a novel biomarker of bone mineral content in patients with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **35**, gfaa140.MO055.

- Sillen A. (1981) Strontium and diet at Hayonim Cave. *Am. J. Phys. Anthropol.* **56**, 131-137.
- Sillen A. et Kavanagh M. (1982) Strontium and paleodietary research: A review. *Am. J. Phys. Anthropol.* **25**, 67-90.
- Sillen A. et LeGeros R. (1991) Solubility profiles of synthetic apatites and of modern and fossil bones. *J. Archaeol. Sci.* **18**, 385-397.
- Sillen A. et Smith P. (1984) Weaning patterns are reflected in strontium-calcium ratios of juvenile skeletons. *J. Archaeol. Sci.* **11**, 237-245.
- Simon J. I., Depaolo D. J. et Moynier F. (2009) Calcium isotope composition of meteorites, Earth, and Mars. *Astrophys. J.* **702**, 707-715.
- Skibieli A. L. et al. (2013) The evolution of the nutrient composition of mammalian milks. *J. Anim. Ecol.* **82**, 1254-1264.
- Skulan J. et al. (2007) Natural calcium isotopic composition of urine as a marker of bone mineral balance. *Clin. Chem.* **53**, 1155-1158.
- Skulan J. et DePaolo D. J. (1999) Calcium isotope fractionation between soft and mineralized tissues as a monitor of calcium use in vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13709-13713.
- Skulan J., DePaolo D. J. et Owens T. L. (1997) Biological control of calcium isotopic abundances in the global calcium cycle. *Geochim. Cosmochim. Acta* **61**, 2505-2510.
- Smith B. N. et Epstein S. (1971) Two Categories of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Ratios for Higher Plants. *Plant Physiol.* **47**, 380-384.
- Smith R. M. H. et al. (2021) Neonate aggregation in the Permian dicynodont Diictodon (Therapsida, Anomodontia): Evidence for a reproductive function for burrows? *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **569**, 110311.
- Smith T. M. et al. (2017) Cyclical nursing patterns in wild orangutans. *Sci. Adv.* **3**, 1-9.
- Smith T. M. et al. (2018) Supplementary Materials for Wintertime stress, nursing, and lead exposure in Neanderthal children. *Sci. Adv.* **4**.
- Sobolev S. V. et al. (2011) Linking mantle plumes, large igneous provinces and environmental catastrophes. *Nature* **477**, 312-316.
- Specker B. L. et al. (1994) Calcium kinetics in lactating women with low and high calcium intakes. *Am. J. Clin. Nutr.* **59**, 593-599.
- Sponheimer M. et Lee-Thorp J. A. (2006) Enamel diagenesis at South African Australopithecus sites: Implications for paleoecological reconstruction with trace elements. *Geochim. Cosmochim. Acta* **70**, 1644-1654.
- Springer M. S. et al. (2003) Placental mammal diversification and the Cretaceous-Tertiary boundary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 1056-1061.
- Stannard H. J., Miller R. D. et Old J. M. (2020) Marsupial and monotreme milk — a review of its nutrient and immune properties. *PeerJ* **8**, e9335.
- Stuart-Williams H. L. Q. et al. (1996) The isotopic composition and diagenesis of human bone from Teotihuacan and Oaxaca, Mexico. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **126**, 1-14.
- Suarez C. A. et al. (2007) Rare earth element geochemistry and taphonomy of the early Cretaceous Crystal Geyser Dinosaur Quarry, east-central Utah. *Palaios* **22**, 500-512.
- Sullivan K. et al. (2020) Copper Isotopic Analysis in Geological and Biological Reference Materials by MC-ICP-MS. *Geostand. Geoanalytical Res.* **44**, 349-362.
- Sullivan K. V. (2020) Isotope geochemistry of copper and zinc in the geosphere and biosphere THE GEOSPHERE AND BIOSPHERE. Queen's University Kingston, Kingston, Ontario, Canada.
- Svensen H. et al. (2009) Siberian gas venting and the end-Permian environmental crisis. *Earth Planet. Sci. Lett.* **277**, 490-500.
- Tacail T. et al. (2014) A simplified protocol for measurement of Ca isotopes in biological samples. *J. Anal. At.*

*Spectrom.* **29**, 529-535.

- Tacail T. et al. (2017) Assessing human weaning practices with calcium isotopes in tooth enamel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 6268-6273.
- Tacail T. (2017) Calcium isotope physiology in mammals. PhD thesis. Université de Lyon.
- Tacail T. et al. (2019) Calcium isotopic patterns in enamel reflect different nursing behaviors among South African early hominins. *Sci. Adv.* **5**, eaax3250.
- Tacail T. et al. (2021) Quantifying the evolution of animal dairy intake in humans using calcium isotopes. *Quat. Sci. Rev.* **256**, 106843.
- Tacail T., Le Houedec S. et Skulan J. L. (2020) New frontiers in calcium stable isotope geochemistry: Perspectives in present and past vertebrate biology. *Chem. Geol.* **537**, 119471.
- Tacail T., Télouk P. et Balter V. (2016) Precise analysis of calcium stable isotope variations in biological apatites using laser ablation MC-ICPMS. *J. Anal. At. Spectrom.* **31**, 152-162.
- Tanz N. et Schmidt H.-L. (2010)  $\delta^{34}\text{S}$ -Value Measurements in Food Origin Assignments and Sulfur Isotope Fractionations in Plants and Animals. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 3139-3146.
- Taylor H. P. et Sheppard S. M. F. (1986) IGNEOUS ROCKS : I . PROCESSES of ISOTOPIC FRACTIONATION and ISOTOPE SYSTEMATICS. In *Stable isotopes in high temperature geological processes* Walter de Gruyter GmbH & Co KG. p. 227-271.
- Tejada-Lara J. V. et al. (2018) Body mass predicts isotope enrichment in herbivorous mammals. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **285**, 20181020.
- Terrill D. F., Henderson C. M. et Anderson J. S. (2020) New application of strontium isotopes reveals evidence of limited migratory behaviour in Late Cretaceous hadrosaurs. *Biol. Lett.* **16**, 20190930.
- Thomas B. et Taylor S. (2019) Proteomes of the Past : the pursuit of proteins in paleontology. *Expert Rev. Proteomics* **16**, 881-895.
- Thomas J. et al. (2017) The platypus nest: Burrow structure and nesting behaviour in captivity. *Aust. J. Zool.* **65**, 347-356.
- Thomas J. L. et al. (2020) Maternal care of platypus nestlings (*Ornithorhynchus anatinus*). *Aust. Mammal.* **42**, 283-292.
- Thulborn T. et Turner S. (2003) The last dicynodont: An Australian cretaceous relict. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **270**, 985-993.
- Trayler R. B. et Kohn M. J. (2017) Tooth enamel maturation reequilibrates oxygen isotope compositions and supports simple sampling methods. *Geochim. Cosmochim. Acta* **198**, 32-47.
- Triplett A. A. et al. (2005) Expression of the whey acidic protein (Wap) is necessary for adequate nourishment of the offspring but not functional differentiation of mammary epithelial cells. *Genesis* **43**, 1-11.
- Trott J. F. et al. (2003) Maternal Regulation of Milk Composition , Milk Production , and Pouch Young Development During Lactation in the Tammar Wallaby (*Macropus eugenii*). *Biol. Reprod.* **68**, 929-936.
- Trueman C. N. (2013) Chemical taphonomy of biomineralized tissues. *Palaeontology* **56**, 475-486.
- Trueman C. N. et al. (2006) High-resolution records of location and stratigraphic provenance from the rare earth element composition of fossil bones. *Geochim. Cosmochim. Acta* **70**, 4343-4355.
- Trueman C. N. (1999) Rare earth element geochemistry and taphonomy of terrestrial vertebrate assemblages. *Palaios* **14**, 555-568.
- Trueman C. N. G. et al. (2004) Mineralogical and compositional changes in bones exposed on soil surfaces in Amboseli National Park, Kenya: Diagenetic mechanisms and the role of sediment pore fluids. *J. Archaeol. Sci.* **31**, 721-739.
- Tsutaya T. et Yoneda M. (2013) Quantitative Reconstruction of Weaning Ages in Archaeological Human Populations Using Bone Collagen Nitrogen Isotope Ratios and Approximate Bayesian Computation. *PLoS*

- Tsutaya T. et Yoneda M. (2015) Reconstruction of breastfeeding and weaning practices using stable isotope and trace element analyses: A review. *Am. J. Phys. Anthropol.* **156**, 2-21.
- Tyndale-Biscoe C. H. et al. (1988) *The developing marsupial - Models for biomedical research*. éd. C. H. Tyndale-Biscoe et P. A. Janssens, Springer-Verlag.
- Urashima T. et al. (2012) The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk. *Adv. Nutr.* **3**, 473-482.
- Urashima T., Messer M. et Oftedal O. T. (2014) Comparative Biochemistry and Evolution of Milk Oligosaccharides of Monotremes, Marsupials, and Eutherians. In *Evolutionary Biology: Genome Evolution, Speciation, Coevolution and Origin of Life* (éd. P. Pontarotti). Springer. p. 3-33.
- Vogel J. (1978) Isotopic assessment of the dietary habits of ungulates. *S. Afr. J. Sci.* **74**, 298-301.
- Vorbach C., Capocchi M. R. et Penninger J. M. (2006) Evolution of the mammary gland from the innate immune system? *BioEssays* **28**, 606-616.
- Waelbroeck C. et al. (2002) Sea-level and deep water temperature changes derived from benthic foraminifera isotopic records. *Quat. Sci. Rev.* **21**, 295-305.
- Wald C. et Wu C. (2010) Of Mice and Women: The Bias in Animal Models. *Science* **327**, 1571-1572.
- Wang Y. et Cerling T. E. (1994) A model of fossil tooth enamel and bone diagenesis: implications for stable isotope studies and paleoenvironment reconstruction. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **107**, 281-289.
- Wanyonyi S. S. et al. (2013) The extracellular matrix locally regulates asynchronous concurrent lactation in tamar wallaby (*Macropus eugenii*). *Matrix Biol.* **32**, 342-351.
- Ward P. D. et al. (2001) Sudden productivity collapse associated with the Triassic-Jurassic boundary mass extinction. *Science* **292**, 1148-1151.
- Weber K. et al. (2021) Diagenetic stability of non-traditional stable isotope systems (Ca, Sr, Mg, Zn) in teeth – An in-vitro alteration experiment of biogenic apatite in isotopically enriched tracer solution. *Chem. Geol.* **572**, 120196.
- Weisbecker V. et Beck R. M. D. (2015) Marsupial and Monotreme Evolution And Biogeography. In *Marsupials and monotremes: Nature's enigmatic mammals* (éd. A. Klieve, L. Hogan, S. Johnston, et P. Murray). Nova Science. p. 1-31.
- Weyer S. et Schwieters J. B. (2003) High precision Fe isotope measurements with high mass resolution MC-ICPMS. *Int. J. Mass Spectrom.* **226**, 355-368.
- White C. D. et al. (2000) Testing the nature of Teotihuacán imperialism at Kaminaljuyú using phosphate oxygen-isotope ratios. *J. Anthropol. Res.* **56**, 535-558.
- White C., Longstaffe F. J. et Law K. R. (2004) Exploring the effects of environment, physiology and diet on oxygen isotope ratios in ancient Nubian bones and teeth. *J. Archaeol. Sci.* **31**, 233-250.
- Whitney M. R. et Sidor C. A. (2019) Histological and developmental insights into the herbivorous dentition of tapinocephalid therapsids. *PLoS One* **14**, e0223860.
- Wible J. R. et al. (2007) Cretaceous eutherians and Laurasian origin for placental mammals near the K/T boundary. *Nature* **447**, 1003-1006.
- Wieser M. E. et al. (2004) High precision calcium isotope ratio measurements using a magnetic sector multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometer. *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 844-851.
- Williams J. S., White C. D. et Longstaffe F. J. (2005) Trophic level and macronutrient shift effects associated with the weaning process in the postclassic maya. *Am. J. Phys. Anthropol.* **128**, 781-790.
- Wilson E. O. et MacArthur R. H. (1967) *The theory of island biogeography*. Princeton University Press.
- Wing S. L., Alroy J. et Hickey L. J. (1995) Plant and mammal diversity in the Paleocene to early Eocene of the Bighorn Basin. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **117**, 117-155.

- Wopenka B. et Pasteris J. D. (2005) A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Mater. Sci. Eng. C* **25**, 131-143.
- Wright C. C. (2014) Calcium isotopes in sheep dental enamel: a new approach to studying weaning and dairying in the archaeological record. PhD thesis, University of Oxford.
- Wright L. E. et Schwarcz H. P. (1998) Stable carbon and oxygen isotopes in human tooth enamel: Identifying breastfeeding and weaning in prehistory. *Am. J. Phys. Anthropol.* **106**, 1-18.
- Zachos F. E. et al. (2018) Mammalian evolution, diversity and systematics (Handbook of zoology). In (éd. F. E. Zachos et R. J. Asher). Walter de Gruyter GmbH & Co KG, Berlin/Boston. p. 1-381.
- Zachos J. C., Arthur M. A. et Dean W. E. (1989) Geochemical evidence for suppression of pelagic marine productivity at the Cretaceous/Tertiary boundary. *Nature* **337**, 61-64.
- Zazzo A., Lécuyer C. et Mariotti A. (2004) Experimentally-controlled carbon and oxygen isotope exchange between bioapatites and water under inorganic and microbially-mediated conditions. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**, 1-12.
- Zhang W. et al. (2019) In situ calcium isotopic ratio determination in calcium carbonate materials and calcium phosphate materials using laser ablation-multiple collector-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Chem. Geol.* **522**, 16-25.
- Zhao Y. et Simon J. I. (2019) Calcium isotope determination with the Nu Sapphire Dual-Path MC-ICP-MS. In *Goldschmidt abstracts* p. 3976.
- Zhou Y. et al. (2021) Platypus and echidna genomes reveal mammalian biology and evolution. *Nature* **592**, 756-762.
- Zhu H. et al. (2020a) Calcium isotopic fractionation during plate subduction: Constraints from back-arc basin basalts. *Geochim. Cosmochim. Acta* **270**, 379-393.
- Zhu H. et al. (2020b) Significant  $\delta^{44/40}\text{Ca}$  variations between carbonate- and clay-rich marine sediments from the Lesser Antilles forearc and implications for mantle heterogeneity. *Geochim. Cosmochim. Acta* **276**, 239-257.
- Zinner E. (1998) Stellar nucleosynthesis and the isotopic composition of presolar grains from primitive meteorites. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **26**, 147-188.





## **Annexe A – Article**

*Calcium isotopes offer clues on resource partitioning among Cretaceous predatory dinosaurs*

## Research



**Cite this article:** Hassler A, Martin JE, Amiot R, Tacail T, Godet FA, Allain R, Balter V. 2018 Calcium isotopes offer clues on resource partitioning among Cretaceous predatory dinosaurs. *Proc. R. Soc. B* **285**: 20180197.  
<http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2018.0197>

Received: 25 January 2018

Accepted: 15 March 2018

**Subject Category:**

Palaeobiology

**Subject Areas:**

palaeontology, ecology, evolution

**Keywords:**

ecology, Cretaceous terrestrial ecosystems, dinosaurs, calcium isotopes, spinosaurs, palaeodiet

**Author for correspondence:**

J. E. Martin

e-mail: jeremy.martin@ens-lyon.fr

Electronic supplementary material is available online at <https://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.c.4037588>.

# Calcium isotopes offer clues on resource partitioning among Cretaceous predatory dinosaurs

A. Hassler<sup>1</sup>, J. E. Martin<sup>1</sup>, R. Amiot<sup>1</sup>, T. Tacail<sup>1</sup>, F. Arnaud Godet<sup>1</sup>, R. Allain<sup>2</sup> and V. Balter<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ. Lyon, ENS de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR 5276 Laboratoire de Géologie de Lyon: Terre, Planètes, Environnement, F-69007 46 Allée d'Italie, Lyon, France

<sup>2</sup>Sorbonne Universités—CR2P—MNHN, CNRS, UPMC-Paris 6, Muséum National d'Histoire Naturelle, 57 Rue Cuvier, CP 38, 75231 Paris Cedex 05, France

**ID** AH, 0000-0003-3004-4680; JEM, 0000-0001-9159-645X; RA, 0000-0003-2779-9652; TT, 0000-0002-4690-8132; VB, 0000-0002-9236-4834

Large predators are overabundant in mid-Cretaceous continental dinosaur assemblages of North Africa. Such unbalanced ecosystem structure involves, among predatory dinosaurs, typical abelisaurid or carcharodontosaurid theropods co-occurring with long-snouted spinosaurids of debated ecology. Here, we report calcium (Ca) isotope values from tooth enamel (expressed as  $\delta^{44/42}\text{Ca}$ ) to investigate resource partitioning in mid-Cretaceous assemblages from Niger (Gadoufaoua) and Morocco (Kem Kem Beds). In both assemblages, spinosaurids display a distinct isotopic signature, the most negative in our dataset. This distinct taxonomic clustering in Ca isotope values observed between spinosaurids and other predators provides unambiguous evidence for niche partitioning at the top of the trophic chains: spinosaurids foraged on aquatic environments while abelisaurid and carcharodontosaurid theropods relied almost exclusively on terrestrial resources.

## 1. Introduction

Dietary inference in extinct vertebrates allows for addressing the structure of extinct food webs and remains critical for understanding how ecosystems evolved with time and environmental changes. In modern ecosystems, the trophic cascade concept [1] illustrates the complex role of top carnivores in regulating, directly and indirectly, populations from subsequent trophic levels. By modulating the intensity of resource exploitation (top-down), along with productivity feedback loops (bottom-up), top predators can shape the structure of ecosystems. However, reconstructing long extinct ecosystems, such as those of the Mesozoic, remains challenging because taxa with unknown ecology and physiology dominated the scene.

In contrast with modern mammalian continental ecosystems where herbivores represent most of the biomass of vertebrates, large predatory theropod dinosaurs were overabundant in mid-Cretaceous continental biotas of North Africa. The origin and the significance of this overabundance is debated [2,3], but recent studies have highlighted the peculiar nature of such predator-dominated ecosystems [4,5]. These faunas include very large theropods such as abelisaurids, carcharodontosaurids and spinosaurids, which are all considered as having high food requirements owing to their elevated metabolic rates [6,7]. Their high abundance relative to herbivorous dinosaurs thus raises questions about how resources could be partitioned between them. Because of their remarkable anatomy, spinosaurids have attracted attention with previous work inferring a semi-aquatic lifestyle [7,8] associated with a diverse diet [4,5,9–18], although the respective proportions of feeding sources, whether terrestrial or aquatic, remain unknown. Indeed, if for some spinosaurids, trophic links can be assessed using direct evidence like stomach content and

feeding marks [10,16], such fossils remain rare and account for a short time window. Morphology can also provide a wealth of data concerning potential trophic links, but interpretations remain hypothetical owing to the lack of modern analogues for spinosaurids and their ecosystem. The jaw morphology of spinosaurids has been repeatedly, albeit inexactly, considered analogous to that of crocodiles [14,15] and has recently been compared to that of pike conger eels [18], reflecting some uncertainty in palaeoecological inference when considering morphological evidence alone [19]. In this context, we investigate diet and resource partitioning among mid-Cretaceous Saharan vertebrates using calcium (Ca) isotopes ( $\delta^{44/42}\text{Ca}$ ) of tooth enamel and scale ganoine, a method that has previously proved informative both in modern [20–22] and fossil vertebrate assemblages [22–25]. Because Ca is almost exclusively derived from food among terrestrial vertebrates [20], the systematic change between the isotopic signature of their food relative to their mineralized tissues allows inference of trophic levels and diet. Moreover, Ca is the major constituent of the mineral phase of bone and tooth enamel, i.e. hydroxylapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ ), which gives the method two main advantages. First, the diagenetic overprinting of biogenic Ca is unlikely to occur, providing that secondary carbonates are absent or have been leached accordingly [23]. Second, minute amounts of bone or tooth enamel sample (approx. 100  $\mu\text{g}$ ) are sufficient for a routine measurement of the Ca isotopic ratios. The technique is thus applicable to precious fossils with minimal damage.

Our study is focused on fossils from the Aptian–Albian fluvial deposits of Gadoufaoua (Niger, approx. 113 Ma ago) [26] and of the Cenomanian Kem Kem Beds (Morocco, approx. 100 Ma ago) [27]. In these vertebrate assemblages, crocodylomorphs, spinosaurids and non-spinosaurid theropods are overabundant relative to herbivorous dinosaurs [11,26,27], making them typical examples of North African mid-Cretaceous ecosystems. Despite age differences, the two deposits share similarities in their environmental context and host a comparable diversity of vertebrates. The analysed specimens include fishes, crocodylomorphs, pterosaurs, herbivorous (sauropods, ornithopods) and predatory (theropod) dinosaurs, including spinosaurids. Fossils of the spinosaurids *Suchomimus tenerensis* and *Cristatusaurus lapparenti* [11,12] are found in Gadoufaoua, where predators such as the non-spinosaurid theropods *Kryptops palaios* and *Eocarcharia dinops* [28] occur. In the Kem Kem Beds, the spinosaurids *Spinosaurus aegyptiacus* and *Sigilmassasaurus brevicollis* [7,13,29] are associated with fossils of non-spinosaurid theropods such as *Carcharodontosaurus saharicus* [27].

## 2. Material and methods

### (a) Sample collection

Samples comprising 73 tooth enamel, enameloid and fish scale ganoine from the early to middle Cretaceous of Morocco and Niger have been analysed for elemental concentration and Ca isotope composition. Niger samples, totalling seven taxa, come from the locality of Gadoufaoua belonging to the Aptian/Albian Elrhaz Formation [26]. They consist of eight spinosaurid theropod teeth (*S. tenerensis* or *C. lapparenti*), nine non-spinosaurid theropod teeth (cf. *K. palaios* and cf. *E. dinops*), two teeth of the sauropod *Nigersaurus taqueti*, nine teeth of the ornithopod *Ourosaurus nigeriensis*, eight teeth of the pholidosaurid

crocodylomorph *Sarcosuchus imperator*, three teeth tentatively referred to the notosuchian crocodylomorph cf. *Araripesuchus* sp., three teeth tentatively referred to an indeterminate large pterosaur, five teeth referred to an indeterminate pycnodont fish, two scales of an indeterminate lepisosteiform fish and one scale attributed to the lepisosteiform fish *Pliodetes* sp.

Moroccan samples previously analysed for their apatite oxygen and carbon isotope compositions [7] come from three localities (Bou Laâlou, Jebel Al Qabla and Takemout) from the early Cenomanian Ifezouane Formation of the Kem Kem Beds [27]. They consist of seven teeth attributed to non-spinosaurid theropods (four teeth of *C. saharicus*, and three teeth of an indeterminate large theropod), eight teeth referred to the spinosaurid theropods *Sp. aegyptiacus* or *Si. brevicollis*, three teeth of an indeterminate crocodylomorph, three teeth of an indeterminate large pterosaur, one scale of the amiiform fish *Stromerichthys* sp. and one tooth plate of the lungfish *Neoceratodus africanus*.

Here, we investigate dietary and ecological aspects using the Ca isotope composition of tooth enamel, enameloid and scale ganoine ( $\delta^{44/42}\text{Ca}$ ) rather than bone or dentine, which are porous and incorporate secondary diagenetic minerals. These biological materials are compact and resistant to diagenetic alteration [24]. Sampling was performed using a handled micro-drill (8200 Dremel with tungsten steel solid carbide bit and diamond burr), a micro-drill station (MicroMill with tungsten steel solid carbide bit and diamond burr), and a scalpel made in stainless steel. Tooth enamel, enameloid and scale ganoine have been carefully separated from dentine and sediment using these tools.

### (b) Analytical techniques

Fossil samples were placed in Teflon beakers and dissolved in 500  $\mu\text{l}$  of ultrapure nitric acid (15 N) at 130°C during 1 h. Following this attack, samples were dried out, then dissolved in a dilute solution of ultrapure nitric acid (0.5 N).

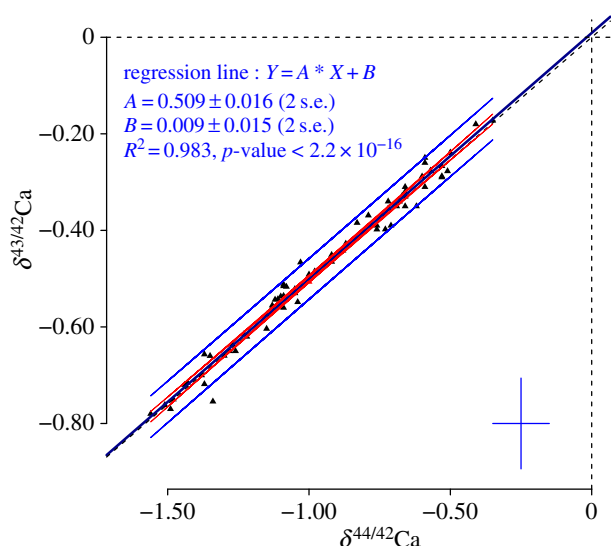
A fraction of the solutions was measured for elemental concentrations of trace elements (rare earth elements (REE), strontium (Sr) and barium (Ba)) and major elements (such as Ca, magnesium (Mg) and phosphorus (P)). These measurements were performed on an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) (7500 Series ICP-MS, Agilent Technologies) for trace elements, and on an inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (ICAP 6000 Series ICP spectrometer, Thermo Electron Corporation) for major elements. The reliability of measurements has been controlled through a set of blanks and standards (see measures NIST-SRM1400, USGS-MAPS-4 and USGS-MAPS-5 in the electronic supplementary material, table S1).

Ca from samples was chemically purified following previously described protocols [30]. Briefly, samples were dissolved in double distilled HCl and loaded onto columns filled with AG 50WX-12, separated from matrix including phosphates. Ca, collected together with Sr, is then further processed in  $\text{HNO}_3$  medium using Eichrom Sr-specific resin, allowing removal of Sr. The reliability of elutions have been controlled by processing and analysing standard materials (see measures of NIST-SRM1486 in the electronic supplementary material, table S1).

Ca isotope abundance ratios ( $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$ ) were measured using a Neptune Plus multi-collector ICP-MS (MC-ICP-MS) following previously described methods [30,31]. After purification, Ca samples were dissolved in ultrapure 0.05 N  $\text{HNO}_3$  and Ca concentration was set at 2 mg  $\text{l}^{-1}$  for all samples and standards. All Ca isotope compositions are expressed using the ‘delta’ notation defined as follows:

$$\delta^{44/42}\text{Ca} = \left( \left( \frac{(^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca})_{\text{sample}}}{(^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca})_{\text{ICP Ca Lyon}}} \right) - 1 \right) \times 1000,$$

where  $(^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca})_{\text{sample}}$  and  $(^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca})_{\text{ICP Ca Lyon}}$  are the Ca



**Figure 1.** Three isotopes plot:  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  as a function of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  (‰, reference standard ICP Ca) for all samples and standards analysed for Ca isotope compositions in this study. Ca isotope compositions fall on a line with a  $y$ -axis intercept of  $0.009 \pm 0.015$  (‰, 2 s.e.), indistinguishable from theoretical 0‰ intercept. The slope value of this line is  $0.509 \pm 0.016$  (2 s.e.), indistinguishable from the 0.507 slope predicted by the exponential mass-dependent fractionation law. Error bars at the bottom right are average 2 s.d. for  $\delta^{43/42}\text{Ca}$  and  $\delta^{44/42}\text{Ca}$ . The two most external lines delimit the prediction interval, and the two lines accompanying the middle line correspond to the 95% confidence interval of the regression line. (Online version in colour.)

isotope abundance ratios measured in sample and ICP Ca Lyon reference standard, respectively. The ICP Ca Lyon standard, used as a bracketing standard, is a Specpure Ca plasma standard solution (Alfa Aesar) previously described here: [22,23,30–32]. The SRM1486 cow bone meal standard (NIST) was used as secondary standard, in order to assess the accuracy of analytical procedure, including chemical purification.

### (c) Monitoring of the isotopic measurement accuracy

Blanks realized during purification protocols have been analysed with the MC-ICP-MS. All blanks contained less than 85 ng of Ca, which is 470 times less than the Ca contained in samples. Thus, this nano-pollution does not alter the isotopic measurements of our samples, considering our measurement precision.

The mass dependency curve of the isotopic measures follows the expected relation for Ca (figure 1), with a slope value of  $0.509 \pm 0.016$  (2 s.e.,  $n = 74$ ) [22,23,25,30–32], supporting the accuracy of the measures.

Measurements collected for the standard SRM1486 exhibit a  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  of  $-1.00 \pm 0.10$ ‰ (2 s.d.,  $n = 32$ ), which is in the range of previously published data for this standard:  $-0.96 \pm 0.14$ ‰ (2 s.d.,  $n = 17$ ) [30],  $-1.04 \pm 0.11$ ‰ (2 s.d.,  $n = 25$ ) [22],  $-1.03 \pm 0.13$ ‰ (2 s.d.,  $n = 120$ ) [31],  $-1.03 \pm 0.12$ ‰ (2 s.d.,  $n = 147$ ) [32].

### (d) Diet modelling

In order to perform diet inferences with Ca isotope data, we make use of our data to feed a simple diet mixing model. This model provides estimates of the relative contribution of Ca sources in the diet of predators thanks to  $\delta^{44/42}\text{Ca}$ . Two main parameters need to be constrained prior to using it.

First, the isotopic signature of Ca sources needs to be constrained for studied animals. Ca is more concentrated in mineralized tissues (bone, enamel, scale ganoine) than in soft tissues or in water. Thus, it has been shown that even a few per cent

of mineralized tissues in diet was sufficient to constitute the major source of Ca for organisms [24]. There is fossil evidence of bone and fish scale consumption among numerous taxa of crocodylomorphs, spinosaurid and non-spinosaurid theropods [10,33]. Thus, even if this consumption can be restricted to occasional events such as feeding on juveniles for bones, the high concentration of Ca in mineralized tissues supports that these tissues were most likely the main source of Ca among these taxa. Moreover, considering the heterogeneity of modern animal data on soft tissues [20,30,34], and that blood can exhibit  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  close to bones [30], this supports the use of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of mineralized tissues as representative of the main source of Ca for predators in our model. We have collected Ca isotope data for herbivorous dinosaurs and fishes from Gadoufaoua, which represent the most likely prey of the analysed apex predators (crocodylomorphs, spinosaurid and non-spinosaurid theropods). Thus, we have constrained the isotopic signature of the potential Ca sources to be entered in the model.

Second, our model needs an estimate of the isotopic shift between Ca from food and teeth of the predators. According to data collected on a variety of extant vertebrates (chicken, horse, seal, deer, minipigs, sheep and mouse [20,30,34]), the mean isotopic shift between Ca from diet to bones is  $0.57 \pm 0.10$ ‰ (2 s.e.,  $n = 21$ ) and is relatively homogeneous among these vertebrates. Thus, considering that the studied predators are phylogenetically close (all are archosaurs) and that all of them share comparable Ca-cycles [20], we can reasonably assume that they exhibited a similar diet-bone isotopic offset. Only limited data have been collected on diet and enamel couples in modern faunas. Some studies show differences between these two shifts ( $\pm 0.2$ ‰; [22–24,30,35]), but these studies are often conducted on mammals, whose teeth formed in early life, and thus were not representative of the adult diet for which the comparison is made. However, in human wisdom teeth, which developed along with an adult diet, the isotopic shift between enamel and food is similar to the diet-bone shift of  $-0.57 \pm 0.10$ ‰ (2 s.e.,  $n = 21$ ) [32]. Based on these results, we assume a similar diet-enamel shift among studied taxa, and use this shift to estimate the  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value of the food of predators. We thus applied this model to *S. imperator*, spinosaurid and non-spinosaurid theropods, in order to investigate the proportion of fish and herbivorous dinosaurs in the diet of these predators.

We estimate the Ca source fractions using the estimation of food  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  between the first and the third quartile of each population of predators, considering that it is more representative of their general diet. Moreover, to take into account the variability of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values among sources, these fractions are calculated as if predators with the most depleted  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values fed on fishes and herbivorous dinosaurs with the most enriched  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values, and vice versa. In this way, we maximized the source fraction scattering, which sets the limit of diet inferences achievable with our model.

## 3. Results

### (a) Elemental concentrations

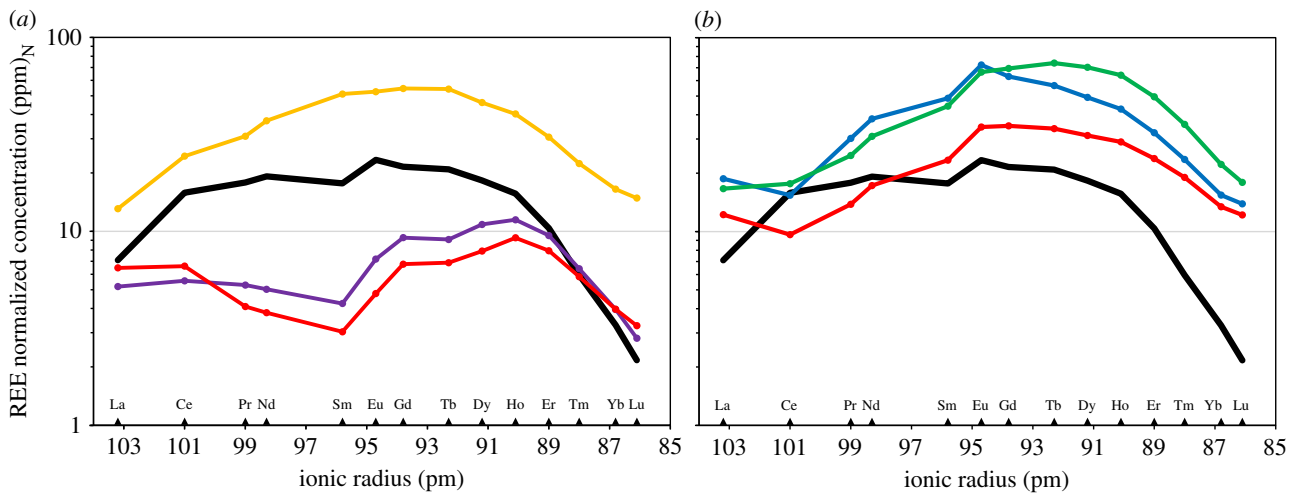
The full dataset compiling all the elemental concentrations measured in this study is reported in the electronic supplementary material, table S1.

Among important results, the mean Ca versus P ratio is of  $2.3 \pm 0.1$  (1 s.d.).

### (b) Calcium isotope ratios

The full dataset compiling all the Ca isotopic ratios measured in this study is reported in the electronic supplementary material, table S1. The  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of vertebrates from





**Figure 2.** (a) PAAS normalized REE profiles of fossil bioapatite from the Aptian–Albian of Gadoufaoua, Niger. Concentrations are plotted on a logarithmic scale. Plain black line, typical REE profile at Gadoufaoua; yellow line, exotic profile of sample GCA5; purple line, exotic profile of sample GSA7; red line, exotic profile of sample GSP3. (b) PAAS normalized REE profiles of fossil bioapatite from the Cenomanian of Kem Kem Beds, Morocco. Concentrations are plotted on a logarithmic scale. For comparison, the plain black line represents the typical REE profile at Gadoufaoua; yellow line, typical profile of samples from the locality of Jebel Al Qabla; blue line, typical profile of samples from the locality of Bou Laâlou; red line, typical profile of samples from the locality of Takemout.

Gadoufaoua range between  $-0.35$  and  $-1.51\%$  with a mean 2 s.d. of  $0.10\%$ . In this locality, the sauropod *N. taqueti* is the taxon which exhibits the highest  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  with a mean value of  $-0.43 \pm 0.11\%$  (2 s.d.,  $n = 2$ ), whereas the spinosaurids exhibit the lowest values with  $-1.30 \pm 0.15\%$  (2 s.d.,  $n = 8$ ). Among the other dinosaurs, the ornithomimid *O. nigeriensis* exhibits values at  $-0.56 \pm 0.05\%$  (2 s.d.,  $n = 9$ ), whereas non-spinosaurid theropods exhibit values at  $-0.94 \pm 0.16\%$  (2 s.d.,  $n = 9$ ). The small, supposedly terrestrial crocodylomorph, cf. *Araripesuchus* sp., exhibits a mean value of  $-1.12 \pm 0.05\%$  (2 s.d.,  $n = 3$ ), whereas for the semi-aquatic crocodylomorph *S. imperator*, this value is of  $-1.12 \pm 0.13\%$  (2 s.d.,  $n = 8$ ). For fishes, the mean values are of  $-0.74 \pm 0.02\%$  (2 s.d.,  $n = 2$ ) for indeterminate Lepisosteiformes, of  $-0.67\%$  ( $n = 1$ ) for *Pliodetes* sp., and of  $-1.08 \pm 0.04\%$  (2 s.d.,  $n = 5$ ) for Pycnodontiformes. Finally, pterosaurs exhibit a mean value of  $-0.78 \pm 0.05\%$  (2 s.d.,  $n = 3$ ). The  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  of spinosaurid theropods is significantly lower than that of non-spinosaurid theropods (Wilcoxon's rank-sum test:  $p$ -value =  $9.9 \times 10^{-4}$ ).

The  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of Kem Kem Beds vertebrates range between  $-0.41$  and  $-1.56\%$  with a mean 2 s.d. of  $0.09\%$ . In Kem Kem Beds, the lungfish *Ne. africanus* is the taxon which exhibits the highest  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  with a value of  $-0.41\%$  ( $n = 1$ ), whereas the other fish *Stromerichthys* sp. exhibits a low value of  $-1.26\%$  ( $n = 1$ ). Spinosaurids exhibit the lowest mean value of this fauna, which is  $-1.39 \pm 0.27\%$  (2 s.d.,  $n = 8$ ). For large non-spinosaurid theropods (*C. saharicus* and indeterminate theropods), this value is of  $-0.64 \pm 0.13\%$  (2 s.d.,  $n = 7$ ). Semi-aquatic indeterminate crocodylomorphs exhibit a mean value of  $-0.66 \pm 0.09\%$  (2 s.d.,  $n = 3$ ), and indeterminate pterosaurs from the family Anhangueridae exhibit a mean value of  $-0.67 \pm 0.17\%$  (2 s.d.,  $n = 3$ ). The  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  of spinosaurids is significantly lower than for non-spinosaurid theropods (Wilcoxon rank-sum test:  $p$ -value =  $3.1 \times 10^{-4}$ ).

### (c) Fractions of calcium sources in diet

With our diet mixing model, we estimate that the maximum Ca fraction from fishes in the diet reaches 30%, 58% and 100% for non-spinosaurid theropods, *S. imperator* and spinosaurids,

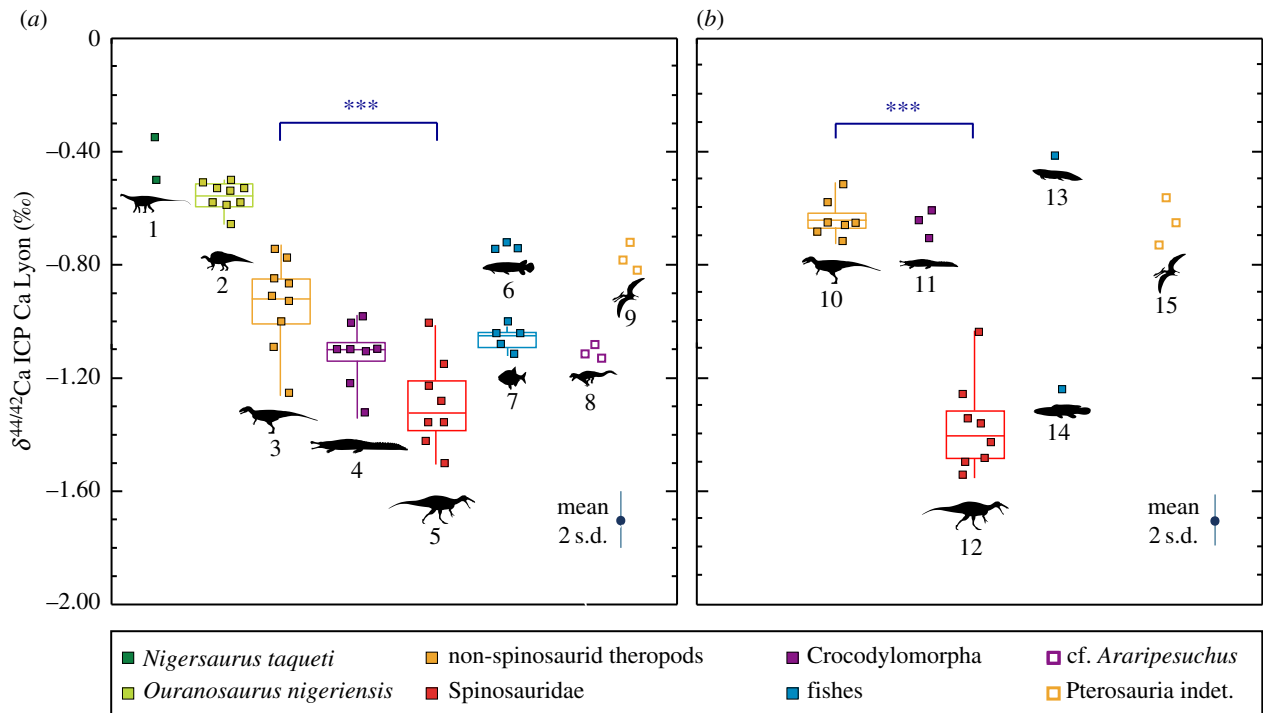
respectively. On the other hand, the maximum Ca fraction from herbivorous dinosaurs in the diet reaches 100% for all of these predators. The maximum Ca fraction derived from fishes reaches 100% for six of the eight studied spinosaurid individuals according to this model, which is possible for only two individuals of *S. imperator* and one non-spinosaurid theropod. However, the maximum Ca fraction derived from herbivorous dinosaurs is also 100% for four of the eight spinosaurid individuals.

## 4. Discussion

### (a) Diagenesis

Enamel, ganoine and to a lesser extent enameloid tissues, are highly mineralized and exhibit a lower porosity than dentine or bone. They have a limited exchange surface with surrounding fluids and sediment, and for this reason, they are considered resistant to diagenesis [23,24,36]. Moreover, with almost 40% of their mass constituted of Ca, it is very unlikely that the Ca isotopic signature of these tissues can be entirely overprinted during early diagenetic processes. The Ca/P ratios measured for samples (electronic supplementary material, table S1) exhibit values of  $2.3 \pm 0.1$  (1 s.d.), which are close to those measured in modern animals [37]. This supports that Ca isotope ratios from these fossils have not been extensively modified during diagenesis.

Quantifying elemental concentration of non-essential trace elements such as REE and of major elements such as Ca and P can provide information on both the autochthony and diagenetic alteration [38,39]. Among fossils from Gadoufaoua, REE enrichment profiles (normalized to the Post-Archean Australian Shale, PAAS) exhibit a similar shape with different REE enrichment intensity (figure 2a; electronic supplementary material, table S1). They can thus reasonably be considered as autochthonous [39]. Three teeth exhibit distinct REE profile shapes (figure 2a). They have thus been identified as allochthonous fossils and have not been considered in the palaeoecological discussion. The general REE profile at Gadoufaoua is 'hat shaped' according to the definition given



**Figure 3.**  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  data reported from Gadoufaoua (a) and Kem Kem Beds faunas (b). Groups representing at least five specimens are represented through boxplots, for which the middle line represents the median, the box limits correspond to the first and third quartiles, and the whiskers are extended between the maximum and the minimum  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values. The mean 2 s.d. of each measure is represented at the bottom right of each graph. The degree of significance of the difference between the theropod groups are represented with stars (\*), with three stars indicating a high significance (Wilcoxon rank-sum test:  $p$ -value  $< 0.001$ ). Taxonomic groups are identified by their number and represent: 1, *N. taqueti* ( $n = 2$ ); 2, *O. nigeriensis* ( $n = 9$ ); 3, non-spinosaurid theropods from Gadoufaoua ( $n = 9$ ); 4, *S. imperator* ( $n = 8$ ); 5, spinosaurids from Gadoufaoua ( $n = 8$ ); 6, Lepisosteiformes ( $n = 3$ ); 7, Pycnodontiformes indet. ( $n = 5$ ); 8, *cf. Araripesuchus* ( $n = 3$ ); 9, Pterosauria indet. ( $n = 3$ ); 10, non-spinosaurid theropods from Kem Kem Beds ( $n = 7$ ); 11, Crocodylomorpha indet. ( $n = 3$ ); 12, spinosaurids from Kem Kem Beds ( $n = 8$ ); 13, *Ne. africanus* ( $n = 1$ ); 14, *Stromerichthys* sp. ( $n = 1$ ); 15, Anhangueridae indet. ( $n = 3$ ).

by Reynard & Balter [38]. This shape, associated with measured lanthanum over ytterbium (La/Yb) ratio, and lanthanum over samarium (La/Sm) ratio (electronic supplementary material, table S1), differs from the REE profiles and ratios expected after extensive recrystallization processes during diagenesis [38,40].

Among fossils from the Kem Kem Beds, REE enrichment profiles (normalized to the PAAS) exhibit a distinct profile between the three studied localities (figure 2b; electronic supplementary material, table S1). However, within each locality, fossils exhibit similar REE profiles. They can thus reasonably be considered as autochthonous [39]. As for Gadoufaoua, the general ‘hat shaped’ REE profile of the Kem Kem Beds [38] and the measured La/Yb and La/Sm ratios (electronic supplementary material, table S1) are different from those expected for diagenetic recrystallization processes [38,40].

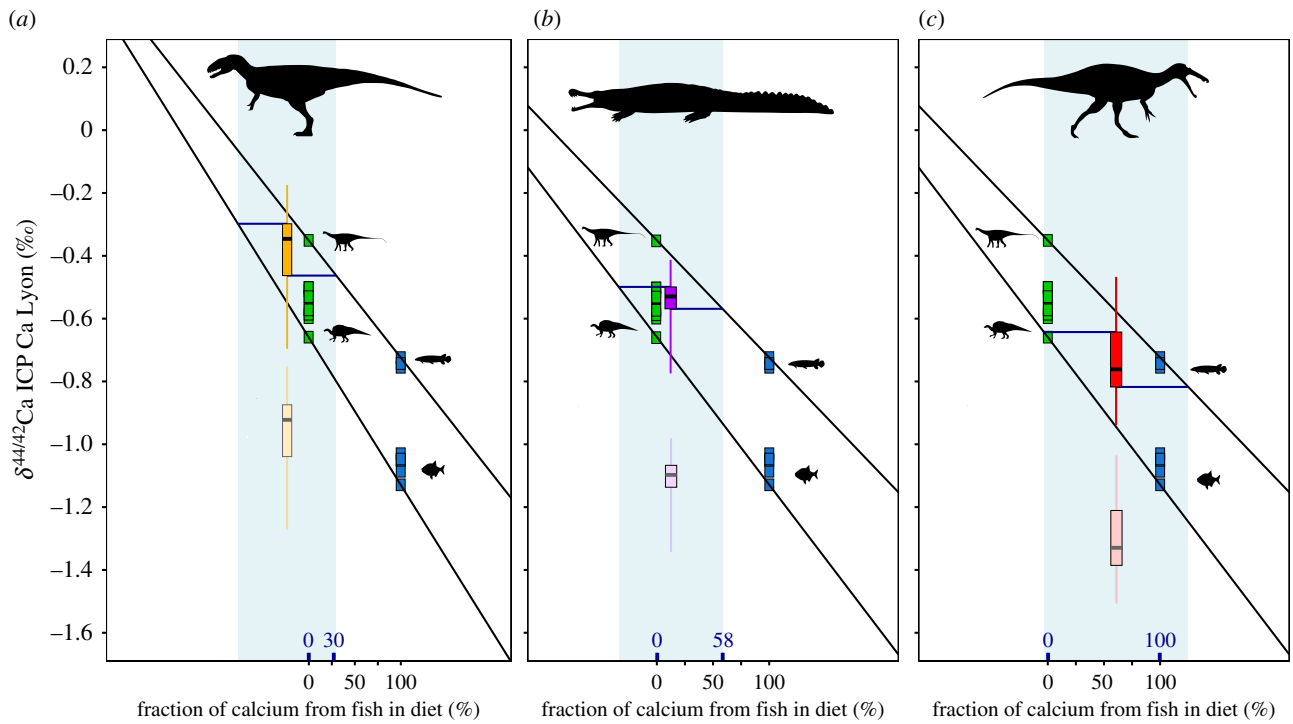
Thus, the Ca/P ratios and the REE concentrations jointly support the hypothesis that the Ca isotopic composition of the fossils have not been extensively affected by diagenesis. Moreover, taxa from Gadoufaoua exhibit  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values consistent with their putative ecology (figure 3a). Indeed, herbivorous dinosaurs represented by *N. taqueti* and *O. nigeriensis* exhibit the highest  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of this dataset, with values ranging between  $-0.35\text{‰} \pm 0.14$  (2 s.d.,  $n = 3$ ) and  $-0.66\text{‰} \pm 0.05$  (2 s.d.,  $n = 4$ ), respectively. Their potential predators (the pholidosaurid crocodylomorph *S. imperator*, spinosaurid and non-spinosaurid theropods) exhibit lower  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values, below  $-0.70\text{‰}$ . This isotopic distribution between herbivores and predators follows what has been observed in modern continental faunas [20], and

supports, along with the observations presented above, the biogenic nature of  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values.

### (b) Resource partitioning among predators

Compared to non-spinosaurid theropods, spinosaurids exhibit distinctly lower  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values (Wilcoxon rank-sum test:  $p$ -value =  $9.9 \times 10^{-4}$ ), the lowest ones of the dataset (figure 3a). This distinct pattern is also observed in the Kem Kem Beds of Morocco (figure 3b) with spinosaurids possessing significantly lower  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values compared to non-spinosaurid theropods (Wilcoxon rank-sum test:  $p$ -value =  $3.1 \times 10^{-4}$ ). Physiological homogeneity in Ca isotope fractionation from food to tooth enamel in these theropods is supported both by their phylogenetic proximity, all are archosaurs, and the observed homogeneity in modern vertebrates [20,30,34]. This pattern thus highlights the distinctive ecological niche of spinosaurids relative to the other theropods.

The trophic pyramid in these fluvial palaeo-ecosystems could have been supported both by herbivorous dinosaurs and fishes [4,5,26,27], which would represent two potential primary sources of Ca for predators. In Gadoufaoua, the Ca source constituted by herbivorous dinosaurs exhibits a higher  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  value than fishes, which allows discriminating potential dietary sources among predators. Using the diet model described (see Diet modelling) for the vertebrate assemblage of Gadoufaoua, we observed that the estimated fractions of Ca originating from herbivorous dinosaurs and fishes in the diet of predators do overlap between predators.



**Figure 4.** Mixing model of the Ca source for non-spinosaurid theropods (a) *S. imperator* (b) and spinosaurids (c) from the Gadoufaoua fauna.  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  data collected on herbivorous dinosaurs and fishes are represented, respectively, in green and blue squares. In each part of the figure, the faded lower boxplot represents the enamel  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values measured for each apex predator, whereas the dark upper boxplot represents the isotopic signature of their calcium source estimated to be shifted by  $+0.57\%$  from the signature of their enamel (see Diet modelling). Boxplots are yellow for non-spinosaurid theropods (a), violet for *S. imperator* (b) and red for spinosaurids (c). The line in the boxplot is equal to the median, boxes are limited by their first and third quartile, and whiskers represent the maximum and the minimum values. The estimated diet fraction range of Ca derived from the fish source are indicated in bold above the x-axis and expressed in per cent.

The important range of fraction between the maximum and minimum fraction estimated for each predator was expected considering the scattering of the  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  data from fishes, herbivorous dinosaurs and predators. However, even with this important scattering in isotopic values, the difference between spinosaurid and non-spinosaurid theropods remains statistically significant, implying distinct resource partitioning between these large predators. Here,  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  data support the idea that a majority of non-spinosaurid theropods mainly fed on herbivorous dinosaurs, with less than 30% of their Ca potentially stemming from fish sources (figure 4a). The giant crocodylomorph *S. imperator* exhibits an intermediate diet, possibly composed of both fishes and herbivorous dinosaurs (figure 4b). Moreover, if the diet of spinosaurid theropods potentially included a mix of fishes and herbivorous dinosaurs according to the model, these data also support that a majority of spinosaurids could be exclusively piscivorous (along with one non-spinosaurid theropod and two *S. imperator* individuals), and that half of them were at least partially piscivorous (figure 4c). Nevertheless, if this clearly illustrates that spinosaurids were the predators of Gadoufaoua which had the most piscivorous-oriented diet, this also leads to the conclusion that their diet was potentially a mix between fishes and herbivorous dinosaurs. Similarly, Kem Kem spinosaurids are also strongly depleted in heavy Ca, confirming a piscivorous diet in another fossil assemblage. In previous studies, several diets have been proposed for these groups of theropods. For spinosaurids, fish consumption inferred on the basis of the ecosystem structure [4,5], morphology [9,11,13–15,17,18] or direct fossil evidences [10] is thus supported by our dataset. The consumption of terrestrial prey, which is also proposed

in these papers, as well as the direct evidences related to this behaviour [10,16], also remain possible according to our data. In addition, the consumption of herbivorous dinosaurs that is commonly assumed for non-spinosaurid theropods [33], such as abelisaurids and carcharodontosaurids, is also supported by our dataset. The fraction of terrestrial prey in the diet of these theropods appears to be significantly higher than that of spinosaurids. However, whether these prey have been acquired through hunting [10,14,16,17], scavenging [10,14,16] or active fishing [9,10,13–15,17,18] cannot be assessed with our dataset.

In the model, for some non-spinosaurid theropod individuals, the inferred  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  signature of the diet is more positive than the source with the most positive  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values. Four non-mutually exclusive hypotheses could be proposed to explain this inconsistency. First of all, it can be owing to the absence of a heavier source of Ca in our dataset. One of the possibilities is that this heavy source indeed corresponds to an unidentified terrestrial taxon at the bottom of the food chain. Alternatively, it can correspond to *N. taqueti* mineralized tissues for which only two teeth have been measured, and which exhibit the highest  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values of the dataset. Another possibility is that this source of heavy isotopes of Ca comes from the digestion of carbonated gastroliths. The ingestion of gastroliths among dinosaurs has been documented thanks to comparisons with modern archosaurs and fossil evidence, notably for spinosaurids [10]. Because of the heavy Ca isotope composition of carbonates [34,41,42], this consumption could buffer the  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  towards  $^{44}\text{Ca}$ -enriched values among studied archosaurs. This could lead to an overestimation of the fraction of herbivorous dinosaurs in diets inferred from our mixing model, which could



explain the inconsistency with non-spinosaurid theropods in our model. The third hypothesis is that this inconsistency is the result of an overestimation of the diet-enamel shift, owing to the lack of data collected on modern archosaurs, which can also lead to an overestimation of the fraction of herbivorous dinosaurs in diets (values potentially shifted towards heavy Ca). However, none of these hypotheses is susceptible to change the conclusions made on the resource partitioning among these predators or to the more piscivorous-oriented diet of spinosaurids. Indeed, a validation of these hypotheses will imply a more piscivorous diet for all these predators, even providing more support to the piscivorous-oriented diet of spinosaurids.

## 5. Conclusion

Our data imply that the abundance of apex predators in these peculiar African mid-Cretaceous ecosystems can be sustained simultaneously by at least two main sources: fishes and herbivorous dinosaurs, resulting in a general abundance of prey. The present Ca isotope dataset also supports the ecological partitioning of potential predatory competitors [7,8]. Indeed, the different ecological specializations of these predators resulted in different mixtures between carnivorous and piscivorous habits and are likely to have reduced the ecological competition between them. Ca isotopes support the hypothesis of spinosaurids regarded as semi-aquatic predators [7,8] and adopting a piscivorous diet, with non-spinosaurid theropods having a more terrestrial ecology and diet, feeding mainly on herbivorous dinosaurs. This ecological partitioning, combined with the abundance of prey, is consistent with the observed high abundance of predators in these faunas [4,5].

The present study underlines a complex trophic structure relying on the interaction between aquatic and terrestrial environments. One of the key points for the sustainability of these palaeoecosystems was the piscivorous-oriented diet

of spinosaurids. Whether this ecological structure is a global feature among other mid-Cretaceous faunas is an open question ([7,10] and reference therein), but beyond this, Ca isotopes offer promising perspectives to study trophic structures in long extinct vertebrate assemblages.

**Data accessibility.** The dataset table compiling all elemental concentrations and isotopic ratio measurements is available as the electronic supplementary material.

**Authors' contributions.** The project was conceived by J.E.M., A.H., R.A.M., T.T., R.A.I. and V.B. R.A.M. and R.A.I. accessed samples for analysis. A.H. and J.E.M. sampled the specimens and conducted purification in the clean laboratory. A.H. and F.A.G. performed elemental concentration measurements. A.H., J.E.M. and T.T. performed MC-ICP-MS measurements. All authors discussed the results. The first draft version of the text was written by A.H. then subsequently, J.E.M., R.A.M., T.T., R.A.I., F.A.G. and V.B. contributed to it.

**Competing interests.** We declare we have no competing interests.

**Funding.** Funding for this work was provided by the LABEX Lyon Institute of Origins (ANR-10-LABX-0066) of the Université de Lyon for financial support within the programme 'Investissements d'Avenir' (ANR-11-IDEX-0007) of the French government operated by the National Research Agency (ANR). Consumables used in the clean laboratory for this study were partly paid for by J.E.M.'s DIUNIS project ('Dietary Inferences Using Novel Isotope System'—TelluS INSU 2017—action INTERRVIE). Analyses and sample preparations were partly funded by the Jurassic Foundation through the Jurassic Foundation Grant Program.

**Acknowledgements.** The authors are grateful to the LABEX Lyon Institute of Origins, the TelluS INSU 2017-action INTERRVIE, and the Jurassic Foundation for having funded this project. We thank G. Clément for allowing us to sample fossil fishes from Gadoufaoua in the collections of MNHN (Paris). For technical assistance on spectrometers, we thank E. Albalat and P. Telouk. We thank the two anonymous referees for their insightful comments on the manuscript. The animal outlines in figures 3 and 4 were retrieved from [www.phylopic.org](http://www.phylopic.org) with some modifications, we thus thank their authors: Duane Raver, Todd Marshall, Nobu Tamura, Martin Kevill, Milton Tan, Scott Hartman, FunkMonk, Smokeybjb, Zimices, Heinrich Harder and T. Michael Keesey, for helping us to illustrate our study by having transferred their work to the public domain or under a creative commons licence.

## References

- Ripple WJ *et al.* 2014 Status and ecological effects of the world's largest carnivores. *Science* **343**, 1241484. (doi:10.1126/science.1241484)
- McGowan AJ, Dyke GJ. 2009 A surfeit of theropods in the Moroccan Late Cretaceous? Comparing diversity estimates from field data and fossil shops. *Geology* **37**, 843–846. (doi:10.1130/G30188A.1)
- Dyke GJ. 2010 Palaeoecology: different dinosaur ecologies in deep time? *Curr. Biol.* **20**, R983–R985. (doi:10.1016/j.cub.2010.10.001)
- Lång E, Boudad L, Maio L, Samankassou E, Tabouelle J, Tong H, Cavin L. 2013 Unbalanced food web in a Late Cretaceous dinosaur assemblage. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **381–382**, 26–32. (doi:10.1016/j.palaeo.2013.04.011)
- Benyoussef M, Lång E, Cavin L, Mebarki K, Adaci M, Bensalah M. 2015 Overabundance of piscivorous dinosaurs (Theropoda: Spinosauridae) in the mid-Cretaceous of North Africa: the Algerian dilemma. *Cretac. Res.* **55**, 44–55. (doi:10.1016/j.cretres.2015.02.002)
- Amiot R, Lécuyer C, Buffetaut E, Escarguel G, Fluteau F, Martineau F. 2006 Oxygen isotopes from biogenic apatites suggest widespread endothermy in Cretaceous dinosaurs. *Earth Planet. Sci. Lett.* **246**, 41–54. (doi:10.1016/j.epsl.2006.04.018)
- Amiot R *et al.* 2010 Oxygen isotope evidence for semi-aquatic habits among spinosaurid theropods. *Geology* **38**, 139–142. (doi:10.1130/G30402.1)
- Ibrahim N, Sereno PC, Dal Sasso C, Maganuco S, Fabbri M, Martill DM, Zouhri S, Myhrvold N, Iurino DA. 2014 Semiaquatic adaptations in a giant predatory dinosaur. *Science* **345**, 1613–1616. (doi:10.1126/science.1258750)
- Taquet P. 1984 Une curieuse spécialisation du crâne de certains Dinosaures carnivores du Crétacé: le museau long et étroit des Spinosauridés. *C. R. Acad. Sci. II* **299**, 217–222.
- Charig AJ, Milner AC. 1997 *Baryonyx walkeri*, a fish-eating dinosaur from the Wealden of Surrey. *Bull. Nat. Hist. Museum London* **53**, 11–70.
- Sereno PC *et al.* 1998 A long-snouted predatory dinosaur from Africa and the evolution of spinosaurids. *Science* **282**, 1298–1302. (doi:10.1126/science.282.5392.1298)
- Taquet P, Russell DA. 1998 New data on spinosaurid dinosaurs from the early Cretaceous of the Sahara. *Comptes Rendus l'Académie des Sci. IIA - Earth Planet. Sci.* **327**, 347–353. (doi:10.1016/S1251-8050(98)80054-2)
- Evers SW, Rauhut OWM, Milner AC, McFeeters B, Allain R. 2015 A reappraisal of the morphology and systematic position of the theropod dinosaur *Sigilmassasaurus* from the 'middle' Cretaceous of Morocco. *PeerJ* **3**, e1323. (doi:10.7717/peerj.1323)
- Holtz TR. 1998 Spinosaurids as crocodiles mimics. *Science* **282**, 1276–1277. (doi:10.1126/science.282.5392.1276)

15. Rayfield EJ, Milner AC, Xuan VBUJ, Young PG. 2007 Functional morphology of spinosaur 'crocodile-mimic' dinosaurs. *Soc. Vertebr. Paleontol.* **27**, 892–901. (doi:10.1671/0272-4634(2007)27[892:FMOSCD]2.0.CO;2)
16. Buffetaut E, Martill D, Escuillié F. 2004 Pterosaurs as part of a spinosaur diet. *Nature* **430**, 33. (doi:10.1038/nature02716)
17. Hone DWE, Holtz TR. 2017 A century of spinosaurs: a review and revision of the spinosauridae with comments on their ecology. *Acta Geol. Sin.* **91**, 1120–1132. (doi:10.1111/1755-6724.13328)
18. Vullo R, Allain R, Cavin L. 2016 Convergent evolution of jaws between spinosaurid dinosaurs and pike conger eels. *Acta Palaeontol. Pol.* **61**, 825–828. (doi:10.4202/app.00284.2016)
19. Thomason J. 1997 *Functional morphology in vertebrate paleontology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
20. Skulan J, DePaolo DJ. 1999 Calcium isotope fractionation between soft and mineralized tissues as a monitor of calcium use in vertebrates. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 13 709–13 713. (doi:10.1073/pnas.96.24.13709)
21. Melin AD *et al.* 2014 Calcium and carbon stable isotope ratios as paleodietary indicators. *Am. J. Phys. Anthropol.* **154**, 633–643. (doi:10.1002/ajpa.22530)
22. Martin JE, Tacail T, Adnet S, Girard C, Balter V. 2015 Calcium isotopes reveal the trophic position of extant and fossil elasmobranchs. *Chem. Geol.* **415**, 118–125. (doi:10.1016/j.chemgeo.2015.09.011)
23. Martin JE, Tacail T, Balter V. 2017 Non-traditional isotope perspectives in vertebrate palaeobiology. *Palaeontology* **60**, 485–502. (doi:10.1111/pala.12300)
24. Heuser A, Tütken T, Gussone N, Galer SJG. 2011 Calcium isotopes in fossil bones and teeth: diagenetic versus biogenic origin. *Geochim. Cosmochim. Acta* **75**, 3419–3433. (doi:10.1016/j.gca.2011.03.032)
25. Martin JE, Vincent P, Tacail T, Khaldoune F, Jourani E, Bardet N, Balter V. 2017 Calcium isotopic evidence for vulnerable marine ecosystem structure prior to the K/Pg extinction. *Curr. Biol.* **27**, 1641–1644. (doi:10.1016/j.cub.2017.04.043)
26. Taquet P. 1976 Géologie et paléontologie du gisement de Gadoufaoua. *Cah. Paleontol.* **1976**, 1–247.
27. Cavin L *et al.* 2010 Vertebrate assemblages from the early Late Cretaceous of southeastern Morocco: an overview. *J. African Earth Sci.* **57**, 391–412. (doi:10.1016/j.jafrearsci.2009.12.007)
28. Sereno PC, Brusatte SL. 2008 Basal abelisaurid and carcharodontosaurid theropods from the Lower Cretaceous Elrhaz Formation of Niger. *Acta Palaeontol. Pol.* **53**, 15–46. (doi:10.4202/app.2008.0102)
29. Stromer E. 1915 Das original des theropoden *Spinosaurus aegyptiacus* nov. gen., nov. spec. *Abhandlungen der Königlich Bayer. Akad. der Wissenschaften Math. Klasse Abhandlung* **28**, 1–31.
30. Tacail T, Albalat E, Télouk P, Balter V. 2014 A simplified protocol for measurement of Ca isotopes in biological samples. *J. Anal. At. Spectrom.* **29**, 529. (doi:10.1039/c3ja50337b)
31. Tacail T, Télouk P, Balter V. 2016 Precise analysis of calcium stable isotope variations in biological apatites using laser ablation MC-ICPMS. *J. Anal. At. Spectrom.* **31**, 152–162. (doi:10.1039/C5JA00239G)
32. Tacail T, Thivichon-Prince B, Martin JE, Charles C, Viriot L, Balter V. 2017 Assessing human weaning practices with calcium isotopes in tooth enamel. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, 6268–6273. (doi:10.1073/pnas.1704412114)
33. Farlow JO, Holtz TR. 2002 The fossil record of predation in dinosaurs. *Paleontol. Soc. Pap.* **8**, 251–266.
34. Chu NC, Henderson GM, Belshaw NS, Hedges REM. 2006 Establishing the potential of Ca isotopes as proxy for consumption of dairy products. *Appl. Geochem.* **21**, 1656–1667. (doi:10.1016/j.apgeochem.2006.07.003)
35. Clementz MT. 2012 New insight from old bones: stable isotope analysis of fossil mammals. *J. Mammal.* **93**, 368–380. (doi:10.1644/11-MAMM-S-179.1)
36. Wang Y, Cerling TE. 1994 A model of fossil tooth enamel and bone diagenesis: implications for stable isotope studies and paleoenvironment reconstruction. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **107**, 281–289. (doi:10.1016/0031-0182(94)90100-7)
37. Balter V., Person A., Labourdette N., Drucker D., Renard M., Vandermeersch B. 2001 Were Neandertalians essentially carnivores? Sr and Ba preliminary results of the mammalian palaeobiocoenosis of Saint-Césaire. *Comptes Rendus l'Académie des Sci. IIA - Earth Planet. Sci.* **332**, 59–65.
38. Reynard B, Balter V. 2014 Trace elements and their isotopes in bones and teeth: diet, environments, diagenesis, and dating of archeological and paleontological samples. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **416**, 4–16. (doi:10.1016/j.palaeo.2014.07.038)
39. Trueman CN. 2013 Chemical taphonomy of biomineralized tissues. *Palaeontology* **56**, 475–486. (doi:10.1111/pala.12041)
40. Lécuyer C, Reynard B, Grandjean P. 2004 Rare earth element evolution of Phanerozoic seawater recorded in biogenic apatites. *Chem. Geol.* **204**, 63–102. (doi:10.1016/j.chemgeo.2003.11.003)
41. DePaolo DJ. 2004 Calcium isotopic variations produced by biological, kinetic, radiogenic and nucleosynthetic processes. *Rev. Mineral. Geochem.* **55**, 255–288. (doi:10.2138/gsrmg.55.1.255)
42. Gussone N, Tipper E, Schmitt A, Alexander H, Frank W, Martin D, Schiller M. 2016 *Calcium stable isotope geochemistry*. Berlin, Germany: Springer.



## **Annexe B – Article**

*Western Tethys Early and Middle Jurassic  
calcareous nannofossil biostratigraphy*



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Earth-Science Reviews

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/earscirev](http://www.elsevier.com/locate/earscirev)

## Western Tethys Early and Middle Jurassic calcareous nannofossil biostratigraphy

Jorge Ferreira<sup>a</sup>, Emanuela Mattioli<sup>a,b,\*</sup>, Baptiste Sucherás-Marx<sup>c</sup>, Fabienne Giraud<sup>d</sup>, Luis V. Duarte<sup>e</sup>, Bernard Pittet<sup>a</sup>, Guillaume Suan<sup>a</sup>, Auguste Hassler<sup>a</sup>, Jorge E. Spangenberg<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Université de Lyon, UCBL, ENSL, CNRS, LGL-TPE, Villeurbanne 69622, France

<sup>b</sup> Institut Universitaire de France, Paris, France

<sup>c</sup> Aix Marseille Univ, CNRS, IRD, INRA, Coll France, CEREGE, Aix-en-Provence, France

<sup>d</sup> Université Grenoble Alpes, ISTerre, Grenoble F-38041, France

<sup>e</sup> MARE - Marine and Environmental Sciences Centre, Faculty of Sciences and Technology, Department of Earth Sciences, University of Coimbra, Portugal

<sup>f</sup> Institute of Earth Surface Dynamics (IDYST), University of Lausanne, Building Géopolis, Lausanne CH-1015, Switzerland

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Biostratigraphy  
Calcareous nannofossils  
Stable isotopes  
Jurassic  
Portugal

### ABSTRACT

An exhaustive biostratigraphic study based on the calcareous nannofossil content from Lower and Middle Jurassic Lusitanian Basin sections in Portugal is here presented. Located at the strategic intersection of important Jurassic water masses during a period of drastic environmental changes, the Lusitanian Basin conveyed mixed phytoplanktonic communities in its surface waters. Approximately 800 m of exceptionally continuous Lower and Middle Jurassic series bearing detailed ammonite biostratigraphy and two Global Stratotype Section and Point are studied. Vertical and lateral ubiquity of calcareous nannofossils in marine sediments and rapid evolutionary rate and radiation make this fossil group a remarkable biostratigraphic tool. Nearly 100 bioevents are acknowledged in ~24 Myr time span this work refers to, bridging 11 nannofossil zones and 29 subzones. A thorough revision of the existing literature referring to Early and Middle Jurassic calcareous nannofossil biostratigraphy is presented, and causes and implications for zonal marker discrepancies discussed under a palaeoceanographic and Jurassic nannofossil evolution angle. In order to create a solid biostratigraphic frame and to compare it with C and O stable isotopic trends, brachiopod calcite shells were analysed for geochemistry. This work yields for the first time a very detailed and inclusive biostratigraphic scheme for the Early and Middle Jurassic epochs.

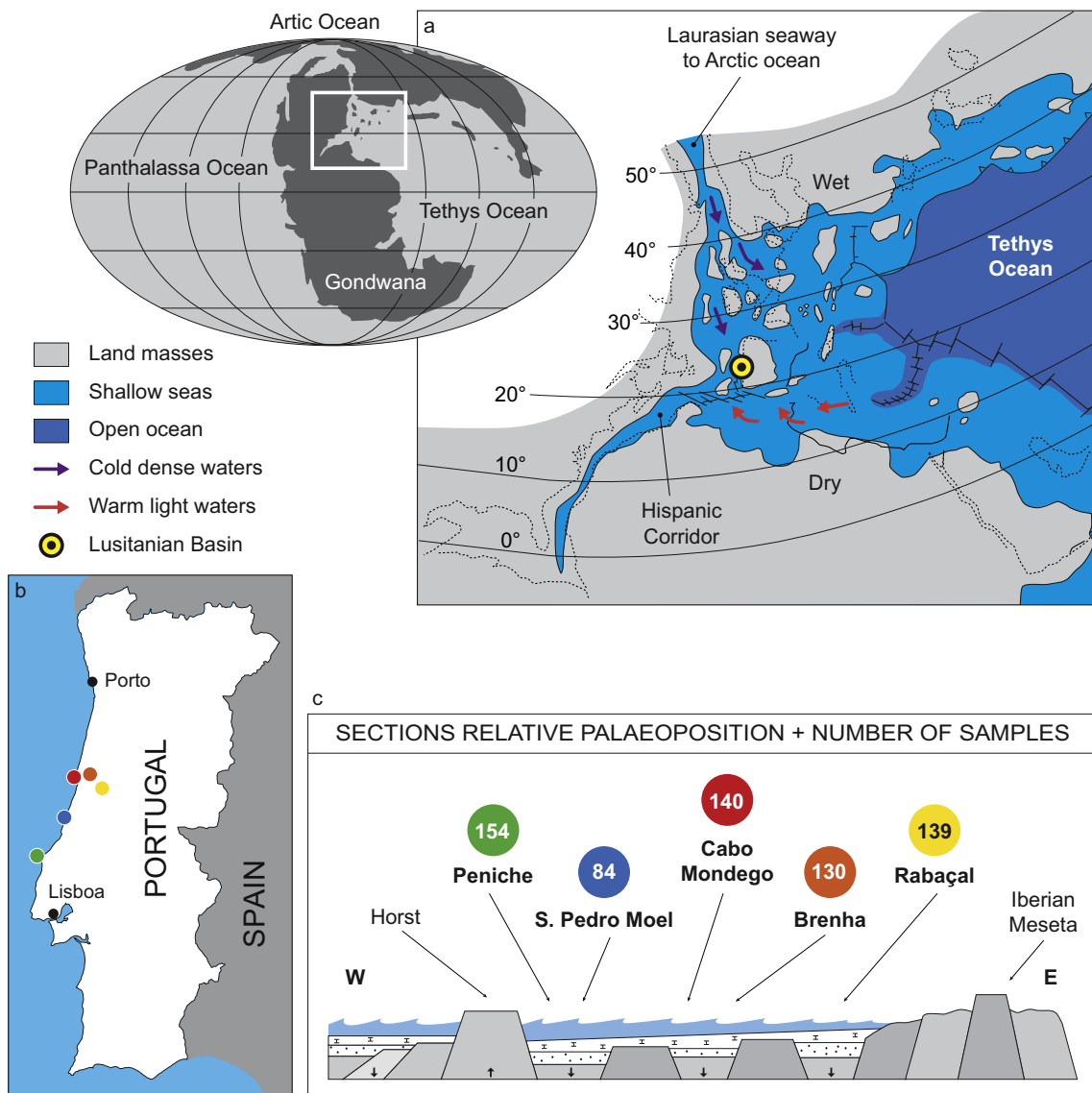
### 1. Introduction

During the Jurassic period, profound climatic and environmental changes deeply impacted the biosphere. The earliest Mesozoic oceanic anoxic event occurred during the Toarcian (T-OAE; Jenkyns, 1988) and relates to a hyperthermal event at ~182 Ma (Suan et al., 2008, 2010; Dera et al., 2011a) that was later followed by other periods of increased seawater temperature during the late Oxfordian-early Tithonian (e.g., Dera et al., 2011a; Zák et al., 2011). Such climatic disruptions have been related accordingly to prolonged magmatic activity in the Karoo-Ferrar and Asian igneous provinces (Wang et al., 2006; Jourdan et al., 2007). On the other hand, episodes of marked cooling possibly associated with the temporary development of ice caps, took place during the late Pliensbachian, early Aalenian, Bajocian-Bathonian, and Callovian-Oxfordian (e.g., Jones et al., 1994; Price, 1999). Sea level drops

likely produced physical barriers within the complex high and low western Tethys seabed topography, changing the main currents circulations (Reggiani et al., 2010). The temporary development of marine anoxia also created chemical hurdles to organism migrations. Such barriers are most likely at the origin of the marked palaeoprovincialism observed in Jurassic ammonites (Macchioni and Cecca, 2002; Dommergues et al., 2009; Dera et al., 2011b), dinoflagellates (Bucefalo Palliani and Riding, 2003), foraminifera (Ruban and Tyszka, 2005), ostracods (Arias, 2007) and calcareous nannofossils (Bown, 1987; Mattioli et al., 2008).

The Jurassic Period chronostratigraphic framework is largely established through ammonite biostratigraphy. However, an alternative biochronological scheme based on a ubiquitous fossil group, able to rapidly and globally spread across water masses is needed since i) ammonites bear a marked provincialism, ii) the ammonite record in the

\* Corresponding author at: Université de Lyon, UCBL, ENSL, CNRS, LGL-TPE, Villeurbanne 69622, France  
E-mail address: [emanuela.mattioli@univ-lyon1.fr](mailto:emanuela.mattioli@univ-lyon1.fr) (E. Mattioli).



**Fig. 1.** (a) Western Tethys palaeogeography and location of the Lusitanian Basin within the proto-Atlantic rift during the Toarcian (modified after Bassoulet et al., 1993). (b) Location of the five studied sections in west Portugal, (c) their relative cross-section palaeoposition and the number of samples studied in each one of them.

increasing number of studies from continental cores is scarce, iii) the number of sites studied outside the western Tethys (Tibet, Canada, Japan, South America) where the standard ammonite biozones have been defined, is growing. Calcareous nannofossils are such ubiquitous fossil group. They include unicellular planktonic algae - the coccolithophores - covered by minute calcite platelets - the coccoliths - that lock together form a coccosphere. Marine snow and the inclusion of coccolithophore in zooplankton faecal pellets are the main mechanisms conveying coccospheres and coccoliths to the seafloor (Steinmetz, 1994). The rapid evolution and radiation of these organisms during the Early and Middle Jurassic makes them excellent palaeoecological, palaeogeographic and biostratigraphic tools.

Located at the junction of the western Tethys, the proto-Atlantic, the Arctic Ocean via the Viking corridor and the Panthalassa Ocean via the Hispanic corridor (Fig. 1), the Lusitanian Basin held a strategic position during the Jurassic period, as it acted as a N-S migration pathway for several organisms (e.g., ammonites, Mouterde and Ruget, 1975; ostracods, Arias, 2007; calcareous nannofossils, Reggiani et al., 2010). The nannofossil content from its sedimentary record therefore echoes the sway of the original nannoplankton community. In this work, a new biostratigraphic zonation scheme based on calcareous nannofossil from

west Portugal (Lusitanian Basin), where continuous Lower and Middle Jurassic successions occur, is presented. These sections are well dated by ammonite biostratigraphy and bear an exceptional record of calcareous nannofossils. Due to the outstanding outcrop conditions and excellent fossil recovery, two Global Stratotype Section and Point (GSSP) have been established in the Lusitanian Basin at the base of the Toarcian stage in the Peniche peninsula (Rocha et al., 2016) and at the base of the Bajocian stage in the Cabo Mondego area (Pavia and Enay, 1997). Moreover, astrochronology and chemostratigraphy ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ , TOC content; e.g., Rocha et al., 2016) have been established for specific time intervals. The nannofossil record is herein compared to previous studies, and a new C and O stable isotope profile measured from brachiopod shells presented. This work is the first go at comprehensively integrate biostratigraphy and stable C and O isotopes for Lower and Middle Jurassic series in west Tethyan successions, and at correlate sections belonging to different palaeogeographic contexts. It also represents a considerable step forward in establishing a high-resolution biochronological frame where palaeoceanographic events suggested by major shifts in C and O isotope values and evolutionary patterns are integrated.



## 2. Previous work

Most of the Jurassic calcareous nannofossil biostratigraphy studies have been carried out in NW European sections such as England and Germany (e.g., Bown, 1987; Bown et al., 1988; Bown, 1996), in Mediterranean Tethys sections (e.g., Cobianchi, 1992; Lozar, 1992, 1995; Mattioli and Erba, 1999) and North Africa (de Kaenel and Bergen, 1993; de Kaenel and Bergen, 1993). Despite over the past decade some studies have addressed the Tethyan calcareous nannofossil biostratigraphy (e.g., Aguado et al., 2008; Sandoval et al., 2012; Mattioli et al., 2013; Fraguas et al., 2018), since Bown and Cooper (1998) and Mattioli and Erba (1999) no new biozonation scheme has been suggested for Lower and Middle Jurassic series. Nonetheless, and although with limited Tethyan data, nannofossil biozonations had already been summarized by Bown (1996) and de Kaenel and Bergen (1996).

The first studies of Early Jurassic calcareous nannofossils in the Lusitanian Basin are from Hamilton (1977, 1979). Later, Bown (1987) and de Kaenel and Bergen (1993) studied the nannofossil content from the Portuguese Brenha section. Late Sinemurian to Callovian stages were studied by Bergen (unpublished data) and reported in the synthesis work of de Kaenel and Bergen (1996), and later in Bown and Cooper (1998). More recent studies carried out in the Iberian Peninsula addressed the Pliensbachian and Toarcian nannofossil biostratigraphy (Perilli, 2000; Perilli et al., 2004; Perilli and Duarte, 2006; Perilli et al., 2010; Mattioli et al., 2013; Fraguas et al., 2015, 2018). However, the taxonomy adopted by some of these authors is somehow different to the one followed herein. Actually, biometric studies of Jurassic coccoliths such as those performed on the genera *Similiscutum/Biscutum* (de Kaenel and Bergen, 1993; Mattioli et al., 2004), *Lotharingius* (Mattioli, 1996; Fraguas and Young, 2011; Ferreira et al., 2017), *Crepidolithus* (Suchéras-Marx et al., 2010; Fraguas and Erba, 2010), *Discorhabdus* (López-Otálvaro et al., 2012) and *Watznaueria* (Giraud et al., 2006; Tiraboschi and Erba, 2010), resulted in a quantitative and partially revised taxonomy. Such a revision deeply impacts biostratigraphic studies and therefore the chronostratigraphic range of the redefined taxa should be precisely determined.

## 3. Geological settings

The Lusitanian Basin was a small and narrow North-South elongated basin, sitting on the western side of the Iberian Massif and west-bounded by several basement horsts. This basin was one of the rift-related peri-Tethyan Mesozoic basins whose origin was linked to the opening of the Atlantic Ocean (e.g., Pinheiro et al., 1996; Alves et al., 2002). The rhythmic sedimentation of successive hemipelagic marlstone-limestone couplets occurred on a homoclinal low-energy marine carbonate ramp sloping westwards. On such a ramp, diverse palaeoenvironments were established, displaying gradual changes in lithology with increasing depth (e.g., Duarte, 2007; Silva et al., 2015a). This elongated and shallow epicontinental seaway was located along the proto-Atlantic rift and connected the western Tethys to the NW European basins, and probably to the Panthalassa Ocean through the Hispanic Corridor. Its maximum water depth probably did not exceed 200 m (Bjerrum et al., 2001). Mixing between high NW European and low Mediterranean latitude waters has been described by various authors and supported by the mixing of ammonite fauna, ostracods and calcareous nannofossils during the Early Jurassic (Mouterde and Ruget, 1975; Dommergues et al., 2009; Arias, 2007; Reggiani et al., 2010; Dera et al., 2011b; Ferreira et al., 2015). Located at a palaeolatitude comprised between 25 and 30°N (Dercourt et al., 2000), the Lusitanian Basin would correspond to the transition between subtropical and temperate climatic belts.

During the Early and Middle Jurassic, approximately 1 km of carbonate sediments controlled by sea level changes and tectonics were accumulated in this basin (e.g., Kullberg et al., 2013; Azerêdo et al., 2014). This thick carbonate infill begins with marginal-marine and

restricted marine facies in the earliest Sinemurian, which rapidly grades upwards in the latest Sinemurian into hemipelagic fossiliferous marly limestone series (including organic-rich facies with black shales), which characterize most of the Lower Jurassic (Duarte, 1997; Duarte et al., 2010, 2012; Silva et al., 2015a). Only the sedimentary record from the western edge of the basin extends to the Callovian stage (e.g., Azerêdo et al., 2003, 2014). Five main sections comprising a succession of ~800 m of sediments ranging from the late Sinemurian up to the early Bajocian have been analysed: the Peniche section located close to the Berlengas-Farilhões topographic high and São Pedro de Moel and Cabo Mondego sections located in the distal part of the basin (Fig. 1). The Brenha section occupies the intermediate position between the distal and proximal part, the latter here represented by the Rabaçal section. In all sections, macrofossils such as ammonites, brachiopods, belemnites, bivalves and some fossilized wood fragments are commonly found.

São Pedro de Moel section spans from the late Sinemurian to the early Pliensbachian (Oxynotum to Jamesoni Zone), and the Peniche section follows it suit from the early Pliensbachian to the early Toarcian (Jamesoni to Levisoni Zone). Although the Rabaçal section spans from the latest Pliensbachian up to the late Toarcian, only the lowest 42 m comprising the latest Pliensbachian to the earliest middle Toarcian (Polymorphum to Bifrons Zone) were studied for nannofossil analysis. The Brenha section corresponds to the latest early Toarcian to the early Aalenian, and no ammonite studies were ever carried out here. The Cabo Mondego section ranges from the late Toarcian to the early Bajocian (Speciosum to Humphriesianum Zone). All sections are correlated by means of lithostratigraphy and ammonite and nannofossil biostratigraphy (Fig. 2).

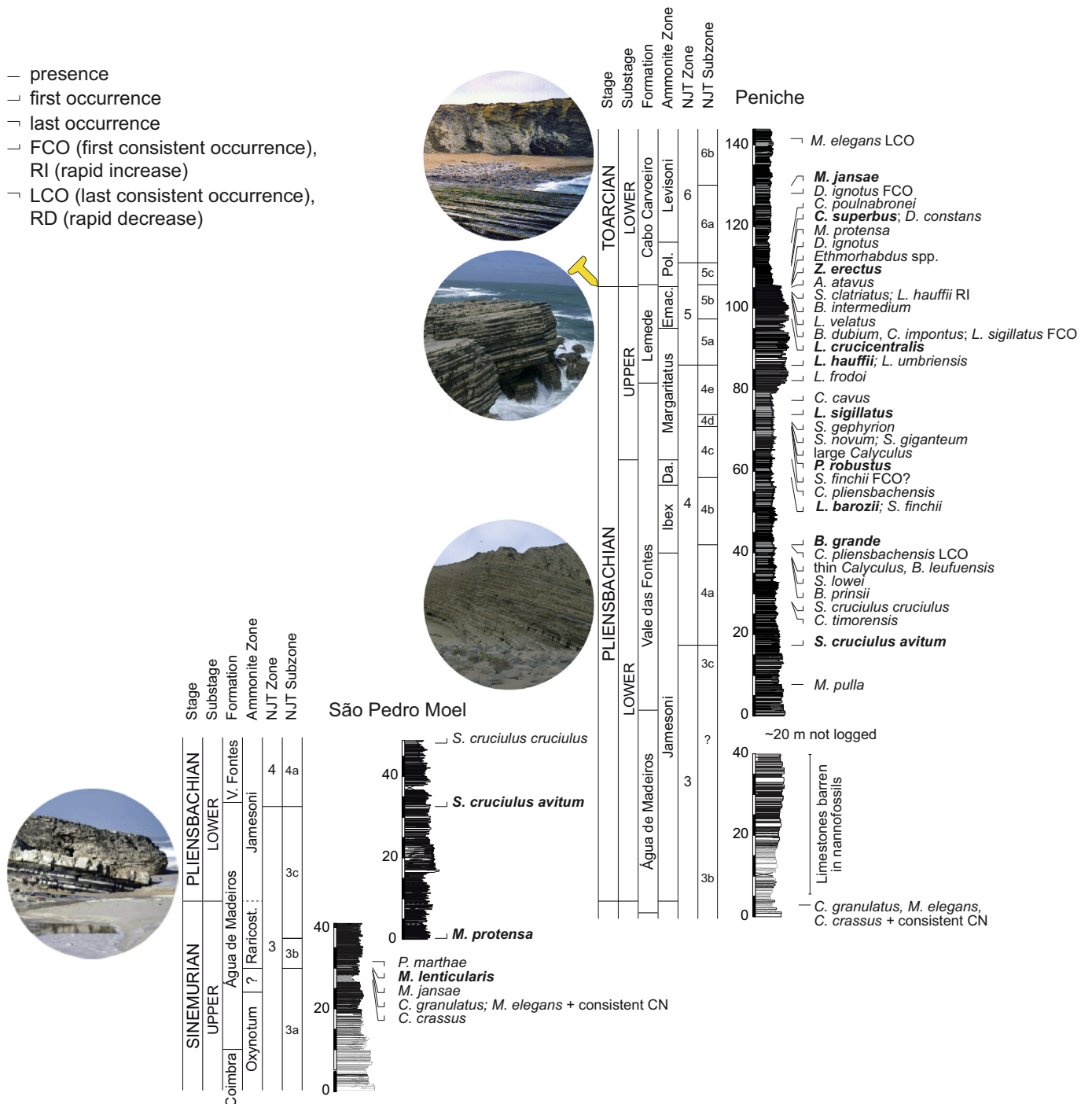
Sections from the Lusitanian Basin are exceptionally continuous, well-exposed and bear a detailed ammonite biostratigraphy (e.g., Mouterde, 1955; Phelps, 1985; Comas-Rengifo et al., 2013; Kullberg et al., 2013; Silva et al., 2015b; Henriques et al., 2016) allowing nannofossil events to be directly calibrated to the standard regional Jurassic biostratigraphy. Sediments from the São Pedro de Moel region are included in the Coimbra, Água de Madeiros and Vale das Fontes Formations, those from the Peniche region are included in the Água de Madeiros, Vale das Fontes, Lemedo and Cabo Carvoeiro Formations, those from the Rabaçal region in the São Gião Formation, and the remaining successions from Brenha and Cabo Mondego regions within the São Gião and Cabo Mondego Formations (e.g., Duarte and Soares, 2002; Azerêdo et al., 2003).

## 4. Material and methods

### 4.1. Calcareous nannofossils

A total of 647 closely spaced samples (approximately every 1 m and in key intervals at a closer sample-spacing of 0.1–0.2 m) were analysed from the marlstone-limestone couplets from five western Portugal sections and scanned for calcareous nannofossils. The studied time interval spans across the Oxynotum (late Sinemurian) up to the Humphriesianum Zone (early Bajocian) thus representing a time span of ~24.36 Myr (193.81 to 169.45 Ma; Gradstein et al., 2012). The number of samples collected and analysed in each of the sections are as follow: São Pedro de Moel: 84; Peniche: 154; Rabaçal: 139; Brenha: 130; Cabo Mondego: 140 (Fig. 1). Sample spacing is an important issue in order to evaluate the consistency of recorded events in consecutive samples. In the Lusitanian Basin, cyclostratigraphy is available for the early/late Pliensbachian transition (Suchéras-Marx et al., 2010), and for the early Toarcian interval (Suan et al., 2008). For these two intervals, the sample spacing can be directly translated into time average. For the rest of the studied interval, the timescale of Gradstein et al. (2012) was used to approximate the time between consecutive samples (Supplementary Material). In the late Sinemurian to early Pliensbachian interval of the S. Pedro de Moel section the average spacing of samples is 0.8 m, which corresponds to a time average of ~70 kyr (see

- presence
- first occurrence
- last occurrence
- FCO (first consistent occurrence), RI (rapid increase)
- LCO (last consistent occurrence), RD (rapid decrease)



**Fig. 2.** Composite log of the five studied sections where ~100 nannofossil bioevents (FO, LO, FCO, LCO, RI, RD) recorded in ~24 Myr time span are plotted. Lithostratigraphy and ammonite biostratigraphy from Mouterde et al. (1955), Duarte and Soares (2002), Azerêdo et al. (2003) and Duarte et al. (2014). (a) Composite log of S. Pedro de Moel and Peniche sections. Raricos. = Raricostatum; Dav. = Davoei; Emac. = Emaciatum; Poly. = Polymorphum. Consistent CN: levels in which the record of calcareous nannofossils becomes consistent. (b) Composite log of Rabaçal, Brenha and Cabo Mondego sections. Poly. = Polymorphum; Bona. = Bonarelli; Specio. = Speciosum; Men. = Meneghinii; Aal. = Aalensis; Conca. = Concavum; Dis. = Discites; Hu. = Humphriesianum.

Supplementary Material). In the Pliensbachian of the Peniche section the average spacing of samples is 0.6 m, which corresponds to a time average of ~48 kyr. The close sample spacing we applied around the Pliensbachian/Toarcian boundary (0.1–0.2 m) allowed us to obtain a sample every 8–16 kyr, according to the cyclostratigraphic study by Suan et al. (2008). For the rest of early Toarcian, one sample per meter approximately corresponds to a time average of 60 kyr. Concerning the early Bajocian, the average sample spacing of 2.8 m corresponds to a time average of ~24 kyr.

Samples were prepared according to the method of Geisen et al. (1999) and nannofossils were studied under an optical polarized microscope with x1000 magnification. At least 450 fields of view corresponding to three slide transects were examined for each sample. On average 300 coccoliths were counted per sample as the counting of 300 specimens is statistically robust to record all the species making up > 1.7% of the total assemblage with a confidence level of 99.5% (Fatela and Taborada, 2002). Moreover, in all studied samples at least three extra transects were scanned in order to identify rare taxa and to



- presence
- first occurrence
- last occurrence
- FCO (first consistent occurrence), RI (rapid increase)
- LCO (last consistent occurrence), RD (rapid decrease)

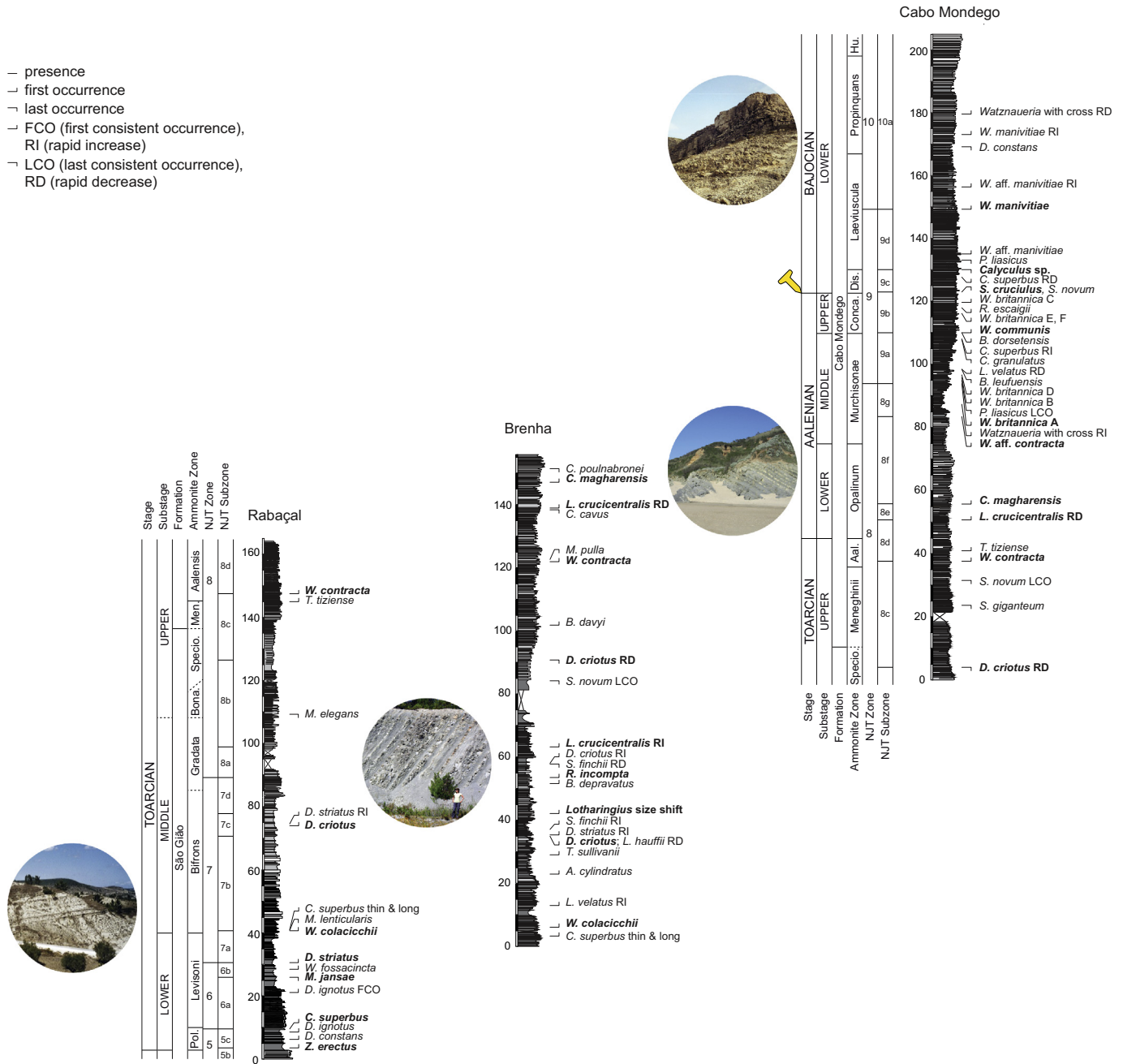


Fig. 2. (continued)

have a better record of the species richness. For each sample, species relative abundance was subsequently estimated from the total number of counted coccoliths so stratigraphic abundance changes could be easily perceived (see Supplementary Material). In order to achieve the highest possible counting accuracy, all samples were analysed at least twice within a year period. So as to avoid any taxonomic bias and to safeguard the same diagnostic criteria used in the species identification, all biostratigraphic markers and age-diagnostic taxa were scrutinized and blind tested among the present authors either through direct microscope viewing or through pictures.

Following Gradstein et al. (2012), the abbreviation FO (First Occurrence) is herein used for the first or stratigraphically lowest occurrence of a species in a section, LO (Last Occurrence) for the last or stratigraphically highest occurrence of a species in a section, FCO (First Consistent Occurrence) is used after a species is recorded in consecutive samples, LCO (Last Consistent Occurrence) after a species is no longer

observed in consecutive samples, and RI (Rapid Increase) for the stratigraphic horizon where a given taxa yields for the first time a relative abundance higher than 10% and maintain it throughout the subsequent samples. This is particularly suitable for dominant taxa such as the *Lotharingius* plexus in the Toarcian and the *Watznaueria* genus across the Aalenian and Bajocian stages. Conversely, RD (Rapid Decrease) is used for taxa that decrease their relative abundance to < 10% and maintain it. Biostratigraphy is described with reference to Bown and Cooper (1998) and Mattioli and Erba (1999). Calcareous nannofossil taxonomy follows that of Bown (1987) for muroliths, de Kaenel and Bergen (1993) and Mattioli et al. (2004) for *Similiscutum/Biscutum*, Mattioli (1996) and Ferreira et al. (2017) for *Lotharingius*, López-Otálvaro et al. (2012) for *Discorhabdus*, and Cobianchi et al. (1992), Mattioli (1996), Giraud et al. (2006) and Tiraboschi and Erba (2010) for *Watznaueria*. Since this study utilizes *Lotharingius* and *Watznaueria* species more frequently than previous biostratigraphic schemes, some

taxonomic keys to unambiguously differentiate these two genera are provided. Besides bearing diagenesis-resistant coccoliths, their use is appropriate as *Lotharingius* and *Watznaueria* species are dominant in Toarcian-Aalenian and Bajocian assemblages. Their use should thus guarantee that marker species can be easily recorded. Differences between these genera, both belonging to the Watznaueriaceae family, are referred by Cobianchi (1992) and Mattioli (1996). The latter provided some guidelines as the sutural lines among the elements of the distal shield (outer cycle) are more inclined in the coccoliths of the genus *Watznaueria* than in the genus *Lotharingius*, and the general shape of *Watznaueria* coccoliths being more concavo-convex. Such morphology renders an extinction pattern under optical microscopy where isogyres display right angle bent arms and a net optical discontinuity between outer and inner cycles of the distal shield. These characters are less obvious in the coccoliths of *Lotharingius* genus.

Calcareous nannofossil preservation was evaluated under optical microscopy according to their degree of etching, overgrowth and fragmentation. Generally, all coccoliths exhibited good (little or no evidence of dissolution nor overgrowth hence diagnostic traits were preserved allowing species-level identification) or moderate (although slightly altered by dissolution or overgrowth it was not enough to hamper species-level identification) preservation. Fragmentation was mainly observed in the *incertae sedis Schizosphaerella*.

#### 4.2. Stable isotopes

A total of 47 brachiopod shells were analysed for their carbon and oxygen stable isotope composition. Fifteen of them were collected from the upper Sinemurian stage in São Pedro de Moel (Oxynotum and Raricostatum zones), and 32 from the middle Aalenian up to the lower Bajocian stages (Murchisonae up to Propinquans Zone) in Cabo Mondego. These new measurements were combined with previously published data from the Peniche (Hesselbo et al., 2007; Suan et al., 2010; Silva et al., 2011), Rabaçal (Ferreira et al., 2015) and Cabo Mondego (Suchéras-Marx et al., 2010) sections. The stable isotope profiles are a composite of different taxa of rhynchonellids, spiriferinids and terebratulids. Articulate brachiopods are assumed to be strictly benthic and commonly sessile organisms and it is considered that the oxygen isotope compositions of its fibrous inner calcite layer reflect the ocean water temperature and salinity (Suan et al., 2008; Brand et al., 2014). Conversely, the outer layer, which is considered to be secreted out of isotopic equilibrium with oceanic water in modern species (Carpenter and Lohmann, 1995; Auclair et al., 2003; Parkinson et al., 2005), was carefully removed with a dental scraper under a binocular microscope during sample preparation.

Stable carbon and oxygen isotope analyses were performed at the Institute of Earth Surface Dynamics of the University of Lausanne using a Thermo Fisher Scientific Gas Bench II carbonate preparation device connected to a Delta Plus XL isotope ratio mass spectrometer. The CO<sub>2</sub> extraction was done by reacting 100–200 µg of powdered rock with anhydrous phosphoric acid at 70 °C. The stable carbon and oxygen isotope ratios are reported in the delta ( $\delta$ ) notation as per mil (‰) deviation relative to the Vienna Pee Dee belemnite standard (VPDB). The standardization of the  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values relative to the international VPDB scale was done by calibration of the reference gases and working standards with IAEA standards. Analytical uncertainty ( $1\sigma$ ), monitored by replicate analyses of the international calcite standard NBS-19 and the laboratory standards Carrara Marble was not greater than  $\pm 0.05\text{‰}$  for  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\pm 0.1\text{‰}$  for  $\delta^{18}\text{O}$ .

#### 5. Nannofossil zonation and isotope excursions

Calcareous nannofossil bioevents recorded in this work are summarized in Fig. 3 and their FO, LO, RI, RD and FCO calibrated with the already established ammonite zones wherever they exist (see also Supplementary Material). In order to preserve the uniformity among

different biozonation schemes, all zones and zone-defining criteria previously established by Bown and Cooper (1998) and Mattioli and Erba (1999) are kept. However, many subzones are emended here and new subzones introduced. Twenty-eight nannofossil subzones are recognized and hereafter scrutinized, 21 of which corresponding to new bioevents and defining new nannofossil subzones. All new subzones are established through easily recognizable index species (Plates 1 and 2), through diagenesis-resistant taxa even in diagenetically altered material, or species occurring synchronously amidst different successions. Each zonal marker or bioevent is examined in stratigraphic order from bottom to top. Whenever deemed necessary, taxonomy is discussed and findings compared to stratigraphic ranges already reported in the literature for both Mediterranean and Boreal palaeogeographic provinces. High-resolution sampling allowed to define whenever possible, nannofossil subzone horizons that match as closely as possible those of ammonites. Also, some nannofossil subzones closely correspond to stage boundaries,  $\delta^{13}\text{C}$  positive or negative excursions or warming or cooling phases as indicated by the  $\delta^{18}\text{O}$  record.

##### NJT3 - *Crepidolithus pliensbachensis* Zone

Defined by Mattioli and Erba (1999), this zone ranges from the FO of *Crepidolithus pliensbachensis* to the FO of *Similiscutum cruciulus*. It spans the late Sinemurian and early Pliensbachian (Jamesoni Zone) stage. In this work, the stratigraphic range of this zone matches the NJ3 Zone of Bown and Cooper (1998) and the NJT3 Zone of Mattioli and Erba (1999). Within this zone, a large number of species FOs occur, namely *Crepidolithus crassus*, *Crepidolithus granulatus*, *Mitrolithus elegans*, *Mitrolithus jansae*, *Mitrolithus lenticularis*, *Parhabdololithus marthae*, *Mazaganella protensa* and *Mazaganella pulla*.

##### NJT 3a - *Crepidolithus pliensbachensis* Subzone

Defined by Mattioli and Erba (1999), this subzone ranges from the FO of *Crepidolithus pliensbachensis* to the FO of *Mitrolithus lenticularis*. It spans the late Sinemurian, from the Oxynotum up to the basal Raricostatum Zone. This subzone partly corresponds to the NJ3 Zone of Bown and Cooper (1998) and the NJT3a Subzone of Mattioli and Erba (1999). Within this subzone occur the FOs of *C. crassus*, *C. granulatus*, *M. elegans* and *M. jansae*.

##### NJT 3b - *Mitrolithus lenticularis* Subzone

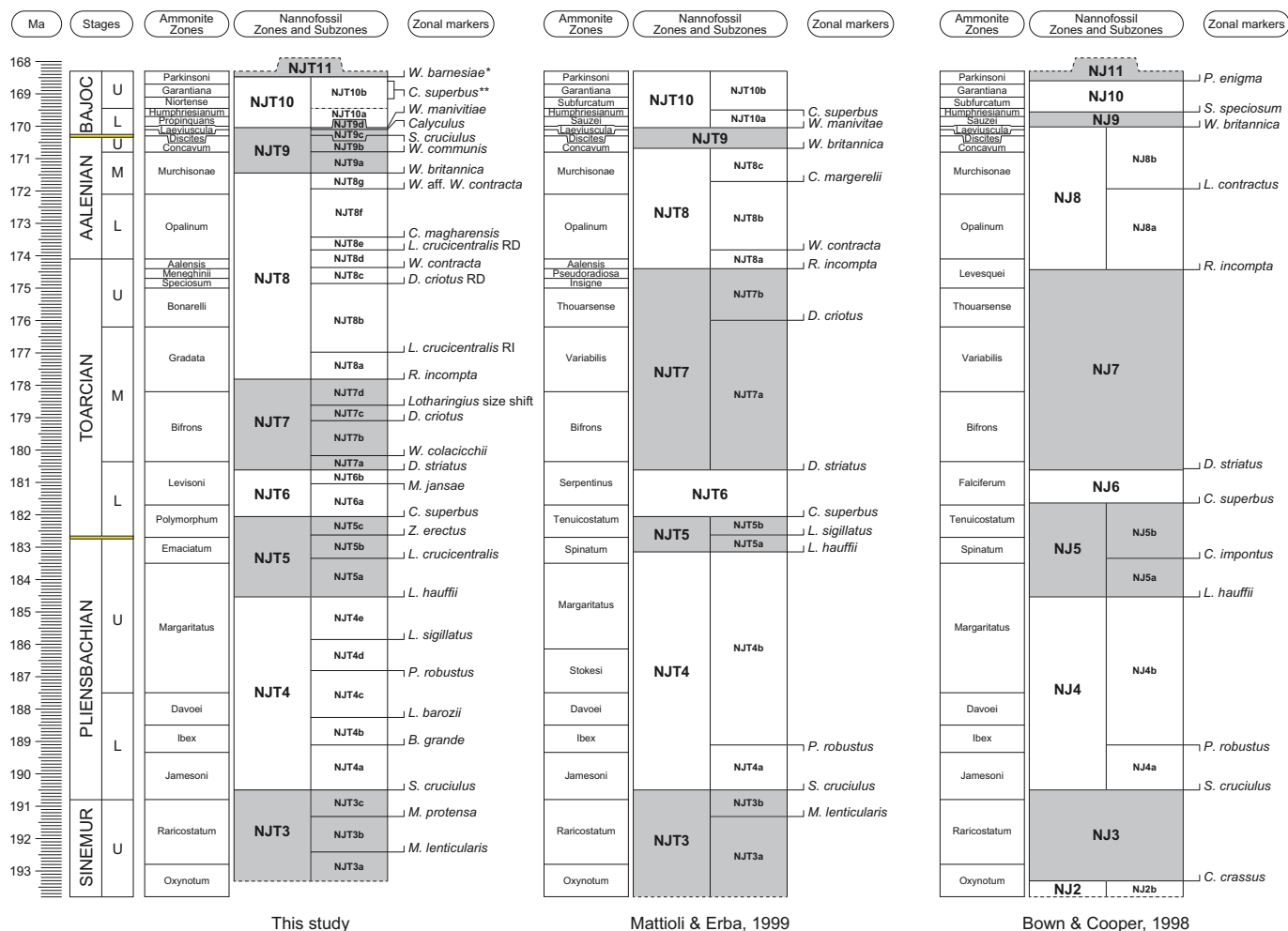
Defined by Mattioli and Erba (1999) and emended herein, this subzone ranges from the FO of *Mitrolithus lenticularis* to the FO of *Mazaganella protensa* (originally *Similiscutum cruciulus*). It spans the late Sinemurian within the Raricostatum Zone. This subzone partially corresponds to the NJ3 Zone of Bown and Cooper (1998) and the NJT3a Subzone of Mattioli and Erba (1999). Within this subzone occurs the LO of *P. marthae*. The reference section for this subzone is São Pedro de Moel.

##### NJT 3c - *Mazaganella protensa* Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the FO of *Mazaganella protensa* to the FO of *Similiscutum cruciulus*. It spans the late Sinemurian and early Pliensbachian, from part of the Raricostatum up to part of the Jamesoni Zone. This subzone partially corresponds to the NJ3 Zone of Bown and Cooper (1998) and matches the NJT3b Subzone of Mattioli and Erba (1999). Although not a common taxon, its large size and tiered placoliths make the genus *Mazaganella* easily recognizable and resistant to dissolution. The reference section for this subzone is São Pedro de Moel. This subzone covers the Sinemurian/Pliensbachian boundary (Raricostatum/Jamesoni Zone) and records a prominent  $\delta^{13}\text{C}$  negative excursion (Fig. 4).

##### NJT 4 - *Similiscutum cruciulus* Zone

Defined by Bown (1987) based on the FO of *Biscutum novum* (*B. novum* taxonomy was eventually emended; de Kaenel and Bergen, 1993; Mattioli et al., 2004) and emended by Bown and Cooper (1998). These authors considered the major evolutionary event of the FO of radiating placolith-coccoliths (i.e. *Similiscutum cruciulus*) for the base of this zone, as did Mattioli and Erba (1999). This zone ranges from the FO of *Similiscutum cruciulus* group to the FO of *Lotharingius hauffii*. It spans the early and late Pliensbachian, from part of the Jamesoni up to part of the



**Fig. 3.** Nannofossil zonation defined for the Lusitanian Basin and its comparison with existing biozonation schemes covering the same time interval. Geochronology and ammonite zone durations after [Gradstein et al. \(2012\)](#), and ammonite biohorizons position have an error of ~100 kyr. (\*) bioevent recorded by [López-Otálvaro and Henriques \(2018\)](#) in Cabo Mondego; (\*\*) indicate the age interval where is predictable to observe the LO of *Carinolithus superbus*. The ammonite zonal markers used in Central Italy ([Mattioli and Erba, 1999](#)) and NW Europe ([Bown and Cooper, 1998](#)) are sometimes different from the Lusitanian Basin. Some discrepancies between zonal boundaries may occur in the different localities. See the text for more explanation.

Margaritatus Zone. This zone matches the NJ4 Zone of [Bown and Cooper \(1998\)](#) and partially corresponds to the NJT4 Zone of [Mattioli and Erba \(1999\)](#). Within this zone occur the FOs of *Similiscutum cruciulus cruciulus*, *Bussonius prinsii*, *Bussonius leufuensis*, *Sollasties lowei*, thin *Calyculus* sp., *Biscutum grande*, *Lotharingius barozii*, *Similiscutum finchii*, *Similiscutum novum*, *Similiscutum giganteum*, *Similiscutum gephyron*, *Lotharingius sigillatus*, *Crepidolithus cavus*, *Lotharingius frodoii*. Within this zone also occur the LOs of *Crepidolithus timorensis*, *Parhabdololithus robustus* and *Crepidolithus plienschachensis*. The reference section for this zone is Peniche.

**NJT 4a - *Parhabdololithus robustus* Subzone**

Defined by [Mattioli and Erba \(1999\)](#) and emended herein, this subzone ranges from the FO of *Similiscutum cruciulus* to the FO of *Biscutum grande* (originally the LO of *Parhabdololithus robustus*). It spans the early Pliensbachian, from part of the Jamesoni up to part of the Ibex Zone. This subzone corresponds to the NJ4a Subzone of [Bown and Cooper \(1998\)](#) and the NJT4a Subzone of [Mattioli and Erba \(1999\)](#). Within this subzone occur the FOs of *S. cruciulus cruciulus*, *B. prinsii*, *B. leufuensis*, *S. lowei*, the thin morphotype of *Calyculus* and also the LO of *Crepidolithus timorensis* and the LCO of *C. plienschachensis*. The reference section for this zone is Peniche. The thin *Calyculus* morphotype is made up of elliptical coccoliths which in turn are made up of subvertical, juxtaposed elements. Its central area, which according to the genus diagnosis is filled with a grid ([Noël, 1972](#)), is not easily visible under

the optical microscope. The first appearance of this coccolith is a distinctive event, valuable in biostratigraphic studies.

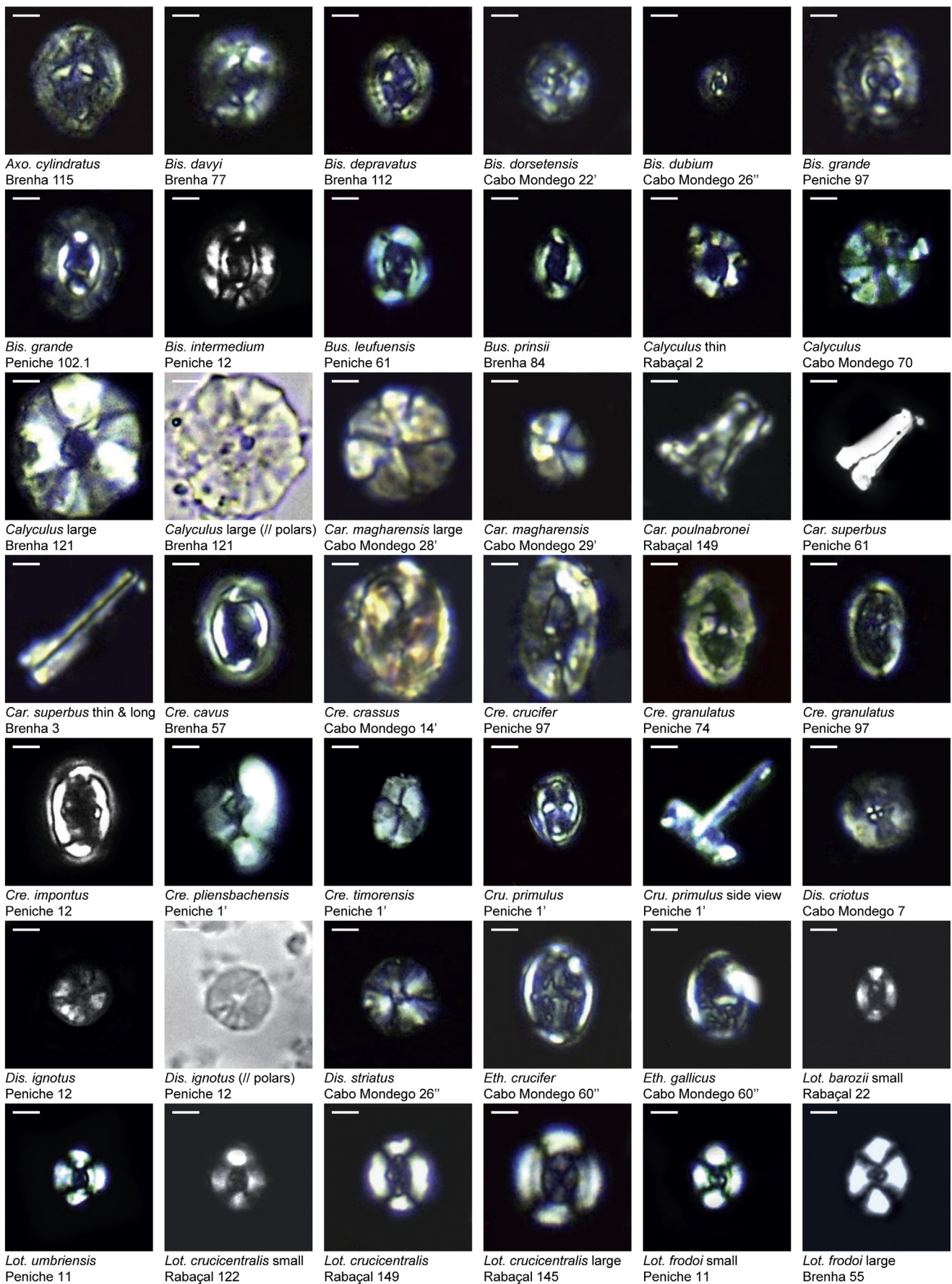
**NJT 4b - *Biscutum grande* Subzone**

Defined herein, this subzone ranges from the FO of *Biscutum grande* to the FO of *Lotharingius barozii*. It spans the early Pliensbachian from part of the Ibex up to part of the Davoei Zone. This subzone partly corresponds to the NJ4b Subzone of [Bown and Cooper \(1998\)](#) and to the NJT4b Subzone of [Mattioli and Erba \(1999\)](#). The reference section for this subzone is Peniche. Due to its size, *Biscutum grande* is easily recognizable and resistant to dissolution making it a very useful index species.

**NJT 4c - *Lotharingius barozii* Subzone**

Defined herein, this subzone ranges from the FO of *Lotharingius barozii* to the LO of *Parhabdololithus robustus*. It spans the early and late Pliensbachian, from part of the Davoei up to part of the Margaritatus Zone. This subzone partially corresponds to the NJ4b Subzone of [Bown and Cooper \(1998\)](#) and to the NJT4b Subzone of [Mattioli and Erba \(1999\)](#). The FO of *S. finchii* happens synchronously with the FO of *L. barozii*, occurring both in the same sample. Within this subzone occurs the LO of *Crepidolithus plienschachensis*. The reference section for this subzone is Peniche. The FO of *Lotharingius barozii* approximately defines the Ibex/Davoei Zone transition and represents the earliest occurrence of the *Lotharingius* genus, a group that will dominate the Early and Middle Jurassic assemblages. [Noël \(1973\)](#) first described *Lotharingius*





(caption on next page)

**Plate 1.** Selected calcareous nannofossil micrographs. All micrographs are in crossed polars, except for the large *Calyculus* and *D. ignotus* (parallel polars). Different-sized morphotypes are shown for some species, in order to document the morphological variability observed in calcareous nannofossils from the Lusitanian basin. Scale bar is 2  $\mu\text{m}$ .

*barozii* from the Toarcian Schistes carton as a *Lotharingius* with massive buttresses in the axis of its ellipse and asymmetrical radial bars. According to Mattioli (1996; several sections) and the biometric study by Ferreira et al. (2017; sections in Portugal and France), this species is characterized by its elliptical shape with a narrow rim, a wide and elliptical central area spanned by an axial cross, and the inner and outer cycles of the distal shield have approximately the same thickness (Mattioli, 1996).

#### NJT 4d - *Similiscutum novum* Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the LO of *Parhabdololithus robustus* to the FO of *Lotharingius sigillatus*. It spans the late Pliensbachian within the Margaritatus Zone. This subzone partially corresponds to the NJ4b Subzone of Bown and Cooper (1998) and to the NJT4b Subzone of Mattioli and Erba (1999). Within this subzone occur the FOs of the large morphotype of *Calyculus*, *S. novum*, *S. giganteum* and *S. gephyrion*. The reference section for this subzone is Peniche. The large morphotype of *Calyculus* recorded in this study is characterized by broadly elliptical distinctive coccoliths made up of sub-vertical, juxtaposed elements. These elements are thick, with a trapezoidal contour and thus rendering an irregular outline to the coccolith. Although impossible to determine at a species level when the diagnostic central area structures are not visible under optical microscope, the FO of this taxon seems to be a reliable event.

#### NJT 4e - *Lotharingius frodoii* Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the FO of *Lotharingius sigillatus* to the FO of *Lotharingius hauffii*. It spans the late Pliensbachian within the Margaritatus Zone. This subzone partially corresponds to the NJ4b Subzone of Bown and Cooper (1998) and to the NJT4b Subzone of Mattioli and Erba (1999). Within this subzone occur the FOs of *C. cavus* and *L. frodoii*. The reference section for this subzone is Peniche. Although the earliest specimens of *L. sigillatus* recorded in this study being relatively small (4.34  $\mu\text{m}$  on average for the upper Pliensbachian; Ferreira et al., 2017), its size increases throughout the Toarcian (5.14  $\mu\text{m}$  on average; Ferreira et al., 2017). Stradner (1961) reported specimens of *Discolithus sigillatus* (basionym of *L. sigillatus*) as big as 6 to 8  $\mu\text{m}$  from the middle Toarcian Variabilis Zone from SW Germany, but the emended diagnosis of Goy (1981) shows a holotype from the early Toarcian of 5  $\mu\text{m}$ , which is very similar to those observed in this work. Mattioli (1996) first described *L. frodoii* as a small elliptical coccolith (average size of 3.5  $\mu\text{m}$  during the earlier part of its stratigraphic range, up to 4.2  $\mu\text{m}$  in the late Toarcian; Ferreira et al., 2017), with a narrowly elliptical central area, bearing two buttresses aligned with the minor axis of the ellipse.

#### NJT 5 - *Lotharingius hauffii* Zone

Defined by Bown (1987), this zone ranges from the FO of *Lotharingius hauffii* to the FO of *Carinolithus superbus*. It spans the late Pliensbachian and earliest Toarcian, from part of the Margaritatus up to part of the Polymorphum Zone. This zone partially corresponds to the NJ5 Zone of Bown and Cooper (1998), and to part of the NJT4 and whole NJT5 Zone of Mattioli and Erba (1999). A large number of FOs occur within this zone, namely of *Lotharingius umbriensis*, *Lotharingius crucicentralis*, *Biscutum dubium*, *Crepidolithus impontus*, *Lotharingius velatus*, *Axopodorhabdus atavus*, *Biscutum intermedium*, *Stradnerlithus clatriatus*, *Ethmorhabdus crucifer*, *Zeughrabdotus erectus*, *Ethmorhabdus gallicus*, *Diductius constans* and *Discorhabdus ignotus*. Also, the LO of *Mazaganella protensa* and the RI of *Lotharingius hauffii* occur in this zone. The reference section for this zone is Peniche. Contrarily to previous evolutionary schemes presenting *L. hauffii* as the ancestor of all *Lotharingius* species (e.g., Cobianchi, 1992; Mattioli, 1996), the FO of *L. hauffii* is recorded in Portugal after those of *L. barozii* and *L. sigillatus*. *Lotharingius hauffii* is a small coccolith (on average in Portugal it is

$\leq 4 \mu\text{m}$ ), broadly elliptical to subcircular in shape, with a reduced central area. Its central area can sometimes be occupied by a knob or short spine. It is distinguishable from (1) *L. barozii* since the latter has a thin rim and a distinctive wide central area; (2) from *L. frodoii* as the latter is more elliptical in shape and possesses two buttresses in the central area (Mattioli, 1996); (3) from *L. sigillatus* because the latter is larger, more elliptical in shape and possesses an elongate central area with a longitudinal bar and a system of granular and radially disposed elements (Goy, 1981); (4) from *L. umbriensis* since the latter according to Mattioli (1996) is a small (3.5–5  $\mu\text{m}$ ), subcircular coccolith with a reduced central area filled by a small and distinctive cross.

#### NJT 5a - *Similiscutum finchii* Subzone

Defined by Mattioli and Erba (1999) and emended herein, this subzone ranges from the FO of *Lotharingius hauffii* to the FO of *Lotharingius crucicentralis* (originally *Lotharingius sigillatus*). It spans the late Pliensbachian across part of the Margaritatus up to the basal Emaciatum Zone. This subzone matches the NJ5a Subzone of Bown and Cooper (1998), and part of the NJT4b Subzone of Mattioli and Erba (1999). The reference section for this subzone is Peniche. The FO of *L. hauffii* and that of *L. umbriensis* are recorded synchronously, occurring both in the same sample. In this subzone,  $\delta^{18}\text{O}$  values sharply increase thus suggesting an important cooling episode.

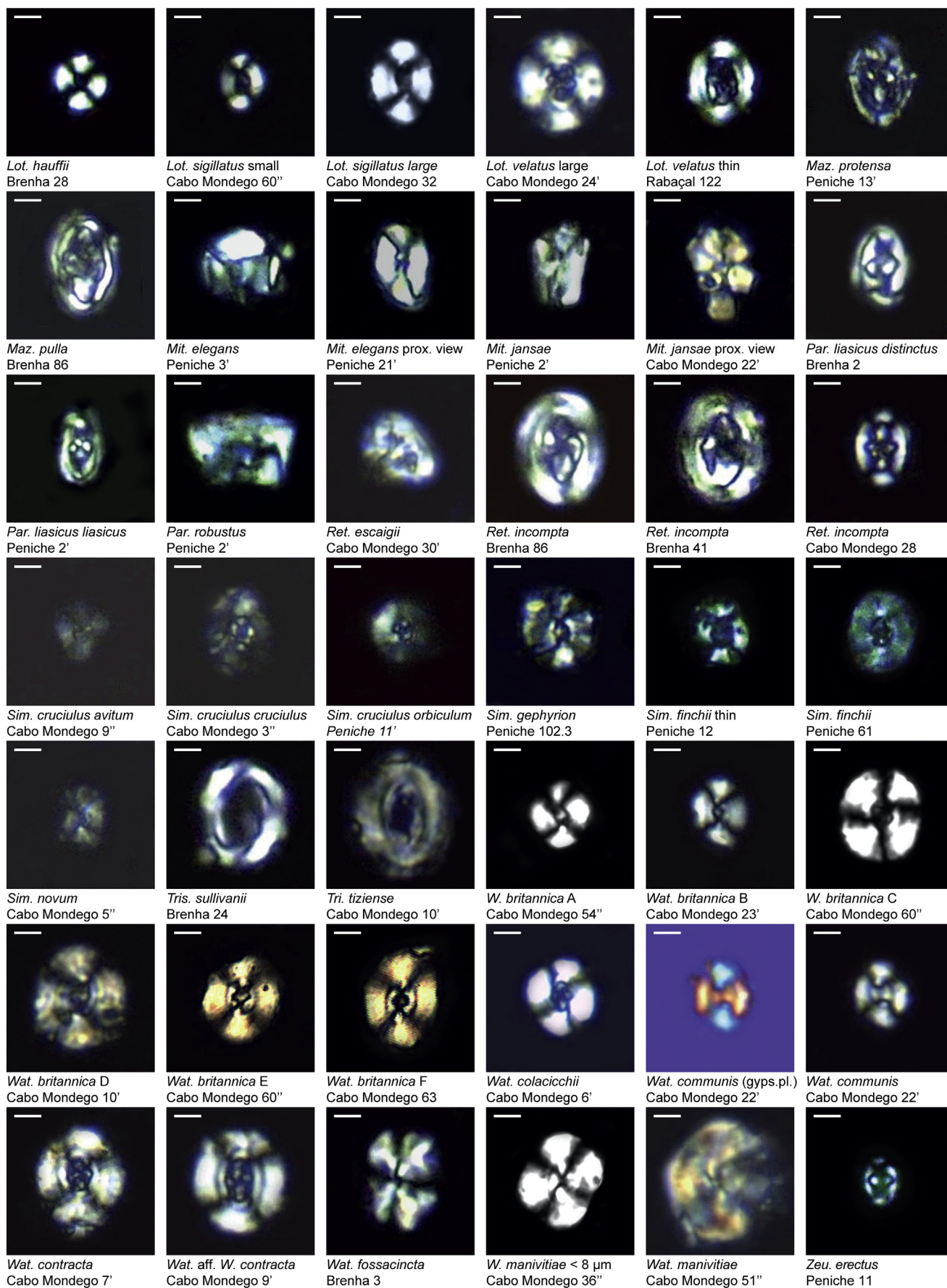
#### NJT 5b - *Lotharingius sigillatus* Subzone

Defined by Mattioli and Erba (1999) and emended herein, this subzone ranges from the FO of *Lotharingius crucicentralis* (originally *Lotharingius sigillatus*) to the FO of *Zeughrabdotus erectus* (originally *Carinolithus superbus*). This subzone spans the topmost Pliensbachian within almost the totality of the Emaciatum Zone. It partially corresponds to the NJ5b Subzone of Bown and Cooper (1998), and matches the entire NJT5a Subzone of Mattioli and Erba (1999). Within this subzone occur the FOs of *B. dubium*, *C. impontus*, *L. velatus*, *A. atavus*, *B. intermedium* and *S. clatriatus*. Also, from the base of this subzone *L. sigillatus* is consistently recorded (FCO) and the RI of *L. hauffii* occurs. The reference section for this subzone is Peniche. *Lotharingius crucicentralis* (Medd, 1971) Grün and Zweili (1980) was first described in Oxfordian sections from Germany as a medium to large coccolith (8–13  $\mu\text{m}$ ), having a very distinctive cross in its wide central area. According to the biometric work by Ferreira et al. (2017), the size of this species in Portugal lies in the lower range of the type species in the Toarcian, being even smaller during the Pliensbachian. *Lotharingius velatus* is the latest species of the genus to occur in the uppermost part of the Pliensbachian stage and is characterized as being a broadly elliptical coccolith with a wide, oval central area filled by a granular plate (Bown and Cooper, 1989). Its average length in the Lusitanian Basin (Ferreira et al., 2017) closely matches that of the holotype (6.0  $\mu\text{m}$ ). The Margaritatus/Emaciatum Zone boundary roughly sits at the bottom of this subzone. Also, the Pliensbachian/Toarcian boundary and the coeval  $\delta^{13}\text{C}$  negative excursion are included here.

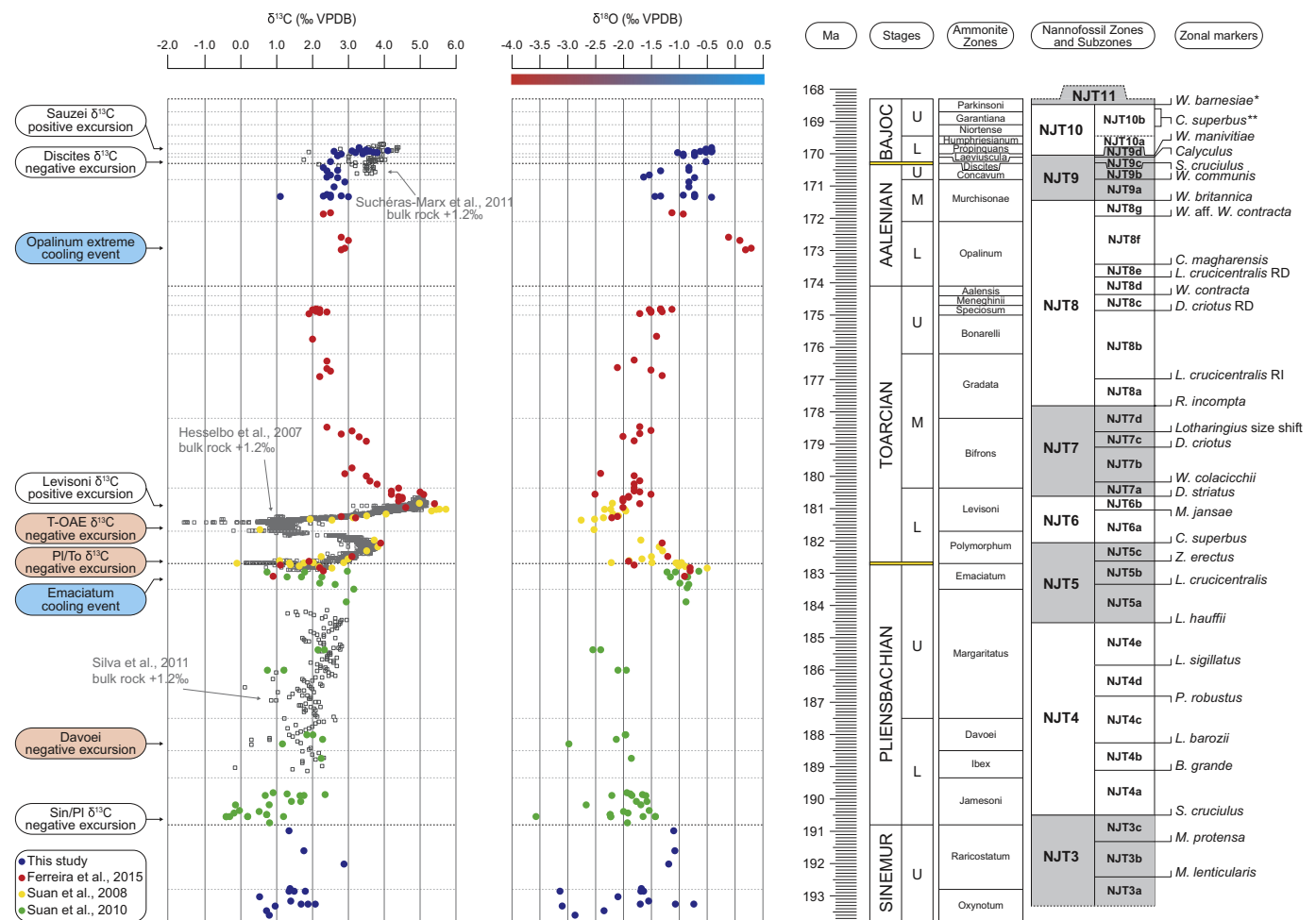
#### NJT 5c - *Zeughrabdotus erectus* Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the FO of *Zeughrabdotus erectus* to the FO of *Carinolithus superbus*. It spans the early Toarcian within the Polymorphum Zone. This subzone partially corresponds to the NJ5b Subzone of Bown and Cooper (1998), and equals the whole NJT5b Subzone of Mattioli and Erba (1999). Within this subzone occur the FOs of *E. gallicus*, *D. constans* and *D. ignotus*, the earliest of the *Discorhabdus* species and also the LO of *M. protensa*. The reference sections for this subzone are Peniche and Rabaçal. The birefringent transverse bar of *Zeughrabdotus erectus* renders this species unequivocally recognizable. Although not a common species, its FO is of the utmost importance as this bioevent occurs close to the Pliensbachian/Toarcian boundary (Emaciatum/Polymorphum Zone) and is





**Plate 2.** Selected calcareous nannofossil micrographs. All micrographs are in crossed polars, except for *W. communis* (gypsum plate). Different-sized morphotypes are shown for some species, in order to document the morphological variability observed in calcareous nannofossils from the Lusitanian basin. Scale bar is 2 μm.



**Fig. 4.** Nannofossil zonation scheme and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{brachiopod}}$  plus  $\delta^{18}\text{O}_{\text{brachiopod}}$  values across the Sinemurian-Bajocian stages.  $\delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$  is also shown according to published data. Note that the scale is the same as for  $\delta^{13}\text{C}_{\text{brachiopod}}$ , but the  $\delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$  curves are shifted by +1.2‰ units, which correspond to the original offset between the two sets of values (Suan et al., 2008). SINEMUR = Sinemurian; BAJOC = Bajocian.

synchronous in both distal and proximal sections, i.e. Peniche and Rabaçal. This subzone records the  $\delta^{13}\text{C}$  positive rebound within the Polymorphum Zone.

**NJT 6 - *Carinolithus superbus* Zone**

Defined by Bown (1987), this zone ranges from the FO of *Carinolithus superbus* to the FO of *Discorhabdus striatus*. It spans the early Toarcian from part of the Polymorphum up to part of the Levisoni Zone. This zone partially corresponds to the NJ5 and the complete NJ6 Zone of Bown and Cooper (1998), and matches the entire NJT6 Zone of Mattioli and Erba (1999). Within this zone occurs the FO of *Carinolithus poulabronnei*, the *Watznaueria* genus, the LO of *Mitrolithus jansae* and the LCO of *M. elegans*. Also, in this zone is observed the FCO of *Discorhabdus ignotus*. The reference sections for this subzone are Peniche and Rabaçal. The earliest specimens of *Carinolithus superbus* recorded in the basal Toarcian have all the taxonomic features described by Deflandre and Fert 1954 for the holotype of *Rhabdolithus superbus*, although the inner wall connecting the proximal and distal shields is often in the lower range of the type species dimensions (10.3  $\mu\text{m}$  in length, Deflandre and Fert 1954).

**NJT 6a - *Carinolithus superbus* Subzone**

Defined herein, this subzone ranges from the FO of *Carinolithus superbus* to the LO of *Mitrolithus jansae*. It spans the early Toarcian from part of the Polymorphum up to part of the Levisoni Zone. This subzone partially corresponds to the NJ5b Subzone and NJ6 Zone of Bown and Cooper (1998), and to part of the NJT6 Zone of Mattioli and Erba

(1999). Within this subzone occurs the FO of *C. poulabronnei* and the FCO of *D. ignotus*. The reference sections for this subzone are Peniche and Rabaçal. The  $\delta^{13}\text{C}$  negative excursion commonly used to identify the Toarcian Oceanic Anoxic Event (T-OAE) sits within this subzone, and the sharp decrease in  $\delta^{18}\text{O}$  values recorded in this subzone suggests a severe warming corresponding to the early Toarcian hyperthermal event.

**NJT 6b - *Mitrolithus jansae* Subzone**

Defined herein, this subzone ranges from the LO of *Mitrolithus jansae* to the FO of *Discorhabdus striatus*. It spans the early Toarcian within the Levisoni Zone. This subzone partially corresponds to the NJ6 Zone of Bown and Cooper (1998) and to the NJT6 Zone of Mattioli and Erba (1999). Within this subzone occurs the FO of *W. fossacincta*, the earliest of the *Watznaueria* species and the LCO of *M. elegans*. The reference sections for this subzone are Peniche and Rabaçal. This is a robust and synchronous event across the whole western Tethys. This subzone corresponds to the recovering period that follows the T-OAE where the highest  $\delta^{13}\text{C}$  values are recorded (Fig. 4).

**NJT 7 - *Discorhabdus striatus* Zone**

Defined by Bown (1987), this zone ranges from the FO of *Discorhabdus striatus* to the FO of *Retecapsa incompta*. It spans the early and middle Toarcian, from the top of the Levisoni up to the basal Gradata Zone. This zone partially corresponds to the NJ7 Zone of Bown and Cooper (1998) and to the NJT7 Zone of Mattioli and Erba (1999). Because the FO of *R. incompta* is recorded at the basal Gradata Zone, the

top of NJT7 occurs far earlier than it was ever reported in the literature. Within this zone occur the FOs of *Watznaueria colacicchii* (the earliest *Watznaueria* with an axial cross in its central area), *Axopodorhabdus cylindratius*, *Triscutum sullivanii*, *Discorhabdus criotus*, *Biscutum depravatus* and the LO of *Mitrolithus lenticularis*. Also, the RD of *Lotharingius hauffii* occurs in this zone. The very long and thin morphotype of *C. superbus* (> 10 µm), easily detectable in optical microscope, also first occurs in this zone. Moreover, in this zone is also observed the RI of *Lotharingius velatus*, *Discorhabdus striatus* and *Similiscutum finchii* and the size shift of *Lotharingius* spp. with a mean size < 4 µm to > 4 µm. The reference sections for this zone are Rabaçal and Brenha. After returning to pre-excursion values, the  $\delta^{13}\text{C}$  record enters a quite stable period that lasts until the end of the Toarcian, whereas  $\delta^{18}\text{O}$  values start a steady positive drift that ends in the early Bajocian.

#### NJT 7a - *Discorhabdus striatus* Subzone

Defined by [Mattioli and Erba \(1999\)](#) and emended herein, this subzone ranges from the FO of *Discorhabdus striatus* to the FO of *Watznaueria colacicchii* (originally *Discorhabdus criotus*). It spans the early and middle Toarcian, from the topmost Levisoni up to the basal Bifrons Zone. This subzone partially corresponds to the NJ7 Zone of [Bown and Cooper \(1998\)](#) and to the NJT7a Subzone of [Mattioli and Erba \(1999\)](#). The reference section for this subzone is Rabaçal. *Discorhabdus striatus* can be differentiated from *D. ignotus* by its larger size (> 5 µm) and brighter birefringence colours (light grey) under polarizing light ([López-Otálvaro et al., 2012](#)).

#### NJT 7b - *Watznaueria colacicchii* Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the FO of *Watznaueria colacicchii* to the FO of *Discorhabdus criotus*. It spans the middle Toarcian within the Bifrons Zone. This subzone partially corresponds to the NJ7 Zone of [Bown and Cooper \(1998\)](#) and to the NJT7a Subzone of [Mattioli and Erba \(1999\)](#). Within this subzone occur the FOs of *A. cylindratius* and *T. sullivanii*, the LO of *M. lenticularis*, and the enduring RI of *L. velatus*. The reference sections for this subzone are Rabaçal and Brenha. The FO of *Watznaueria colacicchii* is of paramount importance as it occurs at the lower/middle Toarcian boundary (Levisoni/Bifrons Zone) and is synchronous in both distal and proximal sections, i.e. Brenha and Rabaçal. This biostratigraphic marker should be easily recognizable as it is the first *Watznaueria* species with a relatively small and subelliptic central area filled by an axial cross. For being easily recognizable and bearing a consistent FO in south Tethyan sites, this bioevent is here deemed to be a strategic marker for the early/middle Toarcian boundary.

#### NJT 7c - *Discorhabdus criotus* Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the FO of *Discorhabdus criotus* to the *Lotharingius* spp. size shift. It spans part of the middle Toarcian within the Bifrons Zone. This subzone partially corresponds to the NJ7 Zone of [Bown and Cooper \(1998\)](#) and to the NJT7a Subzone of [Mattioli and Erba \(1999\)](#). Within this subzone is observed the RI of *D. striatus* and *S. finchii*. Also, the RD of *Lotharingius hauffii* occurs in this subzone. The reference sections for this subzone are Rabaçal and Brenha. The name of this subzone was previously used by [Mattioli and Erba \(1999\)](#) for NJT7b.

#### NJT 7d - *Biscutum depravatum* Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the *Lotharingius* spp. size shift to the FO of *Retecapsa incompta*. It spans the middle Toarcian from the top of the Bifrons to the basal Gradata Zone. This subzone partially corresponds to the NJ7 Zone of [Bown and Cooper \(1998\)](#) and to the NJT7a Subzone of [Mattioli and Erba \(1999\)](#). Within this subzone occurs the FO of *B. depravatus*. The reference section for this subzone is Brenha. The size increase of the *Lotharingius* genus is well defined and well recognizable in the middle Toarcian, differentiating early Toarcian assemblages dominated by small *Lotharingius*, from middle to late Toarcian assemblages characterized by large *Lotharingius* ([Ferreira et al., 2017](#)).

#### NJT 8 - *Retecapsa incompta* Zone

Defined by [Bown et al. \(1988\)](#) and emended by [Mattioli and Erba](#)

(1999), this zone ranges from the FO of *Retecapsa incompta* to the FO of *Watznaueria britannica*. It spans the middle Toarcian and middle Aalenian, from the basal Gradata up to the Murchisonae Zone. This zone partially corresponds to the NJ7 and NJT7, up to the NJ8 and NJT8 Zones of [Bown and Cooper \(1998\)](#) and [Mattioli and Erba \(1999\)](#). Within this zone occur the FOs of *Biscutum davyi*, *Watznaueria contracta*, *Triscutum tiziense*, *Carinolithus magharensis*, *Watznaueria* aff. *W. contracta* and the LOs of *Mitrolithus elegans*, *Similiscutum giganteum*, *Mazaganella pulla*, *Crepidolithus cavus* and *Carinolithus poulabronei*. Moreover, in this zone is also observed the acme zone (RI and RD) of *Discorhabdus criotus* and *Lotharingius crucicentralis*, the RD of *Similiscutum finchii* and also the LCO of *Similiscutum novum*. The reference sections for this zone are Brenha and Cabo Mondego.

#### NJT 8a - *Retecapsa incompta* Subzone

Defined by [Bown et al. \(1988\)](#) and emended herein, this subzone ranges from the FO of *Retecapsa incompta* to the RI of *Lotharingius crucicentralis* (originally *Lotharingius contractus* syn. *Watznaueria contracta*; [Cobianchi, 1992](#)). It spans the middle Toarcian within the Gradata Zone. This subzone partially corresponds to NJ7 Zone of [Bown and Cooper \(1998\)](#) and to the NJ7a Subzone of [Mattioli and Erba \(1999\)](#). Within this subzone is observed the RD of *S. finchii* and the RI of *D. criotus*. The reference section for this zone is Brenha. The FO of *Retecapsa incompta* represents the earliest record of this species ever documented and can be used to approximately define the base of the Gradata Zone.

#### NJT 8b - *Lotharingius crucicentralis* RI Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the RI of *Lotharingius crucicentralis* to the RD of *Discorhabdus criotus*. It spans the middle and late Toarcian, from part of the Gradata up to the basal Speciosum Zone. This subzone partially corresponds to the NJ7 Zone of [Bown and Cooper \(1998\)](#) and partially to NJT7a and NJT7b Subzones of [Mattioli and Erba \(1999\)](#). Within this subzone occurs the LCO of *S. novum*. The reference section for this subzone is Brenha.

#### NJT 8c - *Discorhabdus criotus* RD Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the RD of *Discorhabdus criotus* to the FO of *Watznaueria contracta*. It spans the late Toarcian, from the Speciosum up to the basal Aalensis Zone. This subzone partially corresponds to the NJ7 Zone of [Bown and Cooper \(1998\)](#) and to the top NJT7b Subzone of [Mattioli and Erba \(1999\)](#). Within this subzone occur the FOs of *B. davyi* and *T. tiziense*, and also the LO of *S. giganteum*. The reference sections for this subzone are Brenha and Cabo Mondego.

#### NJT 8d - *Watznaueria contracta* Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the FO of *Watznaueria contracta* to the RD of *Lotharingius crucicentralis*. It spans the late Toarcian and early Aalenian, from the basal Aalensis up to the basal Opalinum Zone. This subzone partially corresponds to the NJ8a Subzone of [Bown and Cooper \(1998\)](#) and to the NJT8a Subzone of [Mattioli and Erba \(1999\)](#). Within this subzone occur the LOs of *M. pulla* and *C. cavus*. The reference sections for this subzone are Brenha and Cabo Mondego. The FO synchronicity of *Watznaueria contracta* in both Cabo Mondego and Brenha sections renders this index species a robust marker for the Meneghinii/Aalensis Zone boundary. The name of this subzone was used by [Bown \(1988\)](#) to define the interval between the FO of *Lotharingius contractus* and the FO *Watznaueria britannica*. It was later emended by [Mattioli and Erba \(1999\)](#) who defined the *W. contracta* subzone from the FO of *W. contracta* and the FO of *Cyclagelosphaera margerelii*. Within this subzone lies the Toarcian/Aalenian boundary (Early/Middle Jurassic).

#### NJT8e - *Lotharingius crucicentralis* RD Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the RD of *Lotharingius crucicentralis* to the FO of *Carinolithus magharensis*. It spans part of the early Aalenian within the Opalinum Zone. This subzone partially corresponds to the NJ8a Subzone of [Bown and Cooper \(1998\)](#) and to the NJT8b Subzone of [Mattioli and Erba \(1999\)](#). The reference sections for this subzone are Brenha and Cabo Mondego.



#### NJT8f - *Carinolithus magharensis* Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the FO of *Carinolithus magharensis* to the FO of *Watznaueria* aff. *W. contracta*. It spans the early and middle Aalenian, from part of the Opalinum up to the basal Murchisonae Zone. This subzone partially corresponds to the NJ8a Subzone of Bown and Cooper (1998) and to the NJT8b Subzone of Mattioli and Erba (1999). Within this subzone occurs the LO of *C. poulabronei*. The reference sections for this subzone are Brenha and Cabo Mondego. The FO of *C. magharensis* is of the utmost importance as it can be used to constrain the base of the Aalenian. The FO synchronicity of *C. magharensis* in both Cabo Mondego and Brenha sections makes this index species a robust early Aalenian marker, easily identifiable by its unmistakable hexagonal shape in distal view, made up of six triangular elements. Actually, up until now the FO of *C. magharensis* represented the most reproducible bioevent in the Mediterranean province for the basal Aalenian and was hence used in the definition of the GSSP of the Aalenian stage in the Fuentelsaz section (Cresta et al., 2001).  $\delta^{18}\text{O}$  values reach their maxima within this subzone, thus indicating an extreme cooling event.

#### NJT8g - *Watznaueria* aff. *W. contracta* Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the FO of *Watznaueria* aff. *W. contracta* to the FO of *Watznaueria britannica*. It spans the middle Aalenian within the Murchisonae Zone. This subzone roughly corresponds to part of the NJ8b Subzone of Bown and Cooper (1998) and to the NJT8c Subzone of Mattioli and Erba (1999). Within this subzone occurs the RI of *Watznaueria* spp. with a cross in its central area. The reference section for this subzone is Cabo Mondego. *Watznaueria* aff. *W. contracta* is easily identified for its large size ( $> 7 \mu\text{m}$ ) and broadly elliptical central area filled with an axial cross, and can be used to approximately identify the early/middle Aalenian boundary (Opalinum/Murchisonae Zone).

#### NJT 9 - *Watznaueria britannica* Zone

Defined by Bown et al. (1988) and emended by Mattioli and Erba (1999), this zone ranges from the FO of *Watznaueria britannica* A, the earliest representative of the *W. britannica* plexus (i.e., *Watznaueria* with a bridge spanning across its central area) closely followed by the morphotypes B and D, to the FO of *Watznaueria manivittiae* (a *Watznaueria* with a closed central area and  $> 9 \mu\text{m}$ ; Cobianchi, 1992). It spans the middle Aalenian and early Bajocian, from part of the Murchisonae up to part of the Laeviuscula Zone. This zone roughly corresponds to part of the NJ8 Zone of Bown and Cooper (1998) and to part of the NJT8 and entire NJT9 Zone of Mattioli and Erba (1999). Within this zone occur the FOs of all *Watznaueria britannica* morphotypes described by Giraud et al. (2006), *Biscutum dorsetensis*, *Watznaueria communis*, *Retecapsa escaigii*, *Watznaueria* aff. *W. manivittiae* ( $< 9 \mu\text{m}$ ; Cobianchi et al., 1992) and the LOs of *Bussonius leufuensis*, *Crepidolithus granulatus*, *Similiscutum cruciulus*, *Similiscutum novum*, the large morphotype of *Calyculus* and *Parhabdololithus liasicus*. Moreover, in this zone is also observed the RD of *Lotharingius velatus* and the acme zone (RI and RD) of *Carinolithus superbus*. The reference section for this zone is Cabo Mondego. According to Reale et al. (1992) and Cobianchi (1992), *Watznaueria britannica* species were assigned to *Watznaueria* specimens possessing a bridge across their open central area. This bridge is parallel to the minor axis of the ellipse and is bright and optically-discontinuous with respect to the inner cycle of the coccolith rim under crossed-nicols. *Watznaueria britannica* varies considerably in coccolith size, opening of the central area, and shape of the bridge. Giraud et al. (2006) subdivided it into six morphotypes which are characterized as follows: 1) *W. britannica* A: small coccoliths ( $4.2 \mu\text{m}$  on average; Giraud et al., 2006), broadly elliptical to subcircular (length over ratio = 1.19), with an intermediate-sized central opening (26% of the coccolith) and a button-like bridge; 2) *W. britannica* B: medium-sized coccoliths ( $5.5 \mu\text{m}$  on average; Giraud et al., 2006), subelliptical (length over ratio = 1.23), with a small central opening (22% of the coccolith) and a button-like bridge; 3) *W. britannica* C: medium-sized coccoliths ( $5.3 \mu\text{m}$  on average; Giraud et al., 2006), broadly elliptical to

subcircular (length over ratio = 1.16), well-characterized by a wide, oval central opening (34% of the coccolith) transversely spanned by a distinctive thin bridge. This morphotype is the one resembling to the original diagnosis of *Coccolithus britannicus* by Stradner (1963); 4) *W. britannica* D: large coccoliths ( $7 \mu\text{m}$  on average; Giraud et al., 2006), subelliptical (length over ratio = 1.25), with a small-sized and sub-rectangular central opening (20% of the coccolith), and a thick bridge more or less parallel to the minor axis of the ellipse; 5) *W. britannica* E: medium to large coccoliths ( $6.1 \mu\text{m}$  on average; Giraud et al., 2006), subelliptical (length over ratio = 1.19), with a small-sized central opening (23% of the coccolith) and a rhombohedral bridge; 6) *W. britannica* F: medium-to-large coccoliths ( $6.1 \mu\text{m}$  on average; Giraud et al., 2006), narrowly elliptical (length over ratio = 1.3), with a very reduced central opening (14.5% of the coccolith) and a button-like bridge. Whatever the signification of these morphotypes (i.e., different species or ecophenotypes), they occur successively and represent important biostratigraphic events.

#### NJT 9a - *Watznaueria britannica* Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the FO of *Watznaueria britannica*, with morphotype A, B, and D occurring one after the other, to the FO of *Watznaueria communis*. It spans the middle Aalenian within the upper half of the Murchisonae Zone. This subzone partially corresponds to the NJ8b Subzone of Bown and Cooper (1998) and to the NJT8c Subzone of Mattioli and Erba (1999). Within this subzone occurs the FO of *B. dorsetensis* and the LOs of *B. leufuensis* and *C. granulatus*. Moreover, in this subzone is also observed the RD of *L. velatus*, the RI of *C. superbus* and the LCO of *P. liasicus*. The reference section for this subzone is Cabo Mondego.

#### NJT 9b - *Watznaueria communis* Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the FO of *Watznaueria communis* to the LO of *Similiscutum cruciulus*. It spans the whole late Aalenian and the Concavum Zone. This subzone partially corresponds to the NJ8b Subzone of Bown and Cooper (1998) and to part of the NJT8c and NJT9 Zone of Mattioli and Erba (1999). Within this subzone occur the FOs of *W. britannica* type C, E and F and *R. escaigii*. The reference section for this subzone is Cabo Mondego. *Watznaueria communis* is easily recognized by the optical continuum between its inner cycle and the thick bridge that crosses its central area (Cobianchi et al., 1992; Plate 2). Its FO is of the greatest importance as it closely defines the middle/late Aalenian boundary (Murchisonae/Concavum Zone). Despite its importance, this species has never been mentioned before in any biostratigraphic schemes or compilations. A minor but relevant bulk carbonate  $\delta^{13}\text{C}$  negative excursion occurs in this subzone (Suchéras-Marx et al., 2012).

#### NJT 9c - *Biscutum dorsetensis* Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the LO of *Similiscutum cruciulus* group to the LO of the large morphotype of *Calyculus*. It spans the early Bajocian within the totality of the Discites Zone. This subzone partially corresponds to the NJ8b Subzone of Bown and Cooper (1998) and to the NJT9 Zone of Mattioli and Erba (1999). In this subzone is observed the LO of *S. novum* and the RD of *C. superbus*. The reference section for this subzone is Cabo Mondego. The LO of *Similiscutum cruciulus* is of extreme importance as it lies at the Aalenian/Bajocian boundary (Concavum/Discites Zone). The disappearance of the small morphotypes of the genus *Similiscutum* in this subzone is pertinent, as these radiating placoliths were a major representative of Early Jurassic assemblages.

#### NJT 9d - *Calyculus* Subzone

Defined herein, this subzone ranges from the LO of the large morphotype of *Calyculus* sp. to the FO of *Watznaueria manivittiae*. It spans the early Bajocian within part of the Laeviuscula Zone. This subzone approximately matches the NJ8/NJ9 and NJT9/NJT10 Zone boundaries of Bown and Cooper (1998) and Mattioli and Erba (1999). Within this subzone occurs the FO of *W.* aff. *W. manivittiae* ( $< 9 \mu\text{m}$ ) and the LO of *P. liasicus*. The reference section for this subzone is Cabo Mondego. The LO of the large *Calyculus* represents an important bioevent as it lies at

the Discites/Laeviuscula Zone boundary.

NJT 10 - *Watznaeria manivittiae* Zone

Defined by Reale et al. (1992) and emended by Mattioli and Erba (1999), this zone ranges from the FO of *Watznaeria manivittiae* to the FO of *Watznaeria barnesiae*. It spans the early and late Bajocian, from part of the Laeviuscula up to part of the Parkinsoni Zone. This zone approximately corresponds to the NJ9 and NJ10 Zone of Bown and Cooper (1998) and matches the NJT10 Zone of Mattioli and Erba (1999). Within this zone occurs the LO of *Diductius constans* and although the upper Bajocian stage was not sampled, it is in this interval that occurs the LO of *Carinolithus superbus*. Also in this zone are recorded the RIs of *Watznaeria* aff. *W. manivittiae* and *Watznaeria manivittiae*, and the RD of *Watznaeria* sp. with a cross. This zone records a distinct shift towards higher  $\delta^{13}\text{C}$  values.

## 6. Discussion

### 6.1. Comparison with previous studies

First and last occurrence datums recorded in this study are plotted against the ammonite biozonation defined for the Lusitanian Basin, a region where exchanges between NW European and Mediterranean water masses occurred. However, the correlation of nannofossil bioevents and ammonite zones between other western Tethys basins is not always seamless due to the pronounced ammonite provincialism during the Early and Middle Jurassic (e.g., Macchioni and Cecca, 2002; Dommergues et al., 2009; Dera et al., 2011b). Though diachroneity between nannofossil events is often interpreted as due to poor preservation or palaeoprovincialism, bioevents bearing significant discrepancies are here scrutinized and possible causes for such inconsistencies debated.

#### 6.1.1. Discrepancies due to ammonite stratigraphy

In Table 1, the comparison between ammonite zones associated with the bioevents used in this work for establishing biozones and that from the literature is presented. Reference nannofossil biostratigraphy papers for the NW Europe (Bown, 1987; Bown and Cooper, 1998) are based on numerous sections and boreholes in Europe, Portugal and offshore Morocco. However, a detailed ammonite zonation is only shown in these works for the Jurassic Mochras borehole and the Brenha section. Although ammonite zones for the Toarcian stage in NW Europe have all been recognized in the Mochras borehole (Ivimey-Cook, 1971; Copestake and Johnson, 2014), one may argue that the macrofossil record from a core is more fragmentary than in well-exposed outcrops like those from the Portuguese coast. As such, fragmentation may yield a degree of uncertainty with regard to ammonite zone boundaries. The same concern affects the boreholes studied in northern France by Peti et al. (2017) and in Germany by van de Schootbrugge et al. (2018). As for the Brenha section, it has already been studied by Hamilton (1977, 1979) and Bown (1987) and now the present work. However, no detailed work on ammonite biostratigraphy exists in the literature regarding this section. Apart from Brenha, all the other sections, hold a very accurate ammonite biostratigraphy that has been extensively studied since the Fifties (e.g., Mouterde, 1955; Phelps, 1985; Henriques et al., 2016). These sections bear a well-established ammonite stratigraphy, where two GSSP were defined: one at the base of the Toarcian stage in the Peniche peninsula (Rocha et al., 2016) and the other at the base of the Bajocian stage in the Cabo Mondego area (Pavia and Enay, 1997).

Apart from the aforementioned problem linked to the precision of ammonite zone definition, palaeoprovincialism may also have an impact on ammonite chronostratigraphy. The FO of *Carinolithus superbus* is a distinctive event. This species is easily identifiable due to its developed distal inner tube and its closed central area, granting it an unmistakable T-shape in side view. This species is easily distinguishable from its sibling *C. poulabronei* since the distal shield of the latter holds

a slightly open central area and thus displays a V-shape in side view (Plate 1). The FO of *C. superbus* occurs during the  $\delta^{13}\text{C}$  positive rebound, between the Pliensbachian/Toarcian boundary and the T-OAE  $\delta^{13}\text{C}$  negative excursion. However, its FO is diachronous in the literature (Table 1), occurring either in the earliest or the second early Toarcian ammonite zone. As already mentioned, the Toarcian was an age of relevant ammonite provincialism that can be attested by the different zonal markers used in Mediterranean and NW European sections: Polymorphum versus Tenuicostatum for the earliest zone, and Levisoni versus Serpentinum or Falciferum for the latest zone (Fig. 3). In the literature, the first and second Toarcian ammonite zone are considered to be synchronous across the Mediterranean and the NW Europe provinces (e.g., Gradstein et al., 2012). However, based on the first appearance datums (FAD) of ammonite species, Macchioni and Cecca (2002) showed that the base of the Polymorphum Zone in the Mediterranean province predates the base of the Tenuicostatum Zone in NW Europe. Similarly, the base of the second Toarcian ammonite zone has been considered as potentially diachronous with regard to the  $\delta^{13}\text{C}$  minimum record during the T-OAE (see figure 5 in Jenkyns et al., 2002, and Fig. 1 in Wignall et al., 2005). The difficulty of large-scale correlation for the second ammonite zone of the Toarcian has been widely debated by Macchioni (2002). Such difficulties bring heavy consequences for the correlation of organic matter enriched levels and the related T-OAE negative  $\delta^{13}\text{C}$  excursion across Europe. Since it is now widely accepted that the early Toarcian negative  $\delta^{13}\text{C}$  excursion is a global and synchronous event, and that the base of the *C. superbus* zone encapsulates the onset of this excursion, it is probable that the diachronism in the FO of *C. superbus* is only apparent and likely due to discrepancies in the ammonite record. In fact, in many Mediterranean sites such as the Valdorbis section in central Italy, the ammonite record is very scarce in the organic-rich interval, and the base of the Serpentinum Zone was placed in the interval above the negative  $\delta^{13}\text{C}$  excursion of the T-OAE with some degrees of uncertainty (Sabatino et al., 2009).

#### 6.1.2. Discrepancies due to taxonomic concepts

The most representative genera of Early and Middle Jurassic assemblages are *Lotharingius* and *Watznaeria*. Despite their abundance and dominance during the Toarcian/Aalenian and Bajocian/Oxfordian, the two genera have been largely underestimated in feature biozonation schemes (e.g., Bown and Cooper, 1998; Mattioli and Erba, 1999). This is mainly due to the existence of morphological continuums, which have hampered clear taxonomic subdivisions. As already mentioned, the development over the last decade of bio- and morphometric techniques and taxonomic revisions have led to significant advances in the discrimination between morphospecies, with an indirect but relevant impact in biochronology. The FO of *L. hauffii* (Table 1) illustrates such impact. The rare discrepancies found in the literature for this reliable bioevent at the top of the Margaritatus Zone are most likely due to its misidentification, as the presence of small *Lotharingius* morphospecies, such as *L. frodoii*, occurs earlier.

Another event worth using for biochronological purposes is the FO of *L. sigillatus*. In the literature, this bioevent appears to be quite diachronous (Table 1). However, this apparent diachronism is related to different taxonomic concepts used in its identification. In fact, all the specimens assigned here to *L. sigillatus* bear the taxonomic criteria typical of this species but are in the lower range of the holotype size. Ferreira et al. (2017) showed that all *Lotharingius* species are very small during the late Pliensbachian and increase significantly at the end of the middle Toarcian. Some authors though, only consider true *L. sigillatus* those specimens larger than  $5\ \mu\text{m}$  (de Kaenel, personal communication). The specimens of *L. sigillatus* recorded here in the Margaritatus Zone are often slightly smaller than  $5\ \mu\text{m}$ , although they show the diagnostic traits of this species. Another possible explanation for the observed discrepancies is likely related to a species discontinuous record after its FO. For instance, most of the FOs of *L. sigillatus* that are found in the

**Table 1**  
Comparison between ammonite zones associated with bioevents used in this work, and feature literature Sandoval et al., 2008.

Zonal marker	Portugal				Morocco	Switzerland	NW Europe	Spain		central Italy	N France	Germany	
	This work (includes Mattioli et al. 2013)	Hamilton, 1977; 1979	Perilli and Duarte, 2006	de Kaenel et al., 1996	de Kaenel et al., 1996	de Kaenel et al., 1989	Bown and Cooper, 1998	Perilli, 2000; Perilli et al., 2010	Fraguas et al., 2015; 2018*	Aguado et al., 2008; 2017*; Sandoval et al., 2008*; 2012**	Mattioli and Erba, 1999	Peti et al., 2017	van de Schootbrugge et al., 2018
<i>W. marivillae</i>	<b>laeviuscula</b>						mid Bathonian			<b>laeviuscula/sauzei</b>			
<i>Calyculus</i> LO	very base laeviuscula	bifrons					top sauzei			mid meneghini***	top opalinum		
<i>S. cruciatus</i> LO	base discites						spinatum / tenuicostatum			top aalensis***	very top concavum		
<i>W. communis</i>	<b>very base concavum</b>		not studied							<b>top concavum***</b>	<b>base discites</b>		
<i>W. britannica</i>	mid murchisonae	tenuicostatum (3)			mid discites	mid discites	base laeviuscula			base discites*** (8)	very top concavum	not studied	
<i>W. aff. W. contracta</i>	base murchisonae							not studied	not studied		mid discites		not studied
<i>H. magharensis</i>	<b>base opalinum</b>			<b>top opalinum</b>			levesquei / opalinum			<b>top opalinum***</b>	<b>mid opalinum</b>		
<i>W. contracta</i>	<b>base aalensis</b>	<b>top aalensis</b>		base opalinum	<b>very top aalensis</b>	base murchisonae				<b>base opalinum***</b>	base opalinum		
<i>R. incompta</i>	base gradata		base bonarelli	base pseudoradiosa	base opalinum	mid aalensis	top levesquei			<b>mid aalensis***</b>			
<i>D. criolus</i>	<b>mid bifrons</b>	top gradata	base variabilis	<b>top bifrons</b>	top variabilis	<b>bifrons/variabilis</b>				<b>top bifrons***</b>	mid thoursense	<b>mid bifrons (9)</b>	
<i>W. colacicchii</i>	<b>base bifrons</b>									<b>mid bifrons***</b>	<b>top serpentinum</b>		
<i>D. striatus</i>	<b>top levisoni</b>	base bifrons	top bifrons	<b>very top serpentinus</b>	<b>top serpentinus</b>	<b>very top falciferum</b>	<b>very top serpentinus</b>			<b>top serpentinum***</b>	<b>top serpentinum</b>	<b>top serpentinum (9)</b>	mid bifrons
<i>M. jansae</i> LO	<b>mid levisoni</b>	<b>base levisoni</b>	base bifrons	<b>very top serpentinus</b>	very top tenuicostatum	<b>very top falciferum</b>	<b>base serpentinus</b>				<b>top serpentinum</b>	unzoned between tenuicostatum / serpentinum (9)	top serpentinum
<i>C. superbus</i>	<b>mid polymorphism</b>	<b>tenuicostatum / falciferum</b>	mid levisoni	mid bifrons	middle serpentinus	<b>base falciferum</b>	mid serpentinus	<b>top tenuicostatum</b>	<b>base serpentinum***</b>	<b>mid tenuicostatum</b>	unzoned between tenuicostatum / serpentinum (9)	top serpentinum	
<i>Z. erectus</i>	<b>very base tenuicostatum</b>	earlier than oxynotum (4)					spinatum / tenuicostatum				<b>very top spinatum</b>		
<i>L. crucicentralis</i>	<b>mid emaciatum</b>						tenuicostatum	<b>spinatum</b>	<b>top emaciatum***</b>	base tenuicostatum	mid margaritatus (10)		
<i>L. hauffii</i>	<b>top margaritatus (1)</b>			<b>top margaritatus</b>	<b>top margaritatus</b>	<b>very top margaritatus</b>	<b>mid margaritatus</b>	base margaritatus	base margaritatus* / mid margaritatus*		top emaciatum	<b>top margaritatus</b>	very top davoei (11)
<i>L. sigillatus</i>	<b>mid margaritatus (2)</b>	tenuicostatum / falciferum (5)		very top spinatum	very top tenuicostatum	base spinatum	base spinatum	base spinatum			top emaciatum	<b>top margaritatus</b>	<b>base margaritatus</b>
<i>P. robustus</i> LO	<b>base margaritatus</b>					base ibex	davoei	davoei			top ibex	<b>base margaritatus</b>	top ibex
<i>L. barozii</i>	<b>mid davoei</b>	not studied		<b>top davoei (6)</b>		tenuicostatum	base margaritatus	base margaritatus* / top margaritatus* / base margaritatus* / stokesi*	not studied		mid emaciatum	<b>top davoei</b>	
<i>B. grande</i>	mid ibex					mid spinatum	mid stokesi				stokesi / margaritatus	base margaritatus	
<i>S. cruciatus</i>	<b>base jamesoni</b>		mid jamesoni	<b>very base jamesoni (7)</b>	mid jamesoni	<b>base jamesoni</b>	<b>mid jamesoni</b>	<b>mid jamesoni</b>			<b>base jamesoni</b>	unzoned just earlier jamesoni	top raricostatum
<i>M. protensa</i>	top raricostatum					very base jamesoni					very base raricostatum	earlier than raricostatum	
<i>M. lenticularis</i>	<b>base raricostatum</b>						mid raricostatum	not studied		<b>top raricostatum</b>	<b>very base raricostatum</b>	earlier than raricostatum	

In bold are shown consistent events. (1) in Mattioli et al. (2013) this event occurs in an undated interval between Margaritatus and Emaciatum zones; (2) in Mattioli et al. (2013) this event occurs at the top Emaciatum Zone, in which the FCO of *L. sigillatus* occurs; (3) as stated by Mattioli and Erba (1999), *E. britannica* of Hamilton (1977, 1979) are very likely thick *L. frodoii*, which are common in Peniche at the base of the Toarcian (Mailliot et al., 2007); (4) the basal part of the upper Sinemurian only outcrops in Quarries 1 and 2 which were not studied by Hamilton (1977; see Fig. 1). The Sinemurian in Brenha belongs to the Coimbra Fm that does not contain ammonites and is made of hard limestone. The layers where Hamilton (1977) took the samples where *Z. erectus* is reported belong to the lower Pliensbachian Vales das Fontes Fm. Our data show that *Z. erectus* is rare in Brenha whereas *P. liasicus* is common. Hence the common *Z. erectus* reported by Hamilton (1977) likely correspond to misinterpreted *P. liasicus*; (5) *Striatomarginis primitivus* and *Palaeoontospaera veterna* from Hamilton (1979; pictures 17 and 18) should be ascribed to *L. sigillatus*. Hamilton (1979) stated: "This group includes very small specimens of the genus *Ellipsagelosphaera* which cannot be identified at species level because of their small size. These specimens may be the ancestral forms of *Ellipsagelosphaera britannica*"; (6) the FO of *Lotharingius* spp. reported by Bergen in Portugal likely corresponds to *L. barozii*; (7) *S. orbiculus*. We consider the small *Similiscutum* all together; (8) Aguado et al. (2008) states that *W. britannica* and *W. communis* are present in the uppermost Aalenian; (9) calcareous nannofossil data in Peti et al. (2015) come from Boulila et al. (2014); (10) pictures of this species are lacking in Peti et al. (2017). However, the anomalous early record of *L. crucicentralis* might be due to presence of misidentified specimens of *L. sigillatus* in the Margaritatus Zone; (11) according to the pictures shown, it corresponds to *L. frodoii*.

literature are herein equivalent to its FCO (late Pliensbachian Emaciatum Zone).

Discrepancies also occur for the FO of *Watznaueria britannica* which was previously deemed a good marker for the Aalenian/Bajocian boundary (Mattioli and Erba, 1999). After a thorough review, the FO of *W. britannica* morphotypes A, B and D are herein recorded in the middle part of the Murchisonae Zone (middle Aalenian), whereas morphotypes E, F and C first occur in the upper part of Concavum Zone. *Watznaueria britannica* morphotypes A and B correspond to relatively small coccoliths, whereas morphotype C is characterized by large specimens with a relatively wide central area spanned by a thin bar (Giraud et al., 2006). This study shows for the first time the FO of the various morphotypes of *W. britannica*, as Giraud et al. (2006) only dealt with Oxfordian material. The anomalous record of *Ellipsagelosphaera* (syn. *Watznaueria*) *britannica* reported in the basal Toarcian by Hamilton (1979) in Portuguese sections is most likely due to the presence of overgrown specimens of large *L. frodoii* (Plate 1). Mailliot et al. (2007) observed in various lower Toarcian samples from the Peniche section, overgrown specimens of *L. frodoii* with high birefringence colours and a structure in the central area mimicking a transverse bridge. These specimens probably correspond to transitional forms between *Lotharingius* and *Watznaueria britannica* morphotype F as described by Giraud et al.

(2006). The Aalenian has received relatively less attention than the Toarcian age, and nannofossil biostratigraphy can be more complex during this time interval due to the coexistence of *Watznaueria* species with a cross structure in the central area (*W. colacicchii*, *W. contracta*, *W. aff. W. contracta*) and with a transversal bar, such as *W. britannica* morphotypes.

### 6.1.3. Discrepancies due to sedimentary features

The late Pliensbachian and the early Toarcian are intervals where important glacio-eustatic sea level changes occurred (Guex et al., 2001; Pittet et al., 2014). Condensations and hiatuses happened both related to sea level low and to subsequent fast transgressions (Pittet et al., 2014). Such sedimentary features greatly affected the nannofossil record, particularly at the Pliensbachian/Toarcian transition and in the ensuing Polymorphum Zone. This can be at the origin for the discrepancies observed in the record of the FO of *L. crucicentralis* (Table 1), but also for *D. ignotus* and *C. superbus*. In fact, the latter two species occur in the Polymorphum Zone during the Pliensbachian/Toarcian negative  $\delta^{13}C$  excursion and subsequent positive  $\delta^{13}C$  rebound. However, two important, supra-regional discontinuities occurred at that time: a condensation and a hiatus (D1 and D2 in Pittet et al., 2014). During the subsequent T-OAE negative  $\delta^{13}C$  excursion, nannofossils



experienced a dramatic decrease in abundance that culminated with their blackout in some regions (Bucefalo Palliani et al., 2002; Mattioli et al., 2009). *Discorhabdus ignotus* in particular, acts like a Lazarus species during the T-OAE, re-emerging with a consistent record in the aftermath of the isotopic perturbation (Mattioli et al., 2013; FCO in Fig. 2). Nannofossil biostratigraphy is therefore quite complex in the interval comprised between the Pliensbachian/Toarcian boundary and the end of the T-OAE, but due to their remarkable continuity, the Portuguese sections represent an excellent record of this time interval and allow a better understanding of the succession of nannofossil events.

### 6.2. New nannofossil zonation for the Lusitanian Basin

Between the late Sinemurian and the early Bajocian, Portuguese sections yielded almost 100 nannofossil bioevents (Fig. 2) comprising not only the index species FO and LO but also, when suitable, their FCO, LCO, RI and RD. A common pattern in nannofossil distribution seems to be the discontinuous record of a given taxon after its FO is observed, and then followed by its consistent record. Hence, in certain cases also RI and RD may bear biostratigraphic information. This is the first time such an approach is used with Jurassic nannofossils, although a similar approach has already been successfully used for the Paleogene stratigraphy by Agnini et al. (2014). In order to improve the biochronological resolution of nannofossil zonation with regard to feature schemes (Bown and Cooper, 1998; Mattioli and Erba, 1999), 28 bioevents are used herein to define nannofossil zones and subzones (Fig. 3). In order to avoid major divergences with the literature, zonal markers used in previous schemes are whenever possible kept. The NJT6 Zone (*Carinolithus superbus*) for example, is widely used in the literature as it comprises the  $\delta^{13}\text{C}$  negative excursion of the T-OAE. Consequently, all of the zone defining criteria are preserved with regard to Bown and Cooper (1998) and Mattioli and Erba (1999). However, the chronostratigraphic duration of the new zones is in most cases different with respect to the literature, as some index species (e.g., *Retecapsa incompta*) turn out to appear much earlier than what had been previously reported. Nonetheless, in order to obtain a stratigraphic resolution as high as ammonite biostratigraphy, a relatively high number of subzones are here introduced. In some cases, these subzones are defined in order to constrain as closely as possible marked  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  excursions which in turn correspond to important palaeoceanographic or palaeoclimatic events.

### 6.3. Nannofossil evolution and $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ excursions

Between the Sinemurian and Bajocian ages, major  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  events are acknowledged in the Lusitanian Basin (Fig. 4) and are as of now, dated by a comprehensive nannofossil zonation scheme. Some of these isotopic events match important steps in the early evolution of Jurassic coccolithophores. The Sinemurian/Pliensbachian  $\delta^{13}\text{C}$  negative excursion already recorded by Duarte et al. (2014) from bulk rock samples is corroborated by our new data obtained from brachiopod calcite (Fig. 4). In fact, the sharp negative shift of  $\delta^{13}\text{C}$  values observed within the late Sinemurian (Raricostatium Zone) suggests that this excursion started before the Sinemurian/Pliensbachian boundary at the basal NJT3c Subzone. During that time interval, the tiered placolith genus *Mazaganella* and the radiating placoliths of the genus *Similiscutum* arose. The entry of new Biscutateae placolith-coccoliths makes the early Pliensbachian one of the most important time intervals in coccolithophore evolution. Actually, the emergence of the placolith morphology allow coccoliths to physically inter-lock and form for the first time a coccosphere able to fossilize. Prior to this morphological innovation, the murolith-coccoliths were presumably bound together around the cell by organic material (Bown, 1987) and once the coccospheres were buried within sediments, they would then crumble. Although it is unclear how the placolith morphology did appear in

western Tethys and from which ancestor it evolved from (Bown, 1987), it cannot be excluded that following the opening of the Hispanic Corridor during the earliest Pliensbachian, these coccoliths might have migrated from the Panthalassa Ocean (Planck et al., 2016; Wiggan et al., 2018). A similar explanation is provided by van de Schootbrugge et al. (2005) to explain the invasion of the Tethys by the palaeo-Pacific dinoflagellate *Liasidium variabile*.

The second phase in placolith evolution is characterized by the introduction of more complex imbricated coccoliths with a bicyclic distal shield. The FO of *Lotharingius barozii* in the uppermost part of the early Pliensbachian illustrates this evolutionary step, as it probably evolved from the bicyclic radiating placolith *Bussonius*. This phase corresponds to the Davoei Zone thermal peak (Silva et al., 2011; Silva and Duarte, 2015) at the NJT4b/NJT4c boundary. Throughout the ensuing Margaritatus Zone, the low brachiopod  $\delta^{18}\text{O}$  values suggest an episode of warm bottom water temperatures during which several species of the *Lotharingius* genus first appeared. During an episode of extreme cooling in the Emaciatum (Spinatum) Zone, as indicated by a marked increase in oxygen isotope values suggesting that bottom water temperatures drop by  $\sim 7^\circ\text{C}$  with regard to the previous Margaritatus Zone (Suan et al., 2008, 2010), small forms of *Biscutum* (*B. dubium* and *B. intermedium*) and two *Lotharingius* species that will later dominate the coccolithophore community (*L. crucicentralis* and *L. velatus*), emerge. NJT5b Subzone spans across almost the totality of this event and again, data show that extreme environmental changes are likely connected to the appearance of new species. The extensively studied Pliensbachian/Toarcian  $\delta^{13}\text{C}$  negative excursion (e.g., Hesselbo et al., 2007; Suan et al., 2008, 2010; Pittet et al., 2014) matches the base of the NJT5c Subzone, when the first species of the *Zeughrabdotos* genus occurs. Coeval with a severe cooling and likely the onset of a glacio-eustatic sea level low (Guex et al., 2001; Pittet et al., 2014), NJT5b and NJT5c Subzones correspond to a period of probable allopatric speciation of placolith-coccoliths (Menini et al., 2019). From this moment on, placoliths replace the murolith morphology in terms of abundance and dominate the coccolith floras for the remainder of the Jurassic (Bown, 1987; Mattioli and Erba, 1999; Menini et al., 2019). The widely-studied T-OAE interval occurs “shortly” after the arrival of the *Carinolithus* genus and the ensuing Levisoni warming period as shown by  $\delta^{18}\text{O}$  excursions (Suan et al., 2008, 2010; Ferreira et al., 2015), spanning throughout almost the entire NJT6 Zone. Values in  $\delta^{13}\text{C}$  reach their maxima within this zone, increasing by a staggering  $\sim 3.0\%$  before dropping, hence unambiguously describing a positive excursion throughout part of NJT6 and the Levisoni Zone (see also Duarte et al., 2007 and Hesselbo et al., 2007 for bulk carbonate samples). In the aftermath of the T-OAE and during the Levisoni  $\delta^{13}\text{C}$  positive excursion, the FCO of small *Discorhabdus ignotus* is observed and only *Mitrolithus jansae* becomes extinct. During the rebuilding of marine ecosystems that followed the T-OAE, the genus *Watznaueria* is recorded for the first time ever. The FO of *W. fossacincta* and later of its siblings, is quite significant as this genus will numerically dominate the nannofossil assemblages for the remaining Mesozoic. From the Bifrons and NJT7 Zone,  $\delta^{13}\text{C}$  values start returning to their pre-excursion record while a steady and long-term increase in  $\delta^{18}\text{O}$  values commences. During this interval, a significant increase in the mean size of all the *Lotharingius* species occur (Ferreira et al., 2017). Such size shift is partly related to a species-specific replacement within the *Lotharingius* pool, where abundant early Toarcian small-sized species are replaced by large-sized ones during the middle and late Toarcian. This pattern however, was also accompanied by the size increase of all *Lotharingius* morphospecies across the middle Toarcian.

Bottom water temperatures reached their minima within NJT8f Subzone when a drastic cooling of  $\sim 6^\circ\text{C}$  is suggested by brachiopod oxygen isotope values near the Toarcian-Aalenian transition, and across the Opalinum Zone (Fig. 4). No new taxa occur during this period and a sharp, distinctive decrease in *Lotharingius crucicentralis* relative abundance is recorded. After this extreme cooling event, and still within a

steady long-term temperature decline interval, the radiation of *Watznaueria* accelerated from the middle Aalenian up to the early Bajocian. During ~2 Myr, from NJT8g to NJT9d Subzones, new *Watznaueria* morphotypes occurred: with a cross in their central area (*W. aff. W. contracta*), with a bar in their central area (*W. britannica* types A, B, D, and *W. communis*) and ultimately, with a closed central area (*W. aff. W. manivittiae*). Although already suggested by Jenkyns et al. (2002) and supported by the bulk carbonate data by Suchéras-Marx et al. (2012) in the Cabo Mondego section, the Discites  $\delta^{13}\text{C}$  negative excursion is not clearly perceivable in brachiopod calcite likely due to the low sampling density in this interval. However, a decrease in  $\delta^{13}\text{C}$  values is observed from the NJT9 Zone coeval with the *Watznaueria* speciation. This radiation reflects the decrease in abundance of *Lotharingius* species already observed in other works (e.g., Ferreira et al., 2015; Giraud et al., 2016; Aguado et al., 2017; Wiggan et al., 2018), particularly that of *L. crucicentralis* whose RD happens at the temperature minimum, and of *L. velatus*. The *Watznaueria* radiation and its subsequent ecological dominance was not made at the expenses of other genera but through its integration in the coccolithophore community (Suchéras-Marx et al., 2015). The expansion of *Watznaueria* occurred in two separate steps: first, during the latest Aalenian and earliest Bajocian, where morphotypes with a cross in their central area such as *W. colacicchii*, *W. contracta* and *W. aff. W. contracta* dominated (Suchéras-Marx et al., 2015; Giraud et al., 2016; Wiggan et al., 2018); and second, during the early Bajocian when species lacking a central cross, those with a central bar and those with a closed central area such as *W. aff. W. manivittiae* and *W. manivittiae* increased their abundance (Giraud et al., 2016). The *Watznaueria* upsurge roughly coincides with the Propinquans positive excursion, when  $\delta^{13}\text{C}$  values steadily and consistently increase by ~1‰. This phase of increased surface water fertility starts from the early Bajocian and defines the base of the NJT10 Zone.

## 7. Conclusions

This account presents a unique, thorough and systematic nannofossil analysis of ~800 m thick west Tethyan successions spanning ~24 Myr and yielding a comprehensive biostratigraphic scheme for the Early and Middle Jurassic epochs. Nearly 100 biostratigraphic horizons (FO, LO, FCO, LCO, RI and RD) have been identified through repeated sample double-check and taxa blind test assessment. This endeavour tries to reconcile two major zonation schemes widely used in the literature for two discrete Tethyan provinces and thus, nannofossil zones previously defined for NW Europe and Mediterranean provinces are kept. The significant number of subzones recognized - 30 subzones - allows a more detailed chronostratigraphic resolution for the Early and Middle Jurassic interval. In fact, the average duration of the newly defined nannofossil zones is 2.7 Myr (from ~1.5 Myr in NJT6 to ~6 Myr in NJT8), while the average duration for subzones is 0.8 Myr (from ~0.1 Myr in NJT9d to 1.6 Myr in NJT4c). Although bearing different evolutionary patterns, the nannofossil subzones defined herein, have a time resolution close to, or higher than, that of ammonites. More importantly, in this new zonation scheme, all major stage or substage boundaries are defined with respect to a precise nannofossil zone or subzone: 1) the Sinemurian/Pliensbachian boundary in NJT3c; 2) the early/late Pliensbachian in NJT4c; 3) the Pliensbachian/Toarcian boundary that also corresponds to the GSSP at Peniche, dated at 182.7 Ma, matches the NJ5b/NJT5c boundary; 4) the early/middle Toarcian in NJT7a; 5) the middle/late Toarcian in NJT8b; 6) the Toarcian/Aalenian (Early/Middle Jurassic) in NJT8d; 7) the early/middle Aalenian in the upper part NJT8f; 8) the middle/late Aalenian defined by the base of NJT9b; 9) the Aalenian/Bajocian boundary also representing the GSSP at Cabo Mondego, dated at 170.3 Ma, corresponds to the base of NJT9c.

For the first time, all the major C and O isotope excursions recorded in this time interval by brachiopod shells and marking major palaeoclimatic and palaeoceanographic events are here dated by means of

nannofossil zones: the Sinemurian/Pliensbachian  $\delta^{13}\text{C}$  negative excursion in NJT3c; the Davoei event at the NJT4b/NJT4c boundary; the Emaciatum cooling event in NJT5b; the Pliensbachian/Toarcian  $\delta^{13}\text{C}$  negative excursion at the NJT5b/NJT5c boundary; the T-OAE negative excursion in NJT6a; the Levisoni  $\delta^{13}\text{C}$  positive excursion in NJT6b; the Opalinum extreme cooling event in NJT8f and the Propinquans  $\delta^{13}\text{C}$  positive excursion in NJT10a.

The sometimes scarce and discontinuous ammonite record and their characteristic palaeoprovincialism during the Early and Middle Jurassic epochs can, from this work, be surpassed since the occasionally ambiguous ammonite zones boundaries can now be correlated to chemo and nannofossil biostratigraphy. This work also demonstrates that the continuous and contiguous record of calcareous nannofossil allows to attain a high-resolution (interval zones) scheme for the Early and Middle Jurassic, thus showing the relevance of these organisms as performant biochronological tools.

## Acknowledgments

We thank the Editor, Prof. André Strasser, and the two anonymous reviewers for their valuable comments that allowed us to improve the overall quality of this manuscript. Ricardo Silva is warmly acknowledged for sharing his C isotope data with us. Ghislaine Broillet is warmly thanked for her help in sample preparation. All the rock samples and slides are curated at the Collections de Géologie de Lyon, with appropriate FSL number. The present accounts result from > 15 years of nannofossil studies in the Lusitanian Basin. J.F., E.M., B.S.-M., and F.G. are the authors of the nannofossil stratigraphy here presented. We wish to thank Samuel Mailliot, Letizia Reggiani and Julien Plancq who have published previous nannofossil data in the frame of their PhD theses. B.P. and L.V.D. have ensured fieldwork and log drawing. G.S., A.H. and J.E.S. have performed stable isotope analyses. Funding was provided by the Actions Intégrées Luso-Françaises to J.F. and EM, the project PAULF to E.M. and L.V.D., and TelluS SYSTER to E.M.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.earsci.2019.102908>.

## References

- Agnini, C., Fornaciari, E., Raffi, I., Catanzariti, R., Pälke, H., Backman, J., Rio, D., 2014. Biozonation and biochronology of Paleogene calcareous nannofossils from low and middle latitudes. *Newsl. Stratigr.* 47 (2), 131–181.
- Aguado, R., O'Dogherty, L., Sandoval, J., 2008. Fertility changes in surface waters during the Aalenian (mid-Jurassic) of the western Tethys as revealed by calcareous nannofossils and carbon-cycle perturbations. *Mar. Micropaleontol.* 68, 268–285.
- Aguado, R., O'Dogherty, L., Sandoval, J., 2017. Calcareous nannofossil assemblage turnover in response to the early Bajocian (middle Jurassic) palaeoenvironmental changes in the Subbetic Basin. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 472, 128–145.
- Alves, T.M., Gawthorpe, R.L., Hunt, D.W., Monteiro, J.H., 2002. Jurassic tectono-sedimentary evolution of the Northern Lusitanian Basin (offshore Portugal). *Mar. Pet. Geol.* 19, 727–754.
- Arias, C., 2007. Pliensbachian-Toarcian ostracod biogeography in NW Europe: evidence for water mass structure evolution. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 251, 398–421.
- Auclair, A.-C., Joachimski, M.M., Lécuyer, C., 2003. Deciphering kinetic, metabolic and environmental controls on stable isotope fractionations between seawater and shell of *Tetrabratalia transversa* (Brachiopoda). *Chem. Geol.* 202, 59–78.
- Azerêdo, A.C., Duarte, L.V., Henriques, M.H., Manuppella, G., 2003. Da dinâmica continental no Triásico aos mares do Jurássico Inferior e Médio. *Cadernos de Geologia de Portugal. Instituto Geológico e Mineiro, Lisboa*, pp. 43.
- Azerêdo, A.C., Duarte, L.V., Silva, R.L., 2014. Configuração sequencial em ciclos (2 ordem) de fácies transgressivas-regressivas do Jurássico Inferior e Médio da Bacia Lusitânica (Portugal). *Comunicações Geológicas* 101, 383–386 Especial I.
- Bassoulet, J.P., Elmi, S., Poisson, A., Cecca, F., Bellion, Y., Guiraud, R., Baudin, F., 1993. Mid Toarcian. In: Dercourt, J., Ricou, L.E., Vrielynck, B. (Eds.), *Atlas of Tethys Paleoenvironmental Maps. Becip-Franlab, Rueil-Malmaison, France*, pp. 63–80.
- Bjerrum, C.J., Surlyk, F., Callomon, J.H., Slingerland, R.L., 2001. Numerical Paleooceanographic study of the early Jurassic transcontinental Laurasian Seaway. *Paleoceanography* 16, 390–404.

- Bown, P.R., 1987. Taxonomy, evolution and biostratigraphy of Late Triassic-Early Jurassic calcareous nannofossils. *Spec. Pap. Palaeontol.* 38, 1–118.
- Bown, P.R., Cooper, M.K.E., 1989. New calcareous nannofossil taxa from the Jurassic. *J. Micropaleontol.* 8, 91–96.
- Bown, P.R., Cooper, M.K.E., 1998. Jurassic. In: Bown, P.R. (Ed.), *Calcareous Nannofossils Biostratigraphy*. British Micropaleontological Society Publication Series, Kluwer Academic Publishers, Cambridge, pp. 34–85.
- Bown, P.R. with contributions from the International Nannoplankton Association, Jurassic Working Group, 1996. Recent advances in Jurassic calcareous nannofossil research. *GeoResearch Forum* 1–2, 55–66.
- Bown, P.R., Cooper, M.K.E., Lord, A.R., 1988. A calcareous nannofossil Biozonation scheme for the early to mid Mesozoic. *Newslett. Stratigr.* 20, 91–111.
- Brand, U., Azmy, K., Bitner, M.A., Logan, A., Zushin, M., Came, R., Ruggiero, E., 2014. Oxygen isotopes and MgCO<sub>3</sub> in brachiopod calcite and a new paleotemperature equation. *Chem. Geol.* 359, 23–31.
- Bucefalo Palliani, R., Riding, J.B., 2003. Biostratigraphy, provincialism and evolution of European Early Jurassic (Pliensbachian to Early Toarcian) dinoflagellate cysts. *Palynology* 27, 179–214.
- Bucefalo Palliani, R., Mattioli, E., Riding, J.B., 2002. The response of marine phytoplankton and sedimentary organic matter to the early Toarcian (Lower Jurassic) oceanic anoxic event in northern England. *Mar. Micropaleontol.* 46, 223–245.
- Carpenter, S.J., Lohmann, K.C., 1995. <sup>18</sup>O and <sup>13</sup>C values of modern brachiopod shells. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 3749–3764.
- Cobianchi, M.A., 1992. Sinemurian-Early Bajocian Calcareous Nannofossil Biostratigraphy of the Lombardy Basin (Southern Calcareous Alps; Northern Italy). *Atti Ticinensi Sc. Terra* 35, 61–106.
- Comas-Rengifo, M.J., Duarte, L.V., Goy, A., Paredes, R., Silva, R.L., 2013. El Sinemuriense Superior (cronozonas Oxynotum y Raricostatum) en la región de S. Pedro de Moel (Cuenca Lusitánica, Portugal). *Comunicações Geológicas* 100, 15–19 Especial I.
- Copestake, P., Johnson, B., 2014. Lower Jurassic Foraminifera from the Llanbedr (Mochras Farm) Borehole, North Wales, UK. *Monograph of The Paleontographical Society*, London, pp. 403.
- Cresta, S., Goy, A., Ureta, S., Arias, C., Barrón, E., Bernard, J., Canales, M.L., García-Joral, F., García-Romero, E., Gialanella, P.R., Gómez, J.J., González, J.A., Herrero, C., Martínez, G., Osete, M.L., Perilli, N., Villalain, J.J., 2001. The global stratotype section and point (GSSP) of the Toarcian-Aalenian boundary (Lower-Middle Jurassic). *Episodes* 24, 166–175.
- de Kaenel, E., Bergen, J.A., 1993. New early and middle Jurassic coccolith taxa and biostratigraphy from the eastern proto-Atlantic (Morocco, Portugal and DSDP Site 547B). *Eclogae Geol. Helv.* 86, 861–908.
- de Kaenel, E., Bergen, J.A., von Salis Perch-Nielsen, K., 1996. Jurassic calcareous nannofossil biostratigraphy of western Europe. *Compilation of recent studies and calibration of bioevents*. *Bulletin de la Societe Géologique de France* 167, 15–28.
- Deflandre, G., Fert, C., 1954. Observations sur les coccolithophoridés actuels et fossiles en microscopie ordinaire et électronique. *Ann's. Paléontol.* 40, 115–176.
- Dera, G., Brigaud, B., Monna, F., Laffont, R., Pucéat, E., Deconinck, J.-F., Pellenard, P., Joachimski, M.M., Duret, C., 2011a. Climatic ups and downs in a disturbed Jurassic world. *Geology* 39, 215–218.
- Dera, G., Neige, P., Dommergues, J.-L., Brayard, A., 2011b. Ammonite paleobiogeography during the Pliensbachian-Toarcian crisis (Early Jurassic) reflecting paleoclimate, eustasy, and extinctions. *Glob. Planet. Chang.* 78, 92–105.
- Dercourt, J., Gaetani, M., Vrielynck, B., Barrier, E., Biju Duval, B., Brunet, M.F., Cadet, J.P., Crasquin, S., Sandulescu, 2000. *Atlas Peri-Tethys, Palaeogeographical Maps*. CCGM/CGMW, Paris.
- Dommergues, J.L., Fara, E., Meister, C., 2009. Ammonite diversity and its palaeobiogeographical structure during the early Pliensbachian (Jurassic) in the western Tethys and adjacent areas. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 280, 64–77.
- Duarte, L.V., 1997. Facies analysis and sequential evolution of the Toarcian-Lower Aalenian series in the Lusitanian Basin (Portugal). *Comunicações do Instituto Geológico e Mineiro* 83, 65–94.
- Duarte, L.V., 2007. Lithostratigraphy, sequence stratigraphy and depositional setting of the Pliensbachian and Toarcian series in the Lusitanian Basin (Portugal). In: Rocha, R.B. (Ed.), *The Peniche Section (Portugal). Contributions to the Definition of the Toarcian GSSP*. International Subcommission on Jurassic Stratigraphy, pp. 17–23.
- Duarte, L.V., Soares, A.F., 2002. Litostratigrafia das séries margo-calciárias do Jurássico inferior da Bacia Lusitânica (Portugal). vol. 89. *Comunicações do Instituto Geológico e Mineiro*, pp. 135–154.
- Duarte, L.V., Oliveira, L.C., Rodrigues, R., 2007. Carbon isotopes as a sequence stratigraphic tool: examples from the lower and Middle Toarcian marly limestones of Portugal. *Bol. Geol. Min.* 118, 3–17.
- Duarte, L.V., Silva, R.L., Oliveira, L.C.V., Comas-Rengifo, M.J., Silva, F., 2010. Organic-rich facies in the Sinemurian and Pliensbachian of the Lusitanian Basin, Portugal: Total Organic Carbon and relation to transgressive-regressive facies cycles. *Geol. Acta* 8, 325–340.
- Duarte, L.V., Silva, R.L., Mendonça Filho, J.G., Poças Ribeiro, N., Chagas, R.B.A., 2012. High-resolution stratigraphy, palynofacies and source rock potential of the Água de Madeiros Formation (Lower Jurassic), Lusitanian Basin, Portugal. *J. Pet. Geol.* 35, 105–126.
- Duarte, L.V., Comas-Rengifo, M.J., Silva, R.L., Paredes, R., Goy, A., 2014. Carbon isotope stratigraphy and ammonite biostratigraphy across the Sinemurian-Pliensbachian boundary in the western Iberian margin. *Bull. Geosci.* 89 (4), 719–736.
- Fatela, F., Taborada, R., 2002. Confidence limits of species proportions in microfossil assemblages. *Mar. Micropaleontol.* 45, 169–174.
- Ferreira, J., Mattioli, E., Pittet, B., Cachão, M., Spangenberg, J.E., 2015. Palaeoecological insights on Toarcian and lower Aalenian calcareous nannofossils from the Lusitanian Basin (Portugal). *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 436, 245–262.
- Ferreira, J., Mattioli, E., van de Schootbrugge, B., 2017. Palaeoenvironmental vs. evolutionary control on size variation of coccoliths across the Lower-Middle Jurassic. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 465, 177–192.
- Fraguas, A., Erba, E., 2010. Biometric analyses as a tool for the differentiation of two coccolith species of the genus *Crepidolithus* (Pliensbachian, Lower Jurassic) in the Basque-Cantabrian Basin (Northern Spain). *Mar. Micropaleontol.* 77, 125–136.
- Fraguas, A., Young, J., 2011. Evolution of the coccolith genus *Lotharingius* during the Late Pliensbachian-Early Toarcian interval in Asturias (N Spain). *Consequences of the Early Toarcian environmental perturbations*. *Geobios* 44, 361–375.
- Fraguas, A., Comas-Rengifo, M.J., Perilli, N., 2015. Calcareous nannofossil biostratigraphy of the Lower Jurassic in the Cantabrian Range (Northern Spain). *Newslett. Stratigr.* 48 (2), 179–199.
- Fraguas, A., Comas-Rengifo, Goy, Gómez, J.J., 2018. Upper Sinemurian-Pliensbachian calcareous nannofossil biostratigraphy of the E Rodiles section (Asturias, N Spain): a reference section for the connection between the Boreal and Tethyan Realms. *Newslett. Stratigr.* 51 (2), 227–244.
- Geisen, M., Bollman, J., Herrle, J.O., Mutterlose, J., Young, J.R., 1999. Calibration of the random settling technique for calculation of absolute abundances of calcareous nannoplankton. *Micropaleontology* 45, 437–442.
- Giraud, F., Pittet, B., Mattioli, E., Audouin, V., 2006. Palaeoenvironmental controls on morphology and abundance of the coccolith *Watznaueria britannica* (Late Jurassic, southern Germany). *Mar. Micropaleontol.* 60, 205–225.
- Giraud, F., Mattioli, E., López-Otálvaro, G.E., Lécuyer, C., Suchéras-Marx, B., Alméras, Y., Martineau, F., Arnaud-Godet, F., de Kaenel, E., 2016. Deciphering processes controlling mid-Jurassic coccolith turnover. *Mar. Micropaleontol.* 125, 36–50.
- Goy, G., 1981. Nannofossiles calcaires des schistes carbon (Toarcien Inferieur) du Bassin de Paris. *Doc. de la RCP* 459, Nature et genèse des facies confinés. (Éditions du BRGM 1-86).
- Gradstein, F.M., Ogg, J.G., Schmitz, M., Ogg, G., 2012. *The Geological Time Scale 2012*. Elsevier.
- Guex, J., Morard, A., Bartolini, A., Moretini, E., 2001. Découverte d'une importante lacune stratigraphique à la limite Domérien-Toarcien: implications paléocéanographiques. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 345, 277–284.
- Hamilton, G., 1977. Early Jurassic calcareous nannofossils from Portugal and their biostratigraphic use. *Eclogae Geol. Helv.* 72, 575–598.
- Hamilton, G., 1979. Lower and Middle Jurassic calcareous nannofossils from Portugal. *Eclogae Geol. Helv.* 72, 1–17.
- Henriques, M.H., Canales, M.L., Silva, S.C., Figueiredo, V., 2016. Integrated biostratigraphy (Ammonoidea, Foraminifera) of the Aalenian of the Lusitanian Basin (Portugal): a synthesis. *Episodes* 39, 482–490.
- Hesselbo, S.P., Jenkyns, H.C., Duarte, L.V., Oliveira, L.C.V., 2007. Carbon-isotope record of the Early Jurassic (Toarcian) Oceanic Anoxic Event from fossil wood and marine carbonate (Lusitanian Basin, Portugal). *Earth Planet. Sci. Lett.* 253, 455–470.
- Ivimey-Cook, H.C., 1971. Stratigraphical palaeontology of the Lower Jurassic of the Llanbedr (Mochras Farm) Borehole. In: Woodland, A.W. (Ed.), *The Llanbedr (Mochras Farm) Borehole*. Institute of Geological Sciences, pp. 87–92 Report no. 71/18.
- Jenkyns, H.C., 1988. The Early Toarcian (Jurassic) anoxic event: stratigraphic, sedimentary and geochemical evidence. *Am. J. Sci.* 288, 101–151.
- Jenkyns, H.C., Jones, C.E., Gröcke, D.R., Hesselbo, S.P., Parkinson, D.N., 2002. Chemostratigraphy of the Jurassic System: applications, limitations and implications for palaeoceanography. *J. Geol. Soc.* 159, 351–372.
- Jones, C.E., Jenkyns, H.C., Coe, A.L., Hesselbo, S.P., 1994. Strontium isotopic variations in Jurassic and cretaceous seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58, 3061–3074.
- Jourdan, F., Féraud, G., Bertrand, H., Watkeys, M.K., Renne, P.R., 2007. Distinct brief major events in the Karoo large igneous province clarified by new <sup>40</sup>Ar/<sup>39</sup>Ar ages on the Lesotho basalts. *Lithos* 98, 195–209.
- Kullberg, J.C., Rocha, R.B., Soares, A.F., Rey, J., Terrinha, P., Azerêdo, A.C., Callapez, P., Duarte, L.V., Kullberg, M.C., Martins, L., Miranda, J.R., Alves, C., Mata, J., Madeira, J., Mateus, O., Moreira, M., Nogueira, C.R., 2013. A Bacia Lusitaniana: estratigrafia, paleogeografia e tectónica. *Geologia de Portugal* 2, 195–347.
- López-Otálvaro, G.-E., Henriques, M.H., 2018. High-resolution calcareous nannofossil biostratigraphy from the Bathonian ASSP of the Cabo Mondego Section (Lusitanian Basin, Portugal). *Newslett. Stratigr.* <https://doi.org/10.1127/nos/2018/0452>.
- López-Otálvaro, G.-E., Baptiste Suchéras-Marx, B., Giraud, F., Mattioli, E., Lécuyer, C., 2012. *Discorhabdus* as a key coccolith genus for paleoenvironmental reconstructions (Middle Jurassic, Lusitanian Basin): Biometry and taxonomic status. *Mar. Micropaleontol.* 94–95, 45–57.
- Lozar, F., 1992. Biostratigrafia a Nannofossili calcarei nel Lias: risultati di alcune sezioni nel Bacino Lombardo e nel Bacino Delfinese. *Paleopelagos* 2, 89–98.
- Lozar, F., 1995. Calcareous nannofossil biostratigraphy of lower Liassic from Western Tethys. *Palaeontographia Italica* 82, 91–121.
- Macchioni, F., 2002. Myths and legends in the correlation between the Boreal and Tethyan Realms. Implications on the dating of the Early Toarcian mass extinctions and the Oceanic Anoxic Event. *Geobios* 35 (M.S. 24), 150–164.
- Macchioni, F., Cecca, F., 2002. Biodiversity and biogeography of middle-late iassic ammonoids: implications for the Early Toarcian mass extinction. *Geobios* 35 (M.S. 24), 165–175.
- Mailliot, S., Elmi, S., Mattioli, E., Pittet, B., 2007. Calcareous nannofossil assemblages across the Pliensbachian/Toarcian boundary at the Peniche section (Ponta do Trovão, Lusitanian Basin). *Ciências da Terra* 15, 1–14.
- Mattioli, E., 1996. New calcareous nannofossil species from the early Jurassic of Tethys. *Riv. Ital. Paleontol. Stratigr.* 102, 397–412.
- Mattioli, E., Erba, E., 1999. Biostratigraphic synthesis of calcareous nannofossil events in the Tethyan Jurassic. *Riv. Ital. Paleontol. Stratigr.* 105, 343–376.



- Mattioli, E., Pittet, B., Young, J.R., Bown, P.R., 2004. Biometric analysis of Pliensbachian-Toarcian (Lower Jurassic) coccoliths of the family Biscutaceae: intra- and inter-specific variability versus palaeoenvironmental influence. *Mar. Micropalaeontol.* 52, 5–27.
- Mattioli, E., Pittet, B., Suan, G., Mailliot, S., 2008. Calcareous nannoplankton across the Early Toarcian Anoxic Event: implications for paleoceanography within the western Tethys. *Paleoceanography* 23, PA3208.
- Mattioli, E., Pittet, B., Petitpierre, L., Mailliot, S., 2009. Dramatic decrease of pelagic carbonate production by nannoplankton across the Early Toarcian anoxic event (T-OAE). *Glob. Planet. Chang.* 65, 134–145.
- Mattioli, E., Plancq, J., Boussaha, M., Duarte, L.V., Pittet, B., 2013. Calcareous nanofossil biostratigraphy: new data from the Lower Jurassic of the Lusitanian Basin. *Comunicações Geológicas* 100, 69–76.
- Menini, A., Mattioli, E., Spangenberg, J.E., Pittet, B., Suan, G., 2019. New calcareous nanofossil and carbon isotope data for the Pliensbachian/Toarcian boundary (Early Jurassic) in the western Tethys and their paleoenvironmental implications. *Newsl. Stratigr.* 52, 173–196.
- Mouterde, R., 1955. Le Lias de Peniche. *Comunicações dos Serviços Geológicos de Portugal* 36, 1–33.
- Mouterde, R., Ruget, C., 1975. Esquisse de la paleogeographie du jurassique inférieur et moyen en Portugal. *Bull. Soc. Geol. Fr.* 14, 779–786.
- Noël, D., 1972. Nanofossiles calcaires de sédiments jurassiques finement laminés. *Bull. Mus. Nat. Hist. Natur. Paris* 75, 95–156.
- Noël, D., 1973. Nanofossiles calcaire de sédiments jurassiques finement laminés. *Bull. Mus. Nat. Hist. Natur. Paris* 75, 95–156.
- Parkinson, D., Curry, G.B., Cusack, M., Fallick, A.E., 2005. Shell structure, patterns and trends of oxygen and carbon stable isotopes in modern brachiopod shells. *Chem. Geol.* 219, 193–235.
- Pavia, G., Enay, R., 1997. Definition of the Aalenian-Bajocian Stage boundary. *Episodes* 20, 16–22.
- Perilli, N., 2000. Calibration of early-middle Toarcian nanofossil events based on high-resolution ammonite biostratigraphy in two expanded sections from the Iberian Range (East Spain). *Mar. Micropaleontol.* 39, 293–308.
- Perilli, N., Duarte, L.V., 2006. Toarcian nannobiohorizons from Lusitanian Basin (Portugal) and their calibration against ammonite zones. *Riv. Ital. Paleontol. Stratigr.* 112, 417–434.
- Perilli, N., Goy, A., Comas-Rengifo, M.J., 2004. Calibration of the Pliensbachian-Toarcian calcareous nanofossil zone boundaries based on ammonite (Basque-Cantabrian area, Spain). *Riv. Ital. Paleontol. Stratigr.* 110, 97–107.
- Perilli, N., Fraguas, A., Comas-Rengifo, M.J., 2010. Reproducibility and reliability of the Pliensbachian calcareous nanofossil biohorizons from the Basque-Cantabrian Basin (Northern Spain). *Geobios* 43, 77–85.
- Peti, L., Thibault, N., Clémence, M.-E., Korte, C., Dommergues, J.-L., Bougeault, C., Pellenard, P., Jelby, M.E., Ullmann, C.V., 2017. Sinemurian-Pliensbachian calcareous nanofossil biostratigraphy and organic carbon isotope stratigraphy in the Paris Basin: calibration to the ammonite biozonation of NW Europe. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 468, 142–161.
- Phelps, R., 1985. A refined ammonite biostratigraphy for the Middle and Upper Carixian (Ibex and Davoei zones, Lower Jurassic) in North-West Europe and stratigraphical details of the Carixian-Domerian boundary. *Geobios* 18, 321–362.
- Pinheiro, L.M., Wilson, R.C.L., Pena dos Reis, R., Whitmarsh, R.B., Ribeiro, A., 1996. The western Iberia margin: A geophysical and geological overview. In: Whitmarsh, R.B., Sawyer, D.S., Klaus, A., Masson, D.G. (Eds.), *Proceedings of the Ocean Drilling Program*. vol. 149. Scientific Results, pp. 3–23.
- Pittet, B., Suan, G., Lenoir, F., Duarte, L.V., Mattioli, E., 2014. Carbon isotope evidence for sedimentary discontinuities in the lower Toarcian of the Lusitanian Basin (Portugal): Sea level change at the onset of the Oceanic Anoxic Event. *Sediment. Geol.* 303, 1–14.
- Plancq, J., Mattioli, E., Pittet, B., Baudin, F., Duarte, L.V., Boussaha, M., Grossi, V., 2016. A calcareous nanofossil and organic geochemical study of marine palaeoenvironmental changes across the Sinemurian/Pliensbachian (early Jurassic, ~191Ma) in Portugal. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 449, 1–12.
- Price, G.D., 1999. The evidence and implications of polar ice during the Mesozoic. *Earth Sci. Rev.* 48, 183–210.
- Reale, V., Baldanza, A., Monechi, S., Mattioli, E., 1992. Calcareous Nanofossil biostratigraphic events from the Early-Middle Jurassic sequences of the Umbria-Marche area (Central Italy). *Mem. Sc. Geol. Padova.* 43, 41–75.
- Reggiani, L., Mattioli, E., Pittet, B., Duarte, L.V., Veiga de Oliveira, L.C., Comas-Rengifo, M.J., 2010. Pliensbachian (Early Jurassic) calcareous nanofossils from the Peniche section (Lusitanian Basin, Portugal): a clue for palaeoenvironmental reconstructions. *Mar. Micropaleontol.* 75, 1–16.
- Rocha, R.B., Mattioli, E., Duarte, L.V., Pittet, B., Elmi, S., Mouterde, R., Cabral, M.C., Comas-Rengifo, M.J., Gómez, J.J., Goy, A., Hesselbo, S.P., Jenkyns, H.C., Littler, K., Mailliot, S., Oliveira, L.C.V., Osete, M.L., Perilli, N., Pinto, S., Ruget, C., Suan, G., 2016. Toarcian Stage of Lower Jurassic defined by the Global Boundary Stratotype Section and Point (GSSP) at the Peniche section (Portugal). *Episodes* 39, 460–481.
- Ruban, D.A., Tyszka, J., 2005. Diversity dynamics and mass extinctions of the Early-Middle Jurassic foraminifers: a record from the Northwestern Caucasus. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 222, 329–343.
- Sabatino, N., Neri, R., Bellanca, A., Jenkyns, H., Baudin, F., Parisi, G., Masetti, D., 2009. Carbon-isotope records of the Early Jurassic (Toarcian) oceanic anoxic event from the Valdorbia (Umbria-Marche Apennines) and Monte Mangart (Julian Alps) sections: paleoceanographic and stratigraphic implications. *Sedimentology* 56, 1307–1328.
- Sandoval, J., Bill, M., Aguado, R., O'Dogherty, L., Rivas, P., Morard, A., Guex, J., 2012. The Toarcian in the Subbetic basin (southern Spain): Bio-events (ammonite and calcareous nanofossils) and carbon-isotope stratigraphy. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 342–343, 40–63.
- Sandoval, J., 2008. Aalenian carbon isotope-stratigraphy: Calibration with ammonite, radiolarian and nanofossils events in the Western Tethys. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 267, 115–137.
- Silva, R.L., Duarte, L.V., 2015. Organic matter production and preservation in the Lusitanian Basin (Portugal) and Pliensbachian climatic hot snaps. *Glob. Planet. Chang.* 131, 24–34.
- Silva, R.L., Duarte, L.V., Comas-Rengifo, M.J., Mendonça Filho, J.G., Azerêdo, A.C., 2011. Update of the carbon and oxygen isotopic records of the Early-Late Pliensbachian (Early Jurassic, ~187 Ma): insights from the organic-rich hemipelagic series of the Lusitanian Basin (Portugal). *Chem. Geol.* 283, 177–184.
- Silva, R.L., Duarte, L.V., Comas-Rengifo, M.J., 2015a. Carbon isotope chemostratigraphy of Lower Jurassic carbonate deposits, Lusitanian Basin (Portugal): Implications and limitations to the application in sequence stratigraphic studies. In: Ramkumar, M. (Ed.), *Chemostratigraphy: Concepts, Techniques, and Applications*. Elsevier, pp. 341–371.
- Silva, S., Henriques, M.H., Canales, M.L., 2015b. High resolution ammonite-benthic foraminiferal biostratigraphy across the Aalenian-Bajocian boundary in the Lusitanian Basin (Portugal). *Geol. J.* 50, 477–496.
- Steinmetz, J.C., 1994. Sedimentation of coccolithophores. In: Winter, A., Siesser, W.G. (Eds.), *Coccolithophores*. Cambridge University Press, pp. 179–198.
- Stradner, H., 1961. Vorkommen von Nanofossilien im Mesozoikum und Alttertiär. *Erdoel-Zeitschrift* 77, 77–88.
- Stradner, H., 1963. New contributions to Mesozoic stratigraphy by means of nanofossils. In: *Proc. 6th World Petra. Congr.* pp. 167–184 Section 1, Paper 4 (preprint).
- Suan, G., Mattioli, E., Pittet, B., Mailliot, S., Lécuyer, C., 2008. Evidence for major environmental perturbation prior to and during the Toarcian (Early Jurassic) oceanic anoxic event from the Lusitanian Basin, Portugal. *Paleoceanography* 23, PA1202.
- Suan, G., Mattioli, E., Pittet, B., Lécuyer, C., Suchéras-Marx, B., Duarte, L.V., Philippe, M., Reggiani, L., Martineau, F., 2010. Secular environmental precursors to early Toarcian (Jurassic) extreme climate changes. *Earth Planet. Sci. Lett.* 290, 448–458.
- Suchéras-Marx, B., Mattioli, E., Pittet, B., Escarguel, G., Suan, G., 2010. Astronomically-paced coccolith size variations during the early Pliensbachian (Early Jurassic). *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 295, 281–292.
- Suchéras-marx, B., Guihou, A., Giraud, F., Lécuyer, C., Allemand, P., Pittet, B., Mattioli, E., 2012. Impact of the Middle Jurassic diversification of *Watznaueria* (coccolith-bearing algae) on the carbon cycle and  $\delta^{13}\text{C}$  of bulk marine carbonates. *Glob. Planet. Chang.* 86–87, 92–100.
- Suchéras-Marx, B., Mattioli, E., Giraud, F., Escarguel, G., 2015. Palaeoenvironmental and paleobiological origins of coccolithophorid genus *Watznaueria* emergence during the late Aalenian-early Bajocian. *Paleobiology* 41, 415–435.
- Tiraboschi, D., Erba, E., 2010. Calcareous nanofossil biostratigraphy (Upper Bajocian–Lower Bathonian) of the Ravin du Bès section (Bas Auran, Subalpine Basin, SE France): Evolutionary trends of *Watznaueria barnesiae* and new findings of “*Rucinolithus*” morphotypes. *Geobios* 43, 59–76.
- van de Schootbrugge, B., Bailey, T.R., Rosenthal, Y., Katz, M.E., Wright, J.D., Miller, K.G., Feist Burkhart, S., Falkowski, P.G., 2005. Early Jurassic climate change and the radiation of organic walled phytoplankton in the Tethys Ocean. *Paleobiology* 31, 73–97.
- van de Schootbrugge, B., Richo, S., Pross, J., Luppold, F.W., Hunze, S., Wonik, T., Blau, J., Meister, C., van der Weijst, C.M.H., Suan, G., Fraguas, A., Fiebig, J., Herrle, J.O., Guex, J., Little, C.T.S., Wignall, P.B., Püttmann, W., Oschmann, W., 2018. The Schandelah Scientific Drilling Project: a 25-million year record of Early Jurassic palaeoenvironmental change from northern Germany. *Newsl. Stratigr.* <https://doi.org/10.1127/nos/2018/0259>.
- Wang, F., Zhou, X.-H., Zhang, L.-C., Ying, J.-F., Zhang, Y.-T., Wu, F.-Y., Zhu, R.-X., 2006. Late Mesozoic volcanism in the Great Xing'an Range (NE China): timing and implications for the dynamic setting of NE Asia. *Earth Planet. Sci. Lett.* 251, 179–198.
- Wiggan, N.J., Riding, J.B., Fensome, R.A., Mattioli, E., 2018. The Bajocian (Middle Jurassic): a key interval in the early Mesozoic phytoplankton radiation. *Earth Sci. Rev.* 180, 126–146.
- Wignall, P.B., Newton, R.J., Little, C.T.S., 2005. The timing of palaeoenvironmental change and cause-and-effect relationships during the early Jurassic mass extinction in Europe. *Am. J. Sci.* 305 (10), 1014–1032.
- Zák, K., Kost'ák, M., Man, O., Zakharov, V.A., Rogov, M.A., Pruner, P., Rohovec, J., Dzuyba, O.S., Mazuch, M., 2011. Comparison of carbonate C and O stable isotope records across the Jurassic/Cretaceous boundary in the Tethyan and Boreal Realms. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 299, 83–96.







## **Annexe C – Article**

*Absence of temperature effect on elution profiles on anionic and cationic ion-exchange resins from 4°C to 28°C*

**PROTOCOL**

# Absence of temperature effect on elution profiles on anionic and cationic ion-exchange resins from 4°C to 28°C

Aline Lamboux<sup>1</sup> | Auguste Hassler<sup>1</sup> | Priyanka Davechand<sup>2</sup> | Vincent Balter<sup>1</sup> <sup>1</sup>Univ Lyon, ENSL, Univ Lyon 1, CNRS UMR 5276, LGL-TPE, F-69007 Lyon, France<sup>2</sup>School of Geoscience, University of the Witwatersrand, 1 Jan Smuts Avenue, Johannesburg, 2000, South Africa**Correspondence**V. Balter, Univ Lyon, ENSL, Univ Lyon 1, CNRS UMR 5276, LGL-TPE, F-69007 Lyon, France  
Email: vincent.balter@ens-lyon.fr

**Rationale:** In labs devoted to the geochemistry of non-traditional isotopes, chemical elution is necessary to purify the element of interest. Elution is always performed in over-pressured and air-conditioned clean rooms. We took advantage of an air-conditioning failure in our lab during summer 2018 to study the effect of temperature on the characteristics of the elution profiles of ion-exchange resins.

**Methods:** We performed the ion-exchange separation of copper, iron and zinc on macroporous anionic AG MP-1 resin and that of calcium on cationic AG 50W-X12 resin, at 28°C, prior to the measurement of their isotopic ratios by mass spectrometry. We further performed these experiments in a clean hood in a cold room at 4°C. The elution curves were processed on biological standards, i.e. bovine liver (SRM-1577c), fetal bovine serum (FBS), bone meal (SRM-1486) and the seawater IAPSO standard.

**Results:** The elution profiles of major elements for each matrix, and those of copper, iron, zinc and calcium, were compared with those classically achieved at 20°C in air-conditioned conditions. The results show that the elution profiles preserve their characteristics whatever the temperature, suggesting that partitioning coefficients between resin and solution are thermo-independent in the range of temperature from 4°C to 28°C.

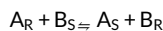
**Conclusions:** If generalized to other matrices, notably inorganic, and to other elements, notably the extreme case of the separation of Rare Earth Elements, the present results suggest that clean labs may not have to be air-conditioned. This would reduce installation and operating costs and have a positive effect on the environment, paving the way for the development of a “green geochemistry”.

## 1 | INTRODUCTION

The measurement of metal stable isotope ratios is of wide interest in many fields, from cosmochemistry (e.g.,<sup>1–3</sup>), endogenous geochemistry (e.g.,<sup>4–6</sup>), environmental geochemistry,<sup>7–9</sup> paleoenvironments,<sup>10–12</sup> to plant biology<sup>13–15</sup> and animal biology.<sup>16–18</sup> Recent advances have even been achieved in the field of medicine.<sup>19–21</sup> Whatever the application, a preliminary step consisting of the separation of the element of interest from the matrix is necessary prior to the mass spectrometric analyses of metal isotope ratios. This step is classically achieved by means of ion-exchange chromatography. The principle is

based on electrostatic interactions between a stationary phase displaying ionic functional groups with a mobile phase containing analyte ions with the opposite charge. The stationary phase can thus be anionic or cationic. Resins containing anionic or cationic functional groups were developed in the frame of the Manhattan project for the separation and purification of strategic metals to study their nuclear properties. Series of articles describing the protocol for eluting metals were first published in the 1950s by Spedding et al for cationic resins<sup>22</sup> and Kraus and Moore for anionic resins.<sup>23</sup> These protocols have evolved since then with the commercialization of new resins, and today methods even exist for the fully automated separation of

metals (e.g.,<sup>24,25</sup>). Whatever the type of the resin (anionic or cationic) and given the reversible exchange reaction between two ions A and B between a resin R and the solution S, the equilibrium is:



and applying the mass action law gives:

$$K_{A/B}^{\ominus} = \frac{|A|_S \times |B|_R}{|A|_R \times |B|_S}$$

where  $K_{A/B}^{\ominus}$  is the equilibrium constant and  $|A|$  and  $|B|$  the activity of A and B in the resin and the solution. As for all equilibrium constants,  $K_{A/B}^{\ominus}$  is related to the standard change of the Gibbs free energy of the reaction ( $\Delta G^{\ominus}$ ) in kJ:

$$\Delta G^{\ominus} = -RT \ln K_{A/B}^{\ominus}$$

where  $R$  is the universal gas constant and  $T$  the absolute temperature in °K. The value of  $K_{A/B}^{\ominus}$  varies as a function of temperature. Conventionally, ion-exchange chromatography is carried out in air-conditioned clean rooms kept at a constant temperature, usually set between 17°C and 20°C.

In a cleanroom, the temperature is regulated with an air-conditioning unit, which is often part of a heating, ventilating and air-conditioning (HVAC) system. HVAC thus provides both over-pressured and temperature-conditioned air in a single unit, but these can be regulated by two independent units. Cleanrooms are isolated from outdoor contaminations by venting filtered air that eventually goes through an additional hood air filter to protect the workplace.

In July 2018, we experienced a HVAC breakdown at the cleanroom of the Laboratoire de Géologie de Lyon that lasted several weeks during a period of heat-wave. The temperature rapidly rose in the cleanroom and stabilized around 28°C. Most users then stopped working, but we took advantage of the situation to test the influence of the temperature on the  $K^{\ominus}$  values between metals and cationic and anionic resins. We executed the classical elution protocols and looked for changes in the elution profiles relative to those calibrated at 20°C. We then repeated the procedure at 4°C in a cold room. We performed the elution protocols at 28°C and 4°C for the separation of Cu, Fe, and Zn on AG MP-1 macroporous anionic resin following Maréchal et al.<sup>26</sup> and for the separation of Ca on AG 50W-X12 cationic resin following Tacail et al.<sup>27</sup> We constructed the elution curves for standards that are routinely used in the lab and for which we have fairly good experience at 20°C, i.e. the SRM-1577c “bovine liver” international reference material and fetal bovine liver (FBS) for the separation of Cu, Fe and Zn, and the SRM-1486 “bone meal” and IAPSO seawater international reference materials for the separation of Mg and Ca. In all cases, we also monitored the elution profiles of the associated major elements.

## 2 | EXPERIMENTAL

### 2.1 | Reagents and digestion

Ultrapure water (resistivity 18.2 MΩ cm) was produced using a Millipore Synergy system (Merck, Darmstadt, Germany). Concentrated technical grade HCl and HNO<sub>3</sub> (Carlo Erba Reagents, Milan, Italy) were distilled at low temperature in PFA equipment (Savillex, Eden Prairie, MN, USA). Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30%) Suprapur was purchased from Merck. Macroporous anion-exchange resin AG MP-1 (100–200 mesh) and cation-exchange resin AG 50W-X12 (200–400 mesh) were purchased from BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). About 160 mg of FBS (lot number O14 M3399; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 50 mg of SRM-1577c from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA), 200 µg of SRM-1486 (NIST) and 50 µL of reference seawater provided by The International Association for the Physical Sciences of the Oceans (IAPSO) were digested using 3 mL concentrated distilled HNO<sub>3</sub> for 24 h. The vials were heated at 110°C for 3 days, then allowed to cool to room temperature. About 0.5 mL of Suprapur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) was then added to the cooled down samples. After 2 h at room temperature, the vials were heated at 110°C on a hotplate for 2 days. The solutions were then evaporated to dryness and dissolved in 6 M HCl, evaporated again and taken up for chemical separation.

### 2.2 | Elutions on anionic resin

The FBS and SRM-1577c standards were redissolved in 3.2 mL and 4 mL of 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001%, respectively. Chemical separation was then implemented according to the method of Maréchal et al.<sup>26</sup>: 1 mL of sample was loaded on a quartz column containing 1.6 mL of AG MP-1 resin previously rinsed with 0.5 N HNO<sub>3</sub> and conditioned with 7 mL 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001%. The matrix was eluted with 10 mL 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001%. Copper was eluted with 20 mL 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001%; Fe was eluted with 10 mL 2 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001%; and, finally, Zn was eluted with 10 mL 0.5 M HNO<sub>3</sub>. The eluted fraction was collected in a 2-mL aliquot, evaporated and taken up in 0.5 M HNO<sub>3</sub>. The elution of S, Mg, Na, K, P and Ca was monitored in addition to that of Cu, Fe and Zn.

### 2.3 | Elutions on cationic resin

The SRM-1486 and the IAPSO standards were redissolved in 200 µL 0.4 M HCl. Chemical separation was then implemented according to the method of Tacail et al.<sup>27</sup>: 10 µL and 50 µL of sample for SRM-1486 and IAPSO were loaded, respectively, on a column containing 210 µL of AG 50W-X12 resin previously rinsed with 6 mL 6 M HCl and conditioned with 3 mL 0.4 M HCl. The matrix was eluted with 13 mL 0.4 M HCl. Mg was then eluted with 3.5 mL 1 M HCl and

finally Ca and Sr were eluted with 2 mL 6 M HCl. The eluted fraction was collected in a 1-mL aliquot, evaporated and taken up in 0.5 M HNO<sub>3</sub>. The elution of Mg, S, Na, P and Sr was monitored in addition to that of Ca.

## 2.4 | Instrumentation and measurement protocols

Single-element standard solutions from SCP Science (Québec, Canada) were used for the quantification of Ca, S, Mg, Na, K, P, Fe, Cu, Zn and Sr. Scandium and In solutions from SCP Science were used for the internal standard calibration to correct for oxide interferences and instrumental drift. All measurements were performed at the Laboratoire de Géologie de Lyon. The concentrations of Cu, Fe and Zn were measured using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (7500CX; Agilent, Santa Clara, CA, USA). The concentrations of Ca, S, Mg, Na, K, P and Sr were measured using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) (iCAP 7000 Series instrument; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The concentrations were calculated using calibration curves based on multi-elemental solutions. The multi-elemental solutions were also used to monitor and correct the instrumental drift over the analytical session. The validity and reproducibility of major and trace element concentrations are estimated to be better than 10% ( $\pm 2$  sd) based on repeated measurements of the international reference materials as unknown samples.

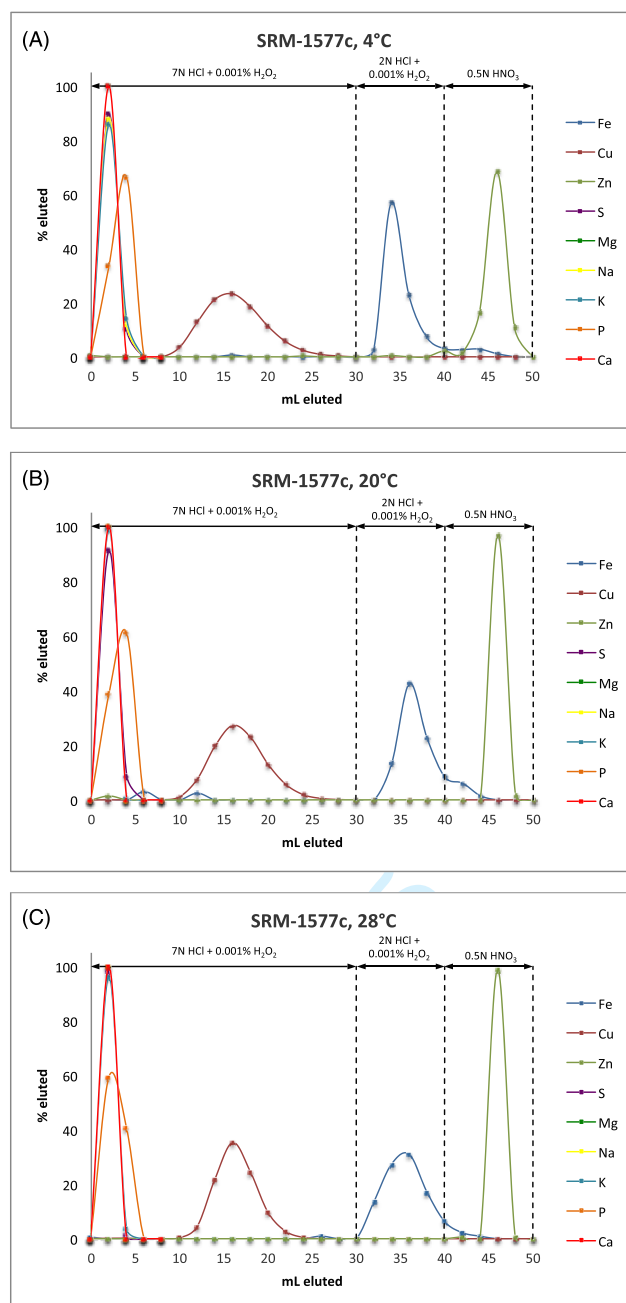
## 3 | RESULTS

### 3.1 | Elutions on anionic resin

The concentrations of Na, K, S, Ca, Mg and P, which are major elements in the matrices of the bovine liver SRM-1577c and the fetal bovine liver FBS standards, were determined along with the Fe, Cu and Zn concentrations. Elution curves for these two standards at 4°C, 20°C and 28°C are presented in Figures 1A–1C for SRM 1577c and in Figures 2A–2C for FBS. The first 10 mL of 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% are used to discard elements present in the matrix: Na, K, S, Ca, Mg and P are totally discarded in this fraction, while Cu, Fe and Zn are still retained on the resin.

For SRM-1577c, 96.5%, 98.8%, and 99.3% of Cu are eluted with the next 20 mL of 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% at 4°C, 20°C and 28°C, respectively. Fe is further eluted at 92.7%, 86.9% and 95.5% with the next 10 mL of 2 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% at 4°C, 20°C and 28°C, respectively. Finally, 96.6%, 98.6% and 99.4% of Zn are eluted with 10 mL 0.5 M HNO<sub>3</sub> at 4°C, 20°C and 28°C, respectively.

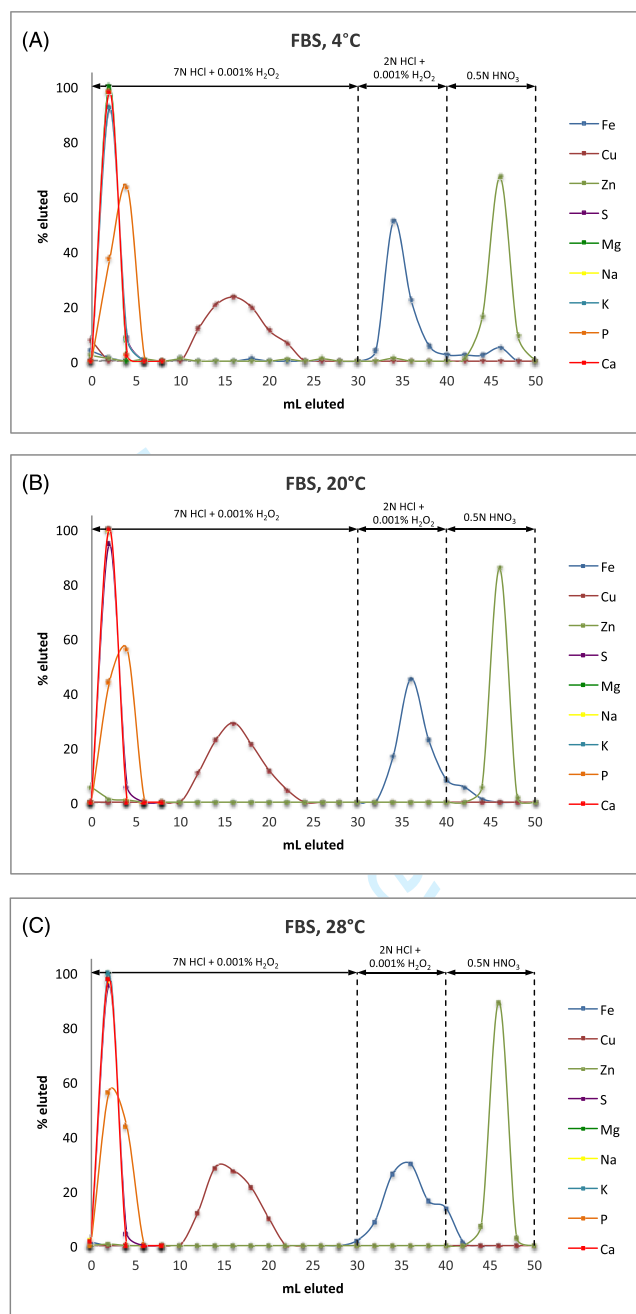
For FBS, 92.6%, 100% and 100% of Cu are eluted with the next 20 mL of 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% at 4°C, 20°C and 28°C, respectively. Fe is further eluted at 84.6%, 93.1% and 83.6% with the next 10 mL of 2 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% at 4°C, 20°C and



**FIGURE 1** Elution of matrix elements P, K, Na, Mg, S, Ca and Cu, Fe and Zn from the SRM-1577c bovine liver standard on the macroporous anionic AG MP-1 resin at A, 4°C; B, 20°C; and C, 28°C. Uncertainty on concentration measurement is  $\sim \pm 5\%$  [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

28°C, respectively. Finally, 93.1%, 92.4% and 99.5% of Zn are eluted with 10 mL 0.5 M HNO<sub>3</sub> at 4°C, 20°C and 28°C, respectively.

It is noteworthy that some proportion of Fe is eluted along with the Zn fraction: representing 6.7%, 7.7% and 3.1% of Fe for SRM-1577c at 4°C, 20°C and 28°C, respectively, and 9.2%, 6.9% and 15.2% for FBS at 4°C, 20°C and 28°C, respectively.



**FIGURE 2** Elution of matrix elements P, K, Na, Mg, S, Ca and Cu, Fe and Zn from the FBS standard on the macroporous anionic AG MP-1 resin at A, 4°C; B, 20°C; and C, 28°C. Uncertainty on concentration measurement is  $\sim \pm 5\%$  [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

### 3.2 | Elutions on cationic resin

The concentrations of P, Mg and Na, which are major elements in the matrix of the bone meal SRM-1486 standard, were determined along with Ca concentrations. Elution curves for the SRM-1486 standard at 4°C, 20°C and 28°C are presented in Figures 3A–3C. The concentrations of Na, S and Mg, which are major elements in the

matrix of the seawater IAPSO standard, were determined along with Ca and Sr concentrations. Elution curves for the IAPSO standard at 4°C, 20°C and 28°C are presented in Figures 4A–4C.

The first 13 mL of 0.4 M HCl are used to discard elements present in the matrix. The results show that Na, P and S are totally discarded. For both standards, Mg is completely eluted with 3.5 mL 1 M HCl at 4°C, 20°C and 28°C. For SRM-1486, Ca is completely eluted with 2.5 mL 6 M HCl at 4°C, 20°C and 28°C. For IAPSO, Ca and Sr are both completely eluted with 2.5 mL 6 M HCl at 4°C, 20°C and 28°C.

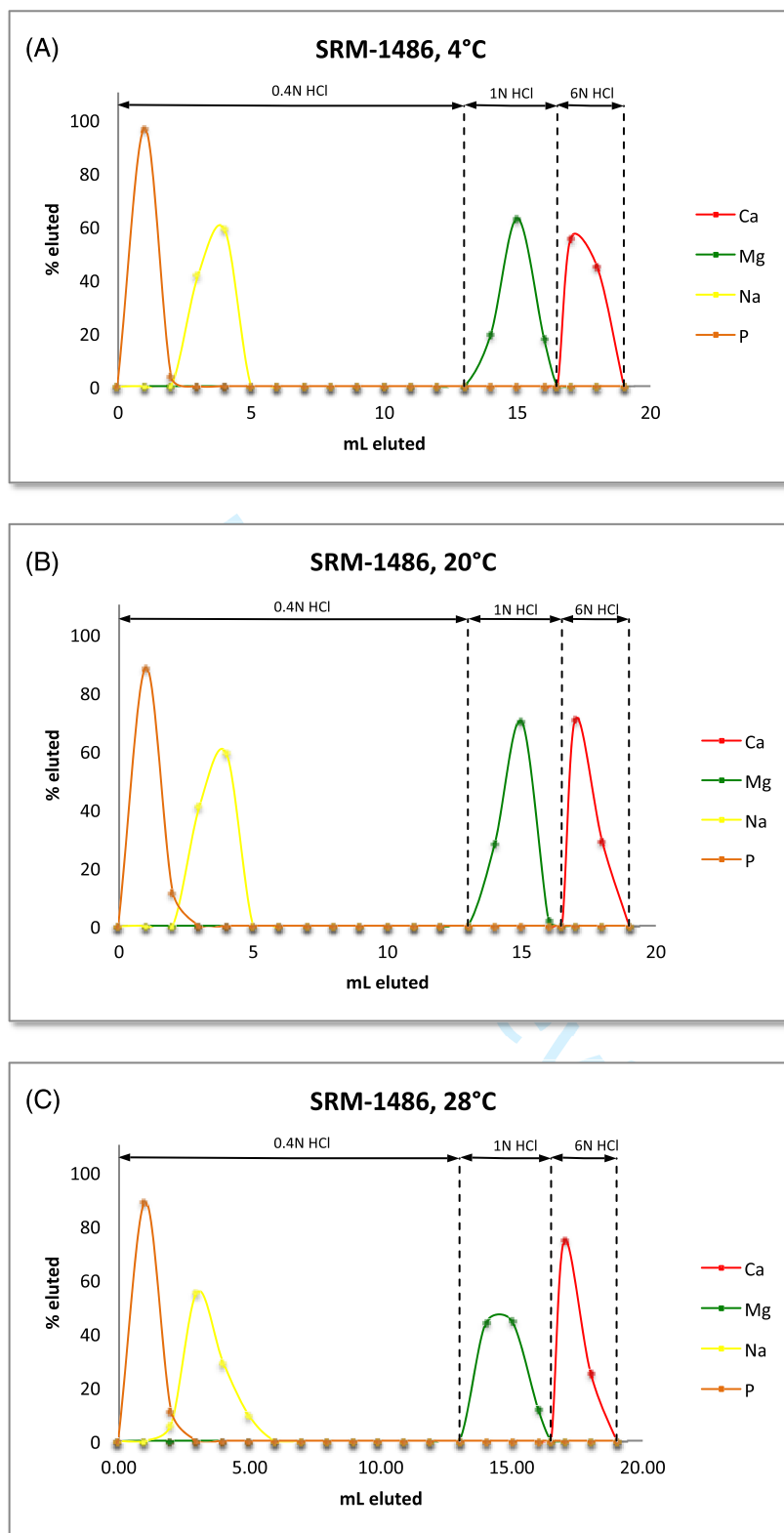
## 4 | DISCUSSION

The present results suggest some minor modifications to the protocol of Maréchal et al.<sup>26</sup> The elements of interest are mostly eluted as described by these authors for all temperatures. However, if all the matrix elements are always completely eluted with the first 6 mL 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001%, Cu begins to be eluted at the eighth mL of 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001%. To overcome any possible Cu loss, we suggest collecting the Cu fraction with 22 mL 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% after discarding the first 8 mL of 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% containing the matrix. Regarding Fe, a significant proportion is always retained on the resin and is eluted along with Zn in 0.5 M HNO<sub>3</sub>. To obtain a better Fe extraction yield, the initial 10 mL volume of 2 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% should be extended to 15 mL.

Overall, the results show that the elution profiles for major and trace elements in various matrices, either on cationic or anionic resins, remain identical whatever the temperature between 4°C and 28°C. This suggests that the thermo-dependence of the partitioning coefficients  $K^{\ominus}$  for most the elements and cationic and anionic resins is not high enough in this range of temperature to be measured.

For a given element, the  $K^{\ominus}$  values are generally higher in anionic than in cationic resins. A comparison of  $K^{\ominus}$  values for cationic and anionic resins is given as an example in Table 1. Over a suite of elements including Cu, Zn, Cd, Fe, Ga, In, Th and U, only Th exhibits  $K^{\ominus}$  values higher in the AG MP-50 cationic resin than in the AG MP-1 and AG 1-X8 anionic resins. Some  $K^{\ominus}$  values for anionic resins are so high that this kind of resin is sometimes said to be a “stick non-stick” resin. In these conditions, it is tempting to posit that anionic resins do not exhibit any apparent sensitivity to temperature, but the results of the study of Kraus and Raridon show that this is not the case.<sup>30</sup> Using the pre-loaded column technique, i.e. the resin is equilibrated with the ion whose adsorption is to be studied prior to being uniformly loaded in the column, these authors showed that the  $K^{\ominus}$  values for Zn and Ga decreased with temperature increasing from 25°C to 150°C. These authors also published results for cationic resins showing that  $K^{\ominus}$  values increase (Be, La, Co, Zn, Eu<sup>3+</sup>) or decrease (Na, K, Ba, Rb, Cs) with increasing temperature from 2°C to 145°C.<sup>31</sup> The thermo-dependence of the  $K^{\ominus}$  values was therefore established, but no generalized thermodynamic laws have been proposed between the various ion-exchange reactions. Some elements, such as Ba, even exhibit a curved thermo-dependence relationship.<sup>31</sup> The absence of a

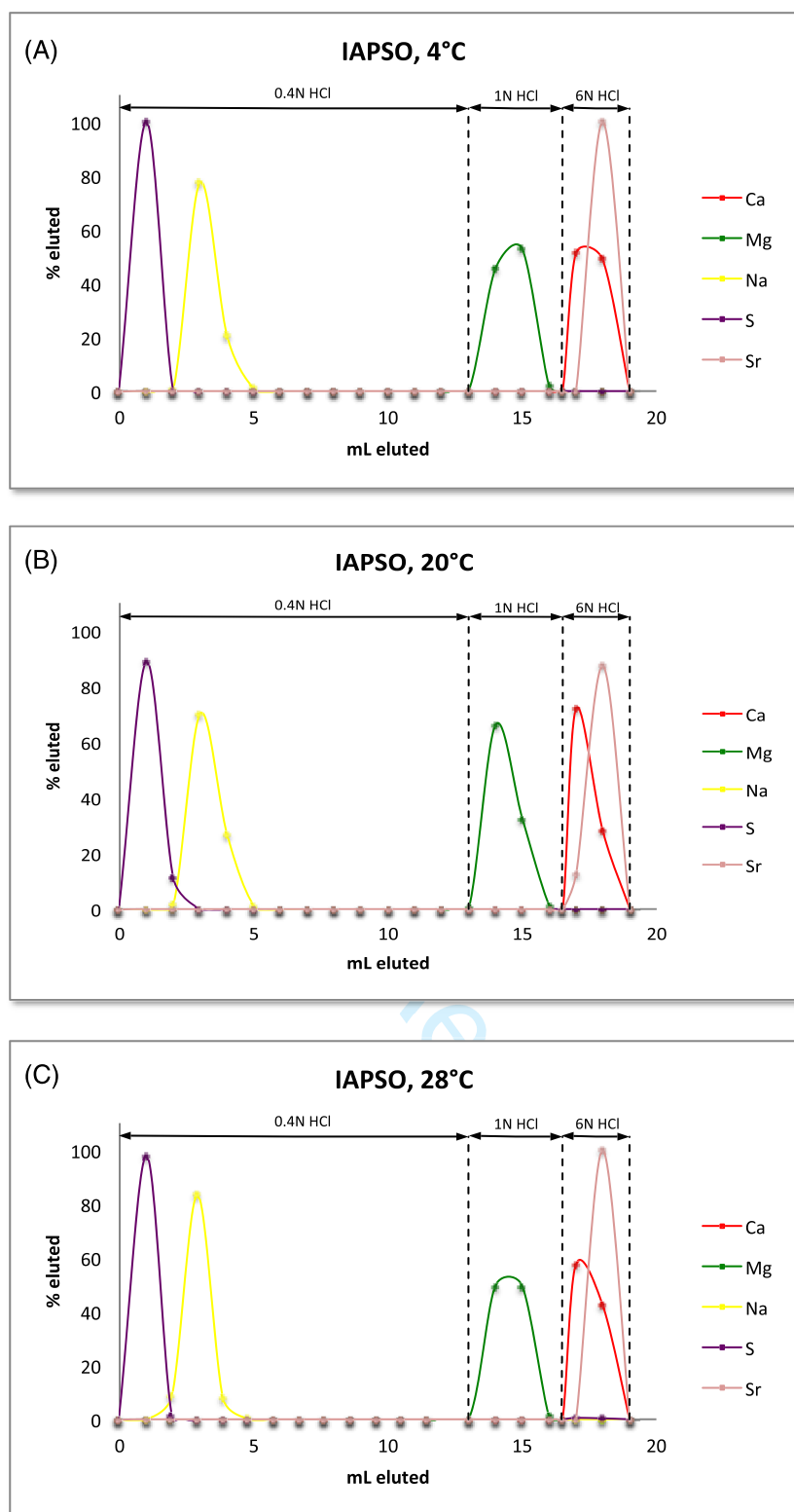
**FIGURE 3** Elution of matrix elements P, Na and Mg and Ca from the SRM-1486 bone meal standard on the cationic AG 50W-X12 resin at A, 4°C; B, 20°C; and C, 28°C. Uncertainty on concentration measurement is  $\sim \pm 5\%$  [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



clear correlation between temperature and ion-exchange equilibria on cationic resins using the pre-loaded column technique is reinforced by results obtained using batch experiments.<sup>32–34</sup>

Theoretically, the varying temperature should have an effect not only on the value of the equilibrium constant, but also on the kinetic rate constant, i.e. with higher temperature, to a certain limit,

increasing kinetics and therefore the separation factor. Note that the kinetics is also affected by the degree of crosslinking of the resin, with higher crosslinking decreasing kinetics. There have been fewer studies aimed at manipulating temperatures to improve separation factors on cationic resins than those dedicated to evaluating the thermo-dependence of ion-exchange equilibria. The separation of Rare Earth



**FIGURE 4** Elution of matrix elements P, Na and Mg and Ca from the IAPSO seawater standard on the cationic AG 50W-X12 resin at A, 4°C; B, 20°C; and C, 28°C. Uncertainty on concentration measurement is  $\sim \pm 5\%$  [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

Elements (REEs) has long been a focus of ion chromatography development, and the effects of temperature on the REE separation factors have been tested on several occasions. Glass<sup>35</sup> tested the influence of eluting Eu, Cm, Am and Pm on AG 50W-X12 at 87°C instead at room temperature, and found that the elution peaks appeared more rapidly and were less separated, suggesting that

temperature improves kinetics and has a negative effect on the separation factor. Conversely, Strelow and Gricius<sup>36</sup> found a strong positive effect on the separation factor between La and Th on AG 50W-X8 at 50°C compared with room temperature, implying that the temperature effect on the separation factor is element-dependent.



**TABLE 1** Comparison of  $K^{\ominus}$  values for some elements on cationic and anionic resins in various HCl molarity

	Cationic resin AG MP-50 <sup>a</sup>			Anionic resin AG MP-1 <sup>b</sup>			Anionic resin AG 1-X8 <sup>b</sup>		
	1 M	3 M	5 M	1 M	3 M	5 M	1 M	3 M	5 M
Cu(II)	27.7	1.9	<1		13.2	27.2		4	13.1
Zn	19.7	1.8	<1	412	830	416	554		276
Cd	2.1	<1	<1	986	989	473	626		269
Fe(III)	87	2.2	0.7		19.6	158	35.6		340
Ga	110	5	1.9		18.6	1020	24.3		1780
In	1.4	<1	<1		17.4	29.2	20.1		19.4
Th	104	1810	285		4.1	4.5	1.7		1
U(VI)	68	12.1	5.2		33.2	234	21.1		111

<sup>a</sup>Values from Strelow.<sup>28</sup><sup>b</sup>Values from van der Walt et al.<sup>29</sup>

Here, we found no effect of the temperature on the elution profiles of ten elements for four different types of matrices (i.e. serum, bone, liver and seawater). Our results are therefore divergent from the conclusions reached from the above literature references. Some allowances must be made that could reconcile these two apparently contradictory outcomes. First, our results are representative of a very narrow range of temperature, i.e. from 4°C to up 28°C, while those mentioned above can reach 200°C, with the first temperature point above room temperature, usually at 45–50°C. Second, our results were obtained on real samples while those mentioned above were obtained using synthetic solutions. In the former case, competition of the elements for adsorption on the functional groups is certainly important, and possibly attenuates any potential temperature effects.

The installation and the maintenance of HVAC in a clean lab represent a significant cost, but the impact on the environment also has to be considered. Nowadays the clean lab impact on the environment is a critical issue that must be taken into account, and reducing this impact is the goal of green chemistry. Originally, the principles of green chemistry were established through twelve rules by Anastas.<sup>37</sup> More recently, Gałuszka et al.<sup>38</sup> extended the use of twelve hallmarks to green analytical chemistry. In all cases, the methodological developments of green chemistry involve not only reducing the samples, reagents and waste volumes production, but also minimizing the use of energy consumption, while keeping analytical performances unchanged. This represents the sixth of the twelfth principles of green chemistry proposed by Anastas "Design for Energy Efficiency. Energy requirements of chemical processes should be recognized for their environmental and economic impacts and should be minimized. If possible, synthetic methods should be conducted at ambient temperature and pressure".<sup>37</sup> Because our study shows that elution curves for 12 major and trace elements are not affected by temperature in a range compatible with natural seasonal variations, this suggests that air conditioning might not be necessary in clean labs used to perform ion-exchange chromatographic experiments. It does mean that air-conditioning is

not important for comfortable working conditions. The present results should be challenged by further studies on other matrices and elements.

## 5 | CONCLUSIONS

For the ten monitored elements (S, Mg, Na, K, P, Ca, Cu, Fe, Zn and Sr), our results show no sizeable change in the elution pattern on both cationic and anionic resins as a function of the temperature. This suggests that partitioning coefficients between resin and solution are thermo-independent in the range of temperature from 4°C to 28°C, typical of seasonal variations. To complete the present study elution profiles of other elements and on other matrices should be performed, but the present results already suggest that clean labs may not need to be air-conditioned which represents, to our knowledge, the first proposition for the development of green geochemistry.

## ORCID

Vincent Balter  <https://orcid.org/0000-0002-9236-4834>

## REFERENCES

- Moynier F, Blichert-Toft J, Telouk P, Luck J-M, Albarède F. Comparative stable isotope geochemistry of Ni, Cu, Zn, and Fe in chondrites and iron meteorites. *Geochim Cosmochim Acta*. 2007;71(17):4365-4379.
- Tian Z, Chen H, Fegley B Jr, et al. Potassium isotopic compositions of howardite-eucrite-diogenite meteorites. *Geochim Cosmochim Acta*. 2019; 266, 611-632.
- Teng F-Z, Li W-Y, Ke S, et al. Magnesium isotopic composition of the earth and chondrites. *Geochim Cosmochim Acta*. 2010;77:4150-4166.
- Larson PB, Maher K, Ramos FC, Chang Z, Gaspar M, Meinert LD. Copper isotope ratios in magmatic and hydrothermal ore-forming environments. *Chem Geol*. 2003;201:337-350.
- Teng F-Z, Wadhwa M, Helz RT. Investigation of magnesium isotope fractionation during basalt differentiation: Implications for a chondritic composition of the terrestrial mantle. *Earth Planet Sci Lett*. 2007;261:84-92.

6. Chen H, Savage PS, Teng F-Z, Helz RT, Moynier F. Zinc isotope fractionation during magmatic differentiation and the isotopic composition of the bulk Earth. *Earth Planet Sci Lett.* 2013;369–370:34–42.
7. Cloquet C, Carignan J, Libourel G, Sterckeman T, Perdrix E. Tracing source pollution in soils using cadmium and lead isotopes. *Environ Sci Technol.* 2006;40(8):2525–2530.
8. Feng X, Foucher D, Hintelmann H, Yan H, He T, Qiu G. Tracing mercury contamination sources in sediments using mercury isotope compositions. *Environ Sci Technol.* 2010;44(9):3363–3368.
9. Aucour A-M, Bedell J-P, Queyron M, Tholé R, Lamboux A, Sarret G. Zn speciation and stable isotope fractionation in a contaminated urban wetland soil–*Typha latifolia* system. *Environ Sci Technol.* 2017;51(15):8350–8358.
10. Xu L, Lehmann B, Mao J, et al. Mo isotope and trace element patterns of lower Cambrian black shales in South China: Multi-proxy constraints on the paleoenvironment. *Chem Geol.* 2012;318:45–59.
11. Saenger C, Wang Z. Magnesium isotope fractionation in biogenic and abiogenic carbonates: Implications for paleoenvironmental proxies. *Quat Sci Rev.* 2014;90:1–21.
12. Brazier J-M, Suan G, Tacaïl T, et al. Calcium isotope evidence for dramatic increase of continental weathering during the Toarcian oceanic anoxic event (early Jurassic). *Earth Planet Sci Lett.* 2015;411:164–176.
13. Moynier F, Pichat S, Pons M-L, Fike D, Balter V, Albarède F. Isotopic fractionation and transport mechanisms of Zn in plants. *Chem Geol.* 2009;267:125–130.
14. Bolou-Bi EB, Poszwa A, Leyval C, Vigier N. Experimental determination of magnesium isotope fractionation during higher plant growth. *Geochim Cosmochim Acta.* 2010;74:2523–2537.
15. Schmitt A-D, Cobert F, Bourgeade P, et al. Calcium isotope fractionation during plant growth under a limited nutrient supply. *Geochim Cosmochim Acta.* 2013;110:70–83.
16. Martin JE, Vance D, Balter V. Magnesium stable isotope ecology using mammal tooth enamel. *Proc Natl Acad Sci.* 2015; 112(2), 430–435.
17. Martin JE, Tacaïl T, Cerling TE, Balter V. Calcium isotopes in enamel of modern and Plio-Pleistocene east African mammals. *Earth Planet Sci Lett.* 2018;503:227–235.
18. Sauzéat L, Laurençon A, Balter V. Metallome evolution in ageing *C. elegans* and a copper stable isotope perspective. *Metallomics.* 2018; 10(3):496–503.
19. Bondanese VP, Lamboux A, Simon M, et al. Hypoxia induces copper stable isotope fractionation in hepatocellular carcinoma, in a HIF-independent manner. *Metallomics.* 2018;8:1177–1184.
20. Albarède F, Télouk P, Balter V. Medical applications of isotope metallomics. Measurements, theories and applications of non-traditional stable isotopes. *Rev Mineral Geochem.* 2017;82:851–885.
21. Sauzéat L, Bernard E, Perret-Liaudet A, et al. Isotopic evidence for disrupted copper metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *iScience.* 2018;6:264–271.
22. Spedding FH, Voigt AF, Gladrow EM, Sleight NR. The separation of rare earths by ion exchange. I. Cerium and yttrium. *J Am Chem Soc.* 1947;69(11):2777–2781.
23. Kraus KA, Moore GE. Anion exchange studies. I. Separation of zirconium and niobium in HCl-HF mixtures. *J Am Chem Soc.* 1951;73:9–13.
24. Ireland TJ, Tissot FLH, Yokochi R, Dauphas N. Teflon-HPLC: A novel chromatographic system for application to isotope geochemistry and other industries. *Chem Geol.* 2013;357:203–214.
25. Romaniello SJ, Field MP, Smith HB, Gordon GW, Kim MH, Anbar AD. Fully automated chromatographic purification of Sr and Ca for isotopic analysis. *J Anal At Spectrom.* 2015;30:1906–1912.
26. Maréchal CN, Télouk P, Albarède F. Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chem Geol.* 1999;156:251–273.
27. Tacaïl T, Albalat E, Télouk P, Balter V. A simplified protocol for measurement of Ca isotopes in biological samples. *J Anal At Spectrom.* 2014;29:529–535.
28. Strelow FEW. Distribution coefficients and ion exchange behavior of 46 elements with a macroreticular cation exchange resin in hydrochloric acid. *Anal Chem.* 1984;56:1053–1056.
29. van der Walt TN, Strelow FWE, Verheij R. The influence of crosslinkage on the distribution coefficients and anion exchange behaviour of some elements in hydrochloric acid. *Solvent Extr Ion Exc.* 1985;3:732–740.
30. Kraus KA, Raridon RJ. Anion exchange studies. XXXI. Adsorption of Zn(II) and Ga(III) from HCl solutions in the temperature range 25 to 150°C. *J Am Chem Soc.* 1960;82:3271–3276.
31. Kraus KA, Raridon RJ. Temperature dependence of some cation exchange equilibria in the range 0 to 200°. *J Phys Chem.* 1959;63:1901–1907.
32. Bonner OD, Smith LL. The effect of temperature on ion-exchange equilibria. I. the sodium–hydrogen and cupric–hydrogen exchanges. *J Phys Chem.* 1957;61:1614–1617.
33. Bonner OD, Pruett RR. The effect of temperature on ion exchange equilibria. II. The ammonium–hydrogen and thallos–hydrogen exchanges. *J Phys Chem.* 1959;63:1417–1420.
34. Bonner OD, Pruett RR. The effect of temperature on ion exchange equilibria. III. Exchanges involving some divalent ions. *J Phys Chem.* 1959;63:1420–1423.
35. Glass RA. Chelating agents applied to ion-exchange separations of americium and curium. *J Am Chem Soc.* 1955;77:807–809.
36. Strelow FWE, Gricius AJ. Separation of thorium from lanthanum and other elements by cation-exchange chromatography at elevated temperatures. *Anal Chem.* 1972;44(11):1898–1900.
37. Anastas PT. Green chemistry and the role of analytical methodology development. *Crit Rev Anal Chem.* 1999;29:167–175.
38. Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends Anal Chem.* 2013;50:78–84.

**How to cite this article:** Lamboux A, Hassler A, Davechand P, Balter V. Absence of temperature effect on elution profiles on anionic and cationic ion-exchange resins from 4°C to 28°C. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2020;34:e8806. <https://doi.org/10.1002/rcm.8806>





**Résumé :** La capacité à produire du lait (la lactation) est un trait partagé par toutes les espèces de mammifères actuelles. Cette capacité est capitale pour le développement des juvéniles et constitue un facteur déterminant de l'écologie et des stratégies de reproduction des espèces mammaliennes. Toutefois, sur la base des méthodes conventionnelles et des indices fossiles disponibles, il est difficile d'ancrer évolutivement et temporellement l'origine précise de la lactation et de ses fonctions biologiques. Dans la présente thèse, j'ai exploré les possibilités offertes par l'étude des isotopes du calcium (Ca) contenus dans la structure minérale des os et des dents. Plusieurs études publiées en amont de cette thèse suggèrent que la composition en isotopes stables du Ca des tissus minéralisés ( $^{44}\text{Ca}$  et  $^{42}\text{Ca}$  notamment) est susceptible d'être modifiée par la consommation et la production de lait. Par ailleurs, d'autres publications suggèrent que la composition isotopique du Ca de l'émail dentaire est capable de se préserver dans l'émail fossilisé et de fournir des informations sur l'écologie et la physiologie d'espèces disparues. Toutefois, les effets de la consommation et de la production de lait sur ces compositions isotopiques étaient jusqu'ici documentés chez une poignée d'espèces seulement. En outre, des doutes planaient encore sur la responsabilité réelle de la lactation sur certains de ces changements isotopiques. Il était donc nécessaire d'étendre le spectre des mammifères chez qui ces changements isotopiques étaient documentés et d'identifier plus précisément les causes physiologiques derrière ces changements. Pour investiguer ces questions, j'ai réalisé un suivi temporel des compositions isotopiques du Ca organique d'une population de cochons domestiques (*Sus scrofa domesticus*) durant un cycle de reproduction complet. J'ai ensuite comparé ces données expérimentales avec des données de modélisations permettant d'identifier les facteurs en jeu dans les variations de compositions isotopiques observées expérimentalement. J'ai également étudié les compositions isotopiques du Ca des tissus minéralisés de différentes populations de mammifères actuels comprenant des cerfs élaphe (*Cervus elaphus*), des souris grises (*Mus musculus*), des wallabys de l'île Eugène (*Macropus eugenii*), des échidnés à nez court (*Tachyglossus aculeatus*) et des ornithorynques (*Ornithorhynchus anatinus*), ainsi qu'une population de rennes fossiles (*Rangifer tarandus*). Les résultats de ces études soulignent le rôle majeur de la lactation dans l'apparition de différences inter-sexes de compositions isotopiques du Ca des tissus minéralisés, et ont permis de documenter l'hétérogénéité de ces différences isotopiques à l'échelle des mammifères placentaires, des marsupiaux et des monotrèmes. Les résultats obtenus au cours de cette thèse permettent des avancées importantes dans la compréhension du cycle isotopique du Ca chez les mammifères, et offrent de nouvelles perspectives pour explorer l'histoire évolutive de la lactation. En outre, ces résultats offrent aussi des perspectives intéressantes dans les domaines du biomédical et de la paléoécologie.

**Mots-clés :** isotopes non-traditionnels, MC-ICP-MS, modélisation, sexe, lait, géochimie, physiologie, biomédical

**Abstract:** The ability to produce milk (i.e. the lactation) is a trait shared by all current mammal species. This ability is fundamental for juvenile development and is an important factor for determining the range of ecologies and reproductive strategies adopted by mammals. However, it is difficult to explore the temporal and evolutionary origins of this trait based on conventional methods and available fossil evidences. In this thesis, I explored the possibilities offered by the isotopic compositions of the calcium (Ca) that is contained in the mineral structure of bones and teeth. Several studies published prior this thesis suggest that Ca isotopic compositions (notably  $^{44}\text{Ca}$  and  $^{42}\text{Ca}$ ) of mineralized tissues can be affected by milk production and consumption. Besides, other studies suggest that *in vivo* enamel Ca isotopic composition can be preserved in fossilized enamel and can provide information about the ecology and physiology of extinct species. However, the effect of milk consumption and production on these isotopic compositions were documented for a few species only. Besides, the involvement of lactation on these isotopic changes was still poorly described. It was thus necessary to expand the spectrum of mammal species among which these isotopic changes were documented, and to identify more precisely the physiologic causes behind these changes. To investigate these questions, I realized a temporal monitoring of body Ca isotopic compositions in a population of female domestic pigs (*Sus scrofa domesticus*) over a full reproductive cycle. I then compared these experimental data with data obtained from computer assisted modeling, in order to identify the physiological factors that generated the isotopic changes observed experimentally. I also studied the Ca isotopic compositions of mineralized tissues from modern mammal populations of red deer (*Cervus elaphus*), house mouse (*Mus musculus*), tammar wallaby (*Macropus eugenii*), short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus*) and platypus (*Ornithorhynchus anatinus*), as well as a fossil population of reindeer (*Rangifer tarandus*). These studies outline the major role of lactation in the generation of inter-sexual differences of Ca isotopic compositions in mammalian mineralized tissues, and document the heterogeneity of these differences at the scale of placental, marsupial and monotreme mammals. The results presented in this thesis clarify some aspects of the body Ca isotopic cycle of mammals, and provide new perspectives to explore the evolutionary history of lactation. Moreover, these results also provide interesting perspectives in biomedical and paleo-ecological fields.

**Keywords:** non-traditional isotopes, MC-ICP-MS, modeling, sex, milk, geochemistry, physiology, biomedical