

Composition en acides aminés d'os de mammifères fossiles de deux sites du Plio-Pléistocène d'Angola. Comparaison avec la conservation de la phase minérale

Hélène DAVID

Laboratoire de Paléontologie, Université Paris-XI, Bât. 504, F-91405 Orsay cedex (France)
Laboratoire d'Anthropologie, Université Bordeaux-I,
avenue des Facultés, F-33405 Talence cedex (France)

Yannicke Dauphin & Pascale GAUTRET

Laboratoire de Paléontologie, EP 1748 du CNRS, Université Paris-XI,
Bât. 504, F-91405 Orsay cedex (France)

Martin PICKFORD

Laboratoire de Paléontologie, UMR 8569 du CNRS, Muséum national d'Histoire naturelle,
8 rue de Buffon, F-75231 Paris cedex 05 (France)
Chaire de Paléoanthropologie et de Préhistoire, Collège de France,
11 place Marcelin-Berthelot, F-75005 Paris (France)

Brigitte SENUT

Laboratoire de Paléontologie, UMR 8569 du CNRS, Muséum national d'Histoire naturelle,
8 rue de Buffon, F-75231 Paris cedex 05 (France)

David H., Dauphin Y., Gautret P., Pickford M. & Senut B. 1999. — Composition en acides aminés d'os de mammifères fossiles de deux sites du Plio-Pléistocène d'Angola. Comparaison avec la conservation de la phase minérale. *Geodiversitas* (21) 2 : 215-227.

RÉSUMÉ

La comparaison des paramètres microstructuraux et de composition (phases organique et minérale) d'os de mammifères actuels et fossiles (Plio-Pléistocène d'Angola) montre le caractère différentiel de la diagenèse. Malgré une conservation microstructurale globalement bonne, les compositions chimiques des phases minérales sont modifiées (enrichissement en Ca, appauvrissement en Mg). Très peu de matrice organique est conservée. Les phases organiques solubles et insolubles sont également diversement altérées, la composition en acides aminés de la phase soluble semblant mieux conservée que celle de la phase insoluble.

MOTS CLÉS

Plio-Pléistocène,
Angola,
Theropithecus,
Bos,
os,
FTIR,
acides aminés.

ASBTRACT

Composition in amino-acids of fossil mammalian bones from two Plio-Pleistocene Angolan sites. Comparison with the preservation of the mineral phase. Comparison of the microstructural parameters and composition (organic and mineral phases) of modern and fossil mammal bones (Plio-Pleistocene of Angola) show the differential character of diagenesis. Despite excellent preservation of the microstructure, the chemical composition of the mineral phases has been modified (enriched in Ca, reduction of Mg). The amount of preserved organic matrix is greatly reduced. The amino-acid composition of the soluble organic phase appears to be better preserved than that of the insoluble phase.

KEY WORDS

Plio-Pleistocene,
Angola,
Theropithecus,
Bos,
bone,
FTIR,
amino-acids.

INTRODUCTION

L'abondance des phases organiques dans l'os actuel semble un facteur favorable à leur conservation chez les fossiles, et les données relatives à leur composition devraient être très abondantes. Cependant, de telles informations demeurent ponctuelles car, malgré cette circonstance apparemment favorable à des analyses extensives, les techniques analytiques de la phase organique nécessitent la déminéralisation de l'os. Or, ceci implique la destruction du seul paramètre généralement étudié par le paléontologiste, et considéré encore actuellement comme le plus, sinon le seul, réellement important et informatif : la morphologie. Second point qui limite considérablement la portée des données sur les os fossiles : les études sont très spécialisées, soit par la technique utilisée (diffraction X, immunologie...), soit par le composant choisi (phase minérale, composition de l'ostéocalcine...). Bien que l'os soit un matériau complexe, rares sont les travaux prenant simultanément en compte les paramètres de la phase minérale et de la phase organique. Enfin, à cause de la spécialisation de plus en plus poussée des laboratoires et de la complexité croissante des techniques analytiques, la comparaison de la diagenèse des phases organiques et de celle de la phase minérale demeure un problème rarement abordé. Les données sur les phases organiques fossiles sont donc encore réduites, malgré leur potentiel informatif très vaste (apport à la reconstitution de la phylogénie, du paléoenvironnement, histoire de la fossilisation, compréhension

des processus de formation des sites...). La diversité des âges et de la géologie des sites fossilifères est telle que des « lois » régissant la fossilisation et tous les phénomènes connexes ne pourront être établies qu'à partir de très nombreuses données. Une étude préalable ayant mis en évidence la présence de sucres dans un astragale de bovidé récolté dans un site angolais plio-pléistocène (David *et al.* 1996), l'analyse de ce spécimen a été poursuivie afin d'obtenir des données sur la diagenèse comparée des phases minérales et organiques. Un site fossilifère voisin, de même âge mais de sédimentologie différente, a fourni des os de primates, susceptibles de fournir des informations supplémentaires sur la fossilisation et la diagenèse.

TRAVAUX ANTÉRIEURS

Les travaux sur la structure, la minéralogie et la composition de l'os actuel sont trop nombreux pour être cités. Très rapidement, les auteurs ont abandonné les analyses globales au profit d'une caractérisation des composants protéiques isolés, pour en déterminer la composition ou le séquençage. Parmi les paramètres caractéristiques des phases organiques, les acides aminés semblent avoir été parmi les premiers étudiés, notamment à cause des particularités de composition du collagène. Or, ce dernier constitue environ 90 % de la phase protéique de l'os. Toutefois, dès 1965, Glimcher & Katz mettaient en évidence les pro-

blèmes posés par la solubilisation plus ou moins grande du collagène dans divers solvants et acides.

Chez les fossiles, les premières analyses détaillées semblent dues à Abelson (1956) sur du matériel dévonien. La comparaison de la composition en acides aminés de spécimens appartenant à des taxons variés, et venant de sites d'âges différents, montre une grande variabilité (Armstrong & Halstead Tarlo 1966 ; Dungworth *et al.* 1974 ; Wyckoff & Davidson 1976 ; Davidson *et al.* 1978 ; von Endt & Ortner 1982 ; Cohen-Solal *et al.* 1987). En réalité, cette variabilité doit être supérieure à ce qui ressort de l'examen de la littérature, car seuls les résultats « positifs », c'est-à-dire les analyses dans lesquelles les acides aminés ont pu être identifiés, sont généralement publiés. Or, certains sites fossiles fournissent des os contenant encore de la phase organique, mais les spectres d'acides aminés ne sont pas toujours interprétables (Montgelard *et al.* 1997 ; Dauphin 1998). De plus, dans la plupart des cas, seule la phase organique insoluble (assimilée au collagène malgré les variations pouvant être dues au produit utilisé pour la déminéralisation de l'os), est prise en compte. Outre le collagène, l'albumine et l'ostéocalcine sont les protéines le plus souvent identifiées chez les fossiles ou subfossiles (Tuross *et al.* 1980 ; Lowenstein 1981 ; Huq *et al.* 1985 ; Montgelard 1992). Il s'agit en fait des protéines les mieux caractérisées dans l'os actuel car il y aurait au moins deux cents protéines non collagéniques (ou NCP) (Delmas *et al.* 1984). L'acide γ -carboxyglutamique, longtemps considéré comme caractéristique de l'ostéocalcine, a été recherché chez les fossiles. Toutefois, les interprétations qui découlent de sa présence ou de son absence quant à la « bonne conservation » de l'os doivent être pondérées. D'une part, l'ostéocalcine est parfois en quantité négligeable, comme dans l'os humain. D'autre part, dans l'os adulte, toutes les protéines non collagéniques sont déjà fortement dégradées (Terminé 1988), ce qui restreint fortement la probabilité de sa conservation chez les fossiles. Enfin, l'acide γ -carboxyglutamique a été extrait et identifié dans les squelettes de coraux, et est probablement également présent dans les tests de mollusques (Hamilton & Zerner 1983).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL

Les spécimens actuels de références sont constitués par un tibia de bœuf (congelé et sec), un humérus de *Papio anubis* (Cercopithecoidea d'Ouganda, ayant séjourné en forêt pendant une durée indéterminée) et du collagène commercial de type I (Sigma).

Les deux sites fossilifères, situés sur le plateau d'Humpata (sud de l'Angola) sont datés du Plio-Pléistocène. Le fragment d'astragale de bovidé provient des découvertes effectuées lors d'une campagne de l'Angola Palaeontology Expedition (Pickford *et al.* 1992, 1994). Il a été récolté dans des remplissages de fissures de la carrière de Cangalongue III, composées de brèches grossières, contenant de nombreux fragments de stalagmites recimentés par des travertins. Les fragments de côtes et de vertèbres de *Theropithecus* (primates Cercopithecoidea) viennent du gisement de Tchiua, dont les remplissages sont formés de brèches à grains très fins. Cette formation a été interprétée comme du guano calcifié de chauve-souris.

Il convient de signaler que la diversité des os ne peut guère provoquer de biais majeurs dans la comparaison, compte tenu du niveau d'observation utilisé dans ces analyses.

MÉTHODES

Microstructures

Des cassures brutes et traitées ont été observées au microscope électronique à balayage. Les os actuels ont été soumis à des protéolyses enzymatiques, afin d'éliminer partiellement l'abondante matrice organique qui tend à masquer les structures. De la trypsine et de l'alcalase ont été utilisées car elles sont peu spécifiques. Les surfaces polies des os fossiles ont été légèrement décalcifiées à l'acide formique.

Composition globale

La composition minéralogique et la présence de phases organiques ont été déterminées par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Après décontamination des polluants organiques à l'hypochlorite de sodium, les os sont rincés à l'eau Milli-Q et séchés à température

ordinaire. Ils sont ensuite finement broyés. Les poudres d'os mélangées à du KBr ont été analysées sur un spectromètre FTIR Perkin Elmer 1600, équipé d'un accessoire à réflexion diffuse (DRIFT). Le nombre de balayages est de soixante-quatre (soit un temps d'analyse supérieur à quatre minutes par spectre), dans une gamme de longueurs d'onde allant de 450 à 4000 cm^{-1} (Dauphin 1993). Le système est maintenu sous atmosphère d'azote afin de réduire les bandes dues aux CO_2 et H_2O atmosphériques.

Analyse chimique élémentaire

La composition chimique a été déterminée par microanalyse localisée (spectrométrie dispersive en énergie ou EDS). Le système utilisé, Link An 10000 couplé à un microscope électronique Philips (SEM 505) (Université Paris-XI-Orsay), possède un programme spécialement conçu pour l'analyse des surfaces rugueuses. Par une préparation adaptée des spécimens, il est aisé d'identifier les divers composants d'un fossile (tissu, sédiment). La préparation des échantillons, les conditions d'analyse et le traitement statistique sont similaires à ceux précédemment décrits (Dauphin 1997). Dans les spécimens actuels, les teneurs de certains éléments chimiques sont inférieures à la limite de détection de la microsonde (Fe ou Mn par exemple). Toutefois, les valeurs obtenues sont indiquées, car ces éléments sont de bons indicateurs de la diagenèse, leurs teneurs dans les fossiles étant souvent supérieures à la limite de détection de la microsonde.

Composition en acides aminés

Les os ont été décontaminés à l'hypochlorite de sodium, puis nettoyés pendant quelques minutes aux ultrasons afin de décoller les particules et débris divers qui pouvaient subsister, notamment sur les fossiles. Après rinçage à l'eau Milli-Q, ils ont été séchés à température ambiante.

Les poudres résultant du broyage ont été décalcifiées à l'acide acétique sous un pH constant de 4. Les phases solubles (MOS) et insolubles (MOI) ont été séparées par centrifugation. La phase soluble a été dessalée par ultrafiltration avec de l'eau Milli-Q sur une membrane dont le seuil de coupure est de 3 kDa. La phase insoluble a été

dessalée par centrifugations successives dans de l'eau Milli-Q. Les phases soluble et insoluble ont été lyophilisées.

Après hydrolyse dans une solution HCl 6N pendant vingt-quatre heures à 110 °C sous atmosphère d'azote, la dérivation PITC a été effectuée car elle permet la détection des amines secondaires. La composition en acides aminés a été obtenue par chromatographie HPLC en phase inverse, sur une colonne Nucleosyl C18, avec un éluant d'acide orthophosphorique et NaOH à pH 6,4 et un gradient d'acétonitrile. Le détecteur est réglé à 254 nm. Rappelons que l'hydrolyse utilisée détruit les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine), ainsi que le tryptophane. L'acide γ -carboxyglutamique, qui nécessite une hydrolyse particulière de type alcalin, n'a pas été recherché, les matrices organiques extraites des os fossiles étant en très faibles quantités.

Points isoélectriques

À partir des compositions en acides aminés, on peut calculer le point isoélectrique moyen (pI) d'une phase organique (Sillero & Ribeiro 1989), ce qui permet d'estimer son degré d'acidité. Dans la formule utilisée par ces auteurs, les acides aspartique, glutamique, la cystéine libre, la tyrosine, l'histidine, la lysine et l'arginine sont pris en compte. Cette méthode indirecte présente l'avantage de pouvoir être appliquée sur les matrices soluble et insoluble, ce qui n'est pas le cas des méthodes directes chromatographique (*chromatofocussing*) ou électrophorétique (*isoelectric focussing*), plus précises car elles fournissent l'ensemble des points isoélectriques des divers composés. De plus, le calcul à partir des pourcentages d'acides aminés permet de connaître le pI des phases solubles même lorsque les quantités recueillies sont minimales.

RÉSULTATS

CONTROLE DE L'ÉTAT DE CONSERVATION GÉNÉRALE DES OS

L'observation de la microstructure est une première étape dans le contrôle de l'état de conservation d'un fossile. Elle est récemment devenue cruciale, car certains champignons contiennent

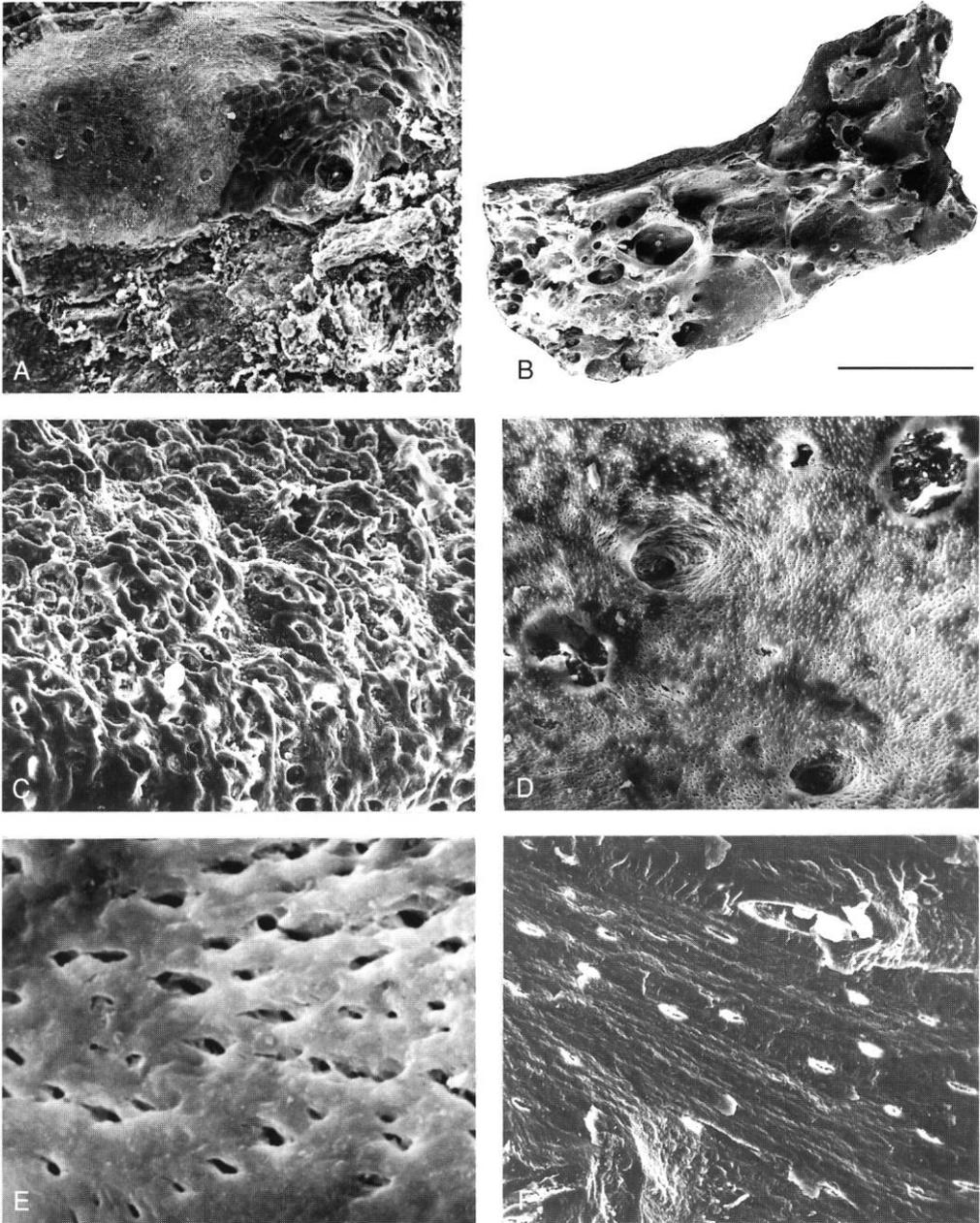


FIG. 1 — **A**, surface externe altérée dans une cassure ancienne de l'astragale du bovidé fossile de Cangalongue. Échantillon non traité ; **B**, vue d'un fragment de vertèbre de *Theropithecus*, Cercopithécoidea (Tchiua), après un nettoyage insuffisant pour détruire un éventuel sédiment présent dans les cavités (acide formique 5 %, 15 s) ; **C**, surface altérée d'un fragment de côte de *Theropithecus*, Cercopithécoidea montrant l'os spongieux après disparition du périoste ; cassure traitée à l'acide formique 5 %, 15 s ; **D**, coupe oblique montrant la paroi des trabécules dans l'os spongieux d'un fragment de côte de *Theropithecus* ; même spécimen que Fig. 3 ; **E**, détail de la précédente ; **F**, lamelles osseuses dans une coupe oblique d'un fragment de côte de *Theropithecus* ; cassure traitée à l'acide formique 5 %, 15 s. Échelle : A, 160 μ m ; B, 3 mm ; C, 90 μ m ; D, F, 100 μ m ; E, 10 μ m.

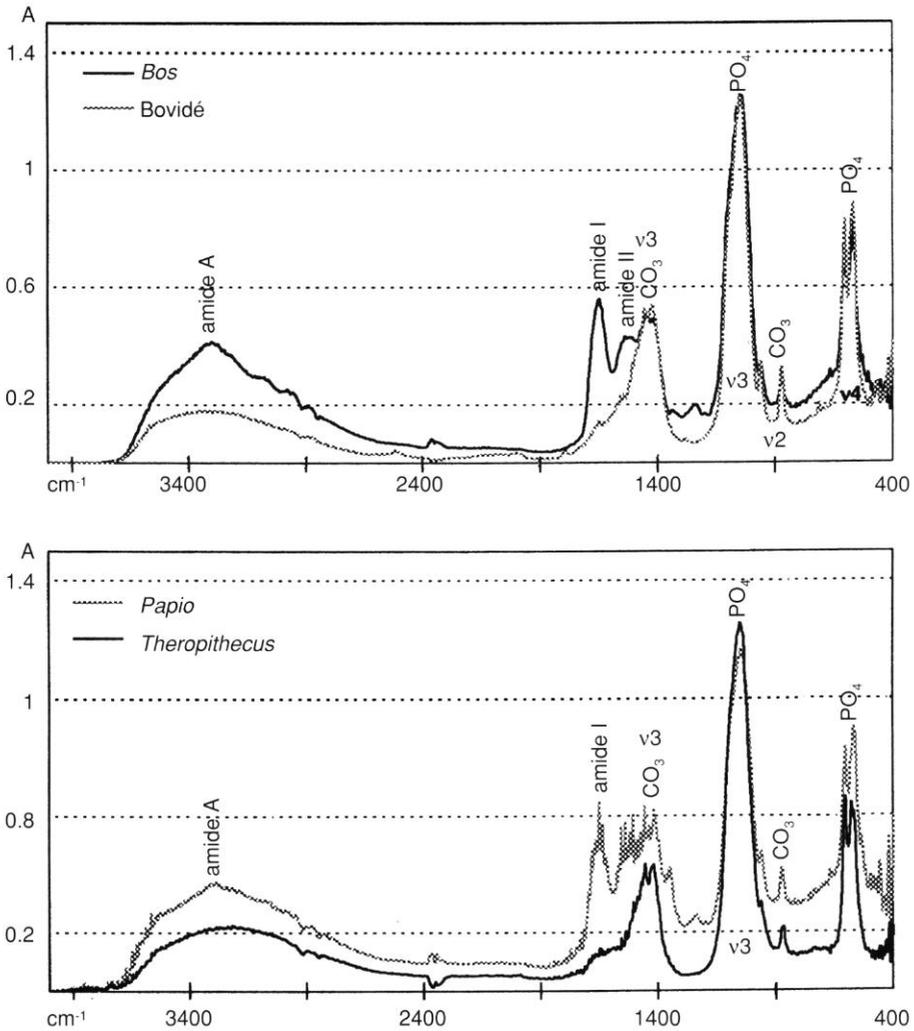


FIG. 2. — Spectres infrarouges des os actuels (*Bos* et *Papio*, Cercopithecoidea) et fossiles (bovidé et *Theropithecus*) montrant que les os fossiles sont conservés en apatite, et la diminution de leur quantité de matière organique.

des acides aminés jusqu'ici considérés comme caractéristiques du collagène (hydroxyproline et hydroxylysine) (Celerin *et al.* 1995).

Les sections diversement orientées réalisées dans l'os de bœuf actuel observé au microscope électronique à balayage après une protéolyse enzymatique montrent la structure lamellaire, le système haversien et les zones en « contreplaqué » (David *et al.* 1996). Macroscopiquement altéré (Fig. 1A), le fragment d'astragale de bovidé de Cangalong ne comporte pas de remplissage secondaire dans les cavités naturelles de l'os, ni de trace

indiquant l'activité de micro-organismes (David *et al.* 1996). Les risques de contamination en matrice organique d'origine exogène apparaissent ainsi réduits. Les cavités des vertèbres de *Theropithecus* ne sont pas comblées (Fig. 1B). Sur les fragments de côtes, les altérations de l'os périostique (Fig. 1C) permettent d'observer l'os spongieux sous-jacent, ainsi que des structures lamellaires dans les zones plus internes. Des lacunes ostéocytiques sont parfois présentes. La disposition des fibres de collagène minéralisées est conservée sur les parois des trabécules

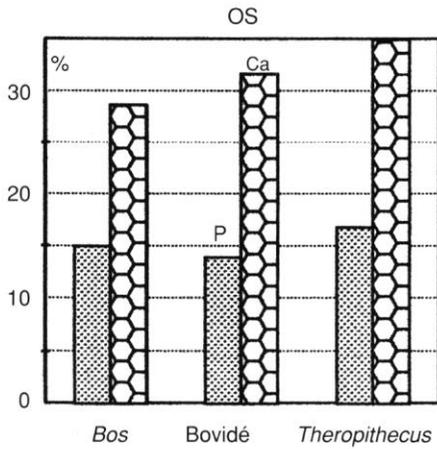


FIG. 3. — Teneurs en éléments majeurs : P et Ca, des os actuels et fossiles, et du sédiment encaissant.

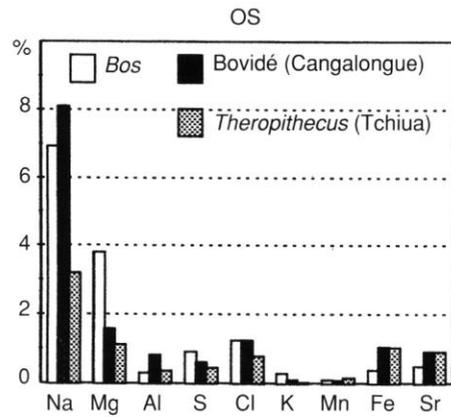


FIG. 4. — Teneurs en éléments mineurs des os actuels et fossiles, et du sédiment encaissant.

(Fig. 1D, E). La structure en lamelles est également visible (Fig. 1F).

COMPOSITION GLOBALE ET ÉLÉMENTAIRE

Les spectres infrarouges montrent que dans les deux sites, les os sont en apatite, avec des modifications modérées (Fig. 2). Termine & Posner (1966) ont mis au point un mode de calcul de la cristallinité (*splitting fraction*) de l'os à partir des intensités relatives des bandes du doublet $\nu_4 \text{PO}_4$. Le taux moyen de cristallinité de l'os atteint 0,10 pour le bœuf actuel et 0,11 pour *Papio* ; celui du bovidé fossile est supérieur à 0,14 tandis que chez *Theropithecus* il est égal à 0,08. Les variations du taux de cristallinité des os actuels dépendent de

l'âge de l'animal : faible chez l'animal jeune, il sera plus élevé chez un animal âgé. Chez les fossiles, ces variations originelles sont généralement masquées par les modifications diagénétiques. Que la cristallinité augmente ou diminue, la cause de ces variations reste la plupart du temps indéterminée : disparition de l'os amorphe, augmentation de la phase cristalline aux dépens de la phase amorphe, ou augmentation de la cristallinité de la phase initialement déjà cristalline. Stutman *et al.* (1965) ont montré que la position et l'intensité des bandes ν_1 , ν_3 et ν_4 dépendaient du type d'apatite : hydroxyapatite, chloroapatite et fluoroapatite. Si F est normalement en quantité insuffisante dans l'os actuel pour altérer les fré-

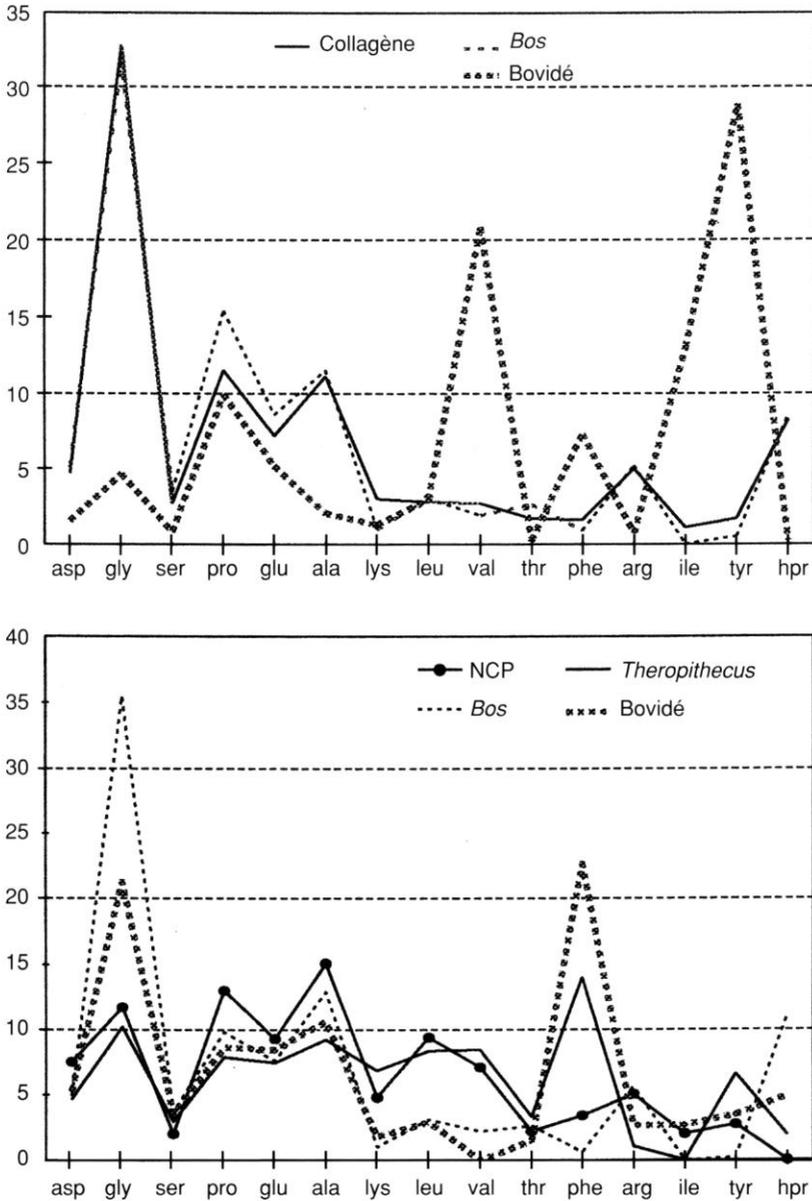


FIG. 5. — Composition en acides aminés (%) des phases insolubles (en haut) et solubles (en bas) des os actuels et fossiles de Cangalongue et de Tchiua. Les compositions du collagène et des protéines non collagéniques (NCP d'après von Endt & Ortner 1982) sont figurées.

quences de ces bandes, il est généralement admis qu'il est en quantité importante dans tous les os fossiles. Toutefois, d'après ces critères, les os fossiles ne sont pas enrichis en F.

Les différences de composition des sédiments

(l'un calcaire, l'autre phosphaté), n'apparaissent pas dans les spectres, ce qui confirme l'absence d'un remplissage important des cavités osseuses. La phase organique, encore présente chez les fossiles (amides A, I et II), y est modifiée en quan-

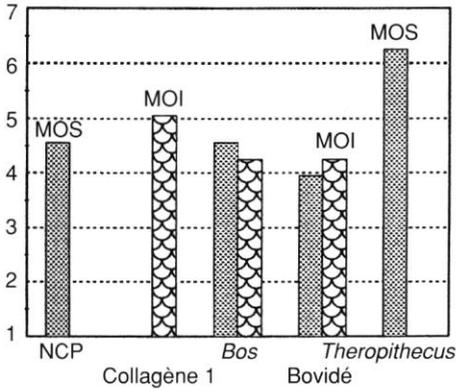


FIG. 6. — Points isoélectriques moyens calculés d'après les compositions en acides aminés par la méthode de Sillero & Ribeiro 1989.

tité (bandes moins intenses) et en qualité (absence de certaines bandes).

Les os fossiles sont tous deux enrichis en Ca (Fig. 3), *Theropithecus* étant en outre plus riche en P que le bovidé. Le rapport en poids Ca/P de l'os de bœuf actuel est voisin de 1,96, celui de *Papio* atteint 2,02. Chez les fossiles, ces rapports sont supérieurs : 2,08 pour *Theropithecus* et 2,30 pour le bovidé. Les teneurs en éléments mineurs ne montrent pas de modifications importantes. Malgré la grande différence de quantité en Fe des deux sédiments (Fig. 4), cette disparité n'est pas transcrite dans les fossiles puisque les teneurs des os sont similaires dans les deux sites (Fig. 4). Le sédiment de Cangalongue est calcaire, et plus riche en Mg et Al que Tchiua (Figs 3, 4).

COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS

Phase organique insoluble (Fig. 5)

La composition de la matrice insoluble extraite de l'os de bœuf est identique à celle du collagène commercial de référence (type I). La matrice insoluble du bovidé fossile est très différente de celle de l'os actuel, mais la plupart des pics a été identifiée. Les teneurs en glycine, hydroxyproline, proline et alanine sont plus faibles que dans l'actuel, les teneurs en tyrosine, valine et isoleucine sont plus élevées. Deux pics non identifiés sont présents. La composition de la matrice insoluble de *Theropithecus* est beaucoup moins claire : de nombreux pics ne sont pas identi-

fiables avec certitude et le spectre n'est pas représenté dans la Figure 5. Dans la zone correspondant à la succession thréonine, alanine, histidine et proline, on trouve seulement un large dôme. Les deux pics non identifiés chez le bovidé existent également.

Phase organique soluble (Fig. 5)

À titre de comparaison, la composition des protéines non collagéniques (NCP) est figurée (von Endt & Ortner 1982). Peu abondantes (10 % de la matrice organique de l'os : Hauschka & Wians 1989), ces protéines non collagéniques sont cependant très variées. Nombre d'entre elles ne sont pas encore identifiées, et certaines sont connues seulement partiellement. La composition de la phase soluble extraite de l'os de bœuf actuel est relativement similaire à celle de la phase insoluble ; cette similitude est partiellement due à la mise en solution partielle du collagène (Weiner & Bar-Yosef 1990). Par rapport à la composition des protéines non collagéniques (NCP), la matrice soluble du bœuf est trop riche en hydroxyproline et en glycine, trop pauvre en leucine et valine.

La matrice soluble du bovidé fossile se caractérise par une très forte teneur en phénylalanine et une baisse sensible des quantités de glycine et d'hydroxyproline. Pratiquement tous les pics sont identifiables. La matrice de *Theropithecus* est également riche en phénylalanine, glycine, alanine et proline, sans atteindre toutefois des valeurs comparables à celle du bovidé. Les teneurs en hydroxyproline sont nulles. En outre, le spectre est très clair et tous les pics sont identifiables.

POINTS ISOÉLECTRIQUES (pI) MOYENS DES MATRICES

Les matrices organiques de l'os, collagènes et NCP sont acides (Fig. 5). Il en est de même pour les matrices extraites de l'os de bœuf actuel. Si le pI moyen de la phase soluble de l'os de bœuf est similaire à celui des NCP, le pI de la phase insoluble du bœuf est légèrement plus acide que celui du collagène de type I. La phase soluble du bovidé fossile est devenue un peu plus acide que l'insoluble. Quant à la phase soluble du *Theropithecus*, elle atteint un pI supérieur à 6 (Fig. 6).

DISCUSSION

Ces deux exemples sont bien évidemment insuffisants pour en tirer des conclusions définitives sur les processus de fossilisation des os. D'une part seuls deux sites sont pris en considération, d'autre part les paramètres analysés sont trop peu nombreux. Cependant, pour chaque composant, ils sont suffisants pour révéler certains points communs et certaines différences, avec les études publiées.

COMPOSITION GLOBALE

La composition globale des os fossiles des deux sites de Cangalogue et de Tchiua montre que les os y sont conservés en apatite. Toutefois, la diagenèse n'est pas absente puisque des paramètres tels que les teneurs en Ca, en P, la cristallinité et les teneurs globales en matrices organiques sont altérés. La composition des phases organiques est également altérée. Très peu de matrice organique a pu être extraite des os fossiles des deux sites. Ainsi que le fait remarquer Glimcher (1993) : « ... *the original volume occupied by the organic matrix must have been replaced by new inorganic material (crystals and possibly amorphous solid phases) formed during the period of fossilization and after the death of the animal [...]* it seems unreasonable to assume that the atom and ion constituents in the mineral phase of the skeleton and tooth tissues of the fossil specimen are those which were present at the time of the animal's death. » L'utilisation abusive des paramètres géochimiques pour la reconstitution des paléo-environnements doit une fois encore être signalée, que ces paramètres dérivent de la phase minérale ou de la phase organique. L'une des tendances actuelles en ce domaine consiste à « remplacer » les données issues de l'analyse de la phase minérale par celle de la phase organique, qui serait moins sensible à la diagenèse. Or, dans la plupart des cas, cette matrice organique est très altérée en qualité et en quantité. Et lorsque sa quantité semble voisine de celle des os actuels, elle est au moins partiellement exogène (Montgelard *et al.* 1996 ; Dauphin 1998). Dans le cas des fossiles d'Angola, seules les analyses de la composition en acides aminés et les données

qui en découlent (pI moyens) ont été étudiées. Les interprétations sont donc limitées, car de nombreux paramètres restent inconnus : masses moléculaires, composition en acides aminés et pI de chaque composant par exemple. En fait, si *a priori* l'abondance naturelle des phases organiques dans l'os semble être un facteur favorable à leur conservation, elle est surtout un des facteurs principaux de leur destruction. D'une part, les cellules contiennent de nombreuses protéases qui sont libérées à la mort de l'animal, contribuant ainsi à la dégradation rapide et à la destruction de la phase organique. D'autre part, les bactéries, rencontrant un milieu nutritif riche, sont très actives.

CONSERVATION DIFFÉRENTIELLE DES PHASES ORGANIQUES

Dans les spécimens angolais, d'après leurs compositions en acides aminés, les phases organiques insolubles sont plus altérées que les phases solubles. Paradoxalement, les compositions en acides aminés des phases solubles du bovidé fossile et du *Theropithecus* sont plus proches de celle du collagène que les phases insolubles des mêmes spécimens. La comparaison avec les données de la littérature n'est pas immédiate, notamment à cause de la diversité des techniques d'analyses disponibles pour les acides aminés. Il est en effet pratiquement impossible d'obtenir, avec une seule hydrolyse et une seule dérivation, un spectre contenant tous les acides aminés. Toutefois, une telle similitude a déjà été signalée dans des os subfossiles (Hedges *et al.* 1980). Dans cette étude cependant, les amines secondaires (dont l'hydroxyproline, l'un des éléments les plus caractéristiques du collagène) ne sont pas mentionnées. Il est probable qu'au cours de la diagenèse, les fibres de collagène se fragmentent. Ce phénomène peut être comparé aux procédures expérimentales permettant de couper les longues fibres en peptides, couramment pratiquées sur le collagène de type I. Ces techniques ont pour but de rendre possible l'utilisation des méthodes classiques d'analyse des phases solubles (chromatographie liquide et électrophorèse notamment) sur une phase initiale insoluble (Rossi *et al.* 1996).

On peut noter la similitude entre les bovidés actuel et fossile, qui tous deux, présentent une phase soluble très riche en acides aminés caractéristiques du collagène. Le collagène solubilisé par les processus de décalcification apparaît donc moins sensible aux altérations diagénétiques que le collagène non solubilisé. Ces différences de comportement pourraient être dues à son degré d'association avec la phase minérale. On peut rapprocher ces observations de celle de Masters (1987), qui avait déjà reconnu la conservation différentielle des composants de l'os, les NCP étant les mieux conservées.

RÔLE DU SÉDIMENT

De nombreux facteurs interviennent pendant la fossilisation des restes squelettiques ; en outre, les processus diagénétiques sont permanents entre le stade de l'enfouissement et la découverte du fossile. Parmi ces facteurs, la taille des os est à considérer. Bien que les études sur le sujet demeurent limitées, la composition chimique élémentaire de la zone externe d'un os de grand mammifère est plus modifiée que ses zones internes (Williams & Marlow 1987 ; Williams & Potts 1988). L'influence de la composition du sédiment est dans ce cas évidente, puisque le périmètre externe des os est enrichi en éléments chimiques très abondants dans le sédiment environnant. Toutefois, l'influence du sédiment est variable selon les sites car bien que le sédiment de Cangalongue soit beaucoup plus riche en Fe que celui de Tchiua, les os ont à peu près les mêmes teneurs en Fe. Une étude détaillée de l'évolution des teneurs en Fe de l'extérieur vers l'intérieur des os n'a pas été faite. L'éventuel remplissage de la cavité médullaire peut augmenter les modifications diagénétiques.

Enfin, en dépit d'un sédiment dont la composition est plus proche de celle de l'os à Tchiua qu'à Cangalongue, les phases organiques du *Theropithecus* sont plus modifiées que celles du bovidé. Il faut noter que les dimensions des fragments de vertèbres et de côtes du *Theropithecus* étaient nettement inférieures à celles du fragment de bovidé. L'absence de données détaillées sur les sédiments et le contexte géologique des deux sites ne permet pas de faire des comparaisons détaillées.

Il convient donc de noter que, en dépit d'une microstructure et d'une minéralogie conservées, la diagenèse est présente dans ces os fossiles. Il semble important d'insister sur le fait que les composés minéraux et organiques d'une part, et les phases organiques solubles et insolubles d'autre part, ont des réactions différentes aux processus diagénétiques. Ainsi, dans le cas des fossiles d'Angola, les données peuvent apparaître contradictoires : la composition en acides aminés indique une diagenèse plutôt modérée dans le cas du bovidé, alors que l'estimation de la quantité de sa phase organique montre une forte diagenèse. Il apparaît donc de plus en plus que l'état de conservation des phases minérales ou organiques ne peut être établi à partir de l'analyse d'un seul type de composé. Et ce d'autant plus que, rappelons le, certains produits considérés comme caractéristiques de l'os (collagène et acide γ -carboxyglutamique par exemple) sont maintenant connus dans des taxons variés.

La connaissance de la suite d'événements qui préside à la formation d'un gisement de fossiles, ainsi que la compréhension des altérations diagénétiques, ne pourra être atteinte que par des séries d'analyses progressives, allant des caractères les plus généraux (composition minéralogique, présence de phases organiques) jusqu'aux plus détaillés (composition en acides aminés ou en monosaccharides de chaque protéine par exemple). Le problème majeur de telles études est que les fractionnements successifs nécessaires à une telle identification impliquent que ces phases organiques soient conservées en quantité suffisante dans les os.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier les nombreuses personnes, en France (Prof. Y. Coppens et P. Taquet) et en Angola (Dr S. Aço, Mission française de coopération à Luanda ; Instituto Nacional do Património Cultural ; Museu Regional de Huila, Lubango) qui ont permis la réalisation de la campagne de terrain en Angola en 1990. Les commentaires détaillés du Prof. M. J. Glimcher (The Children's Hospital, Boston) ainsi que ceux de deux autres rapporteurs anonymes ont été très utiles pour l'amélioration de ce manuscrit.

RÉFÉRENCES

- Abelson P. H. 1956. — Paleobiochemistry. *Scientific American* 19: 83-92.
- Armstrong W. G. & Halstead Tarlo L. B. 1966. — Amino-acid components in fossil calcified tissues. *Nature* 210, 5035: 481-482.
- Celerin M., Day A., Castle J. & Laudenschlag D. E. 1995. — A glycosylation pattern that is unique to fimbriae from the taxon *Micobacteriales*. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 452-460.
- Cohen-Solal L., Glimcher M., Kossiva D. & Ricqlès de A. 1987. — Données préliminaires sur l'analyse paléobiochimique de quelques ossements mammaliens de la Caune de l'Arago à Tautavel. *Annales de Paléontologie (Vert.-Invert.)* 73, 3 : 217-234.
- Dauphin Y. 1993. — Potential of the diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) method in paleontological studies of bones. *Applied Spectroscopy* 47, 1: 52-55.
- 1997. — Comparaison de la composition chimique de la dentine et de l'émail des dents de Reptiles et de Mammifères actuels. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie*, 13^e série, 18, 1 : 29-40.
- 1998. — Comparaison de l'état de conservation des phases minérales et organiques d'os fossiles – implications pour les reconstitutions paléoenvironnementales et phylétiques. *Annales de paléontologie* 84 (2) : 215-239.
- David H., Dauphin Y., Pickford M. & Senut B. 1996. — Conservation de sucres dans les phases organiques d'os de bovidés fossiles. *Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle*, Paris, série 4, 19 C (2-3) : 403-415.
- Davidson F. D., Lehman J. P., Taquet P. & Wyckoff R. W. G. 1978. — Analyse des protéines de Vertébrés fossiles dévoniens et crétacés du Sahara. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, Paris, série D, 287 : 919-922.
- Delmas P. D., Tracy R. P., Riggs B. L. & Mann K. G. 1984. — Identification of the noncollagenous proteins of bovine bone by two-dimensional electrophoresis. *Calcified Tissue International* 36: 308-316.
- Dungworth G., Vincken N. J. & Schwartz A. W. 1974. — Compositions of fossil collagens: analysis by gas-liquid chromatography. *Comparative Biochemistry Physiology* 47B: 391-399.
- Endt D. W. von & Ortner D. J. 1982. — Amino acid analysis of bone from a possible case of prehistoric iron deficiency anemia from the American Southwest. *American Journal of Physical Anthropology* 59: 377-385.
- Glimcher M. J. 1993. — *Chemical composition, structure and physico-chemical reactivity of the inorganic crystals of calcified tissues and their relationship to organic matrix components: implications for diagenesis*. Second Oxford Workshop, 12-14 July 1993, abstract.
- Glimcher M. J. & Katz E. P. 1965. — The organization of collagen in bone: the role of noncovalent bonds in the relative insolubility of bone collagen. *Journal of Ultrastructure Research* 12: 705-729.
- Hamilton S. E. & Zerner B. 1983. — Comparative studies of calcification: its definition in marine invertebrates. *Proceedings of the Inaugural Great Barrier Reef Conference*, Aug. 28-Sept. 2: 311-316.
- Hauschka P. V. & Wians F. H. Jr. 1989. — Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. *The Anatomical Record* 224, 2: 180-188.
- Hedges R. E. M. & Wallace C. J. A. 1980. — The survival of protein in bone: 35-40, in Hare P. E., Hoering T. C. & King L. K. Jr (eds), *Biogeochemistry of Amino Acids*. J. Wiley & Sons, New York and Chichester.
- Huq N. L., Rambaud S. M., Teh L.-C., Davies A. D., McCulloch B., Trotter M. M. & Chapman G. E. 1985. — Immunochemical detection and characterization of osteocalcin from *Moa* bone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 129: 714-720.
- Lowenstein J. M. 1981. — Immunological reactions from fossil material. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 292: 143-149.
- Masters P. M. 1987. — Preferential preservation of noncollagenous protein during bone diagenesis: implications for chronometric and stable isotopic measurements. *Geochimica Cosmochimica Acta* 51: 3209-3214.
- Montgelard C. 1992. — Albumin preservation in fossil bones and systematics of *Malpaisomys insularis* (Muridae, Rodentia), an extinct rodent of the Canary Islands. *Historical Biology* 6: 293-302.
- Montgelard C., Buchy M. C., Gautret P. & Dauphin Y. 1997. — Biogeochemical characterization of ichthyosaur bones from Holzmaden (Germany, Lias). *Bulletin de la Société géologique de France* 168, 6 : 759-766.
- Pickford M., Mein P. & Senut B. 1992. — Primate bearing Plio-Pleistocene cave deposits of Humpata, Southern Angola. *Human Evolution* 7, 1: 17-33.
- 1994. — Fossiliferous Neogene karst fillings in Angola, Botswana and Namibia. *South African Journal of Science* 90: 227-230.
- Rossi A., Vitellaro Zuccarello L., Zanaboni G., Monzani E., Dyne K. M., Cetta G. & Tenni R. 1996. — Type I collagen CNBr peptides: species and behavior in solution. *Biochemistry* 35: 6048-6057.
- Sillero A. & Ribeiro J. M. 1989. — Isoelectric points of proteins: theoretical determination. *Analytical Biochemistry* 179: 319-325.
- Stutman J. M., Termine J. D. & Posner A. S. 1965. — Vibrational spectra and structure of the phosphate ion in some calcium phosphates. *Transactions of the New York Academy of Sciences*, series II, 27, 6: 669-675.

- Termine J. D. 1988. — Non-collagen proteins in bone: 178-190, in *Cell and molecular biology of vertebrate hard tissues*, Ciba Foundation Symposium 136. J. Wiley & Sons, New York and Chichester.
- Termine J. D. & Posner A. S. 1966. — Infrared determination of the percentage of crystallinity in apatitic calcium phosphates. *Nature* 211, 5046: 268-270.
- Tuross N., Eyre D. R., Holtrop M. E., Glimcher M. J. & Hare P. E. 1980. — Collagen in fossil bones: 53-64, in Hare P. E., Hoering T. C. & King L. K. Jr., *Biogeochemistry of Amino Acids*. J. Wiley & Sons, New York and Chichester.
- Weiner S. & Bar-Yossef O. 1990. — States of preservation of bones from prehistoric sites in the near East: a survey. *Journal of Archeological Science* 17: 187-196.
- Williams C. T. & Marlow C. A. 1987. — Uranium and thorium distribution in fossil bones from Olduvai Gorge, Tanzania and Kanam, Kenya. *Journal of Archaeological Science* 14: 297-309.
- Williams C. T. & Potts P. J. 1988. — Element distribution maps in fossil bones. *Archaeometry* 30, 2: 237-247.
- Wyckoff R. W. G. & Davidson F. D. 1976. — Gel filtered fossil and fresh gelatins. *Comparative Biochemistry and Physiology* 54B: 201-203.

*Soumis pour publication le 10 mars 1998 ;
accepté le 15 septembre 1998.*