HAL
open science

Étude des altérations microbiennes affectant les ossements archéologiques : comparaison avec un référentiel moderne expérimental

Mélodie Cossé

To cite this version:

Mélodie Cossé. Étude des altérations microbiennes affectant les ossements archéologiques : comparaison avec un référentiel moderne expérimental . Archéologie et Préhistoire. 2011. dumas-01559406

HAL Id: dumas-01559406

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01559406

Submitted on 10 Jul 2017

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.

Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License

MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Etude des altérations microbiennes affectant les ossements archéologiques

-

Comparaison avec un référentiel moderne expérimental

MASTER 2 QUATERNAIRE ET PREHISTOIRE

Mémoire présenté par Mélodie Cossé

Le 23 juin 2011

Sous la direction de Madame Ina REICHE et Monsieur Matthieu LEBON

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Ina Reiche et Matthieu Lebon de m'avoir fait confiance en me proposant ce sujet et de m'avoir suivi durant cette année. Un grand merci à Ina Reiche, qui, malgré la distance a su être disponible et attentive. Je remercie Matthieu Lebon pour sa disponibilité, ses encouragements, son aide précieuse, sa patience (!) et de m'avoir initié à la spectroscopie infrarouge, au PIXE…

Je remercie l'équipe C2RMF du Louvre qui travaille au PIXE, dont l'accueil et les conseils ont été grandement appréciés. Un grand merci à Eric Laval qui m'a initié à la microscopie électronique à balayage et à Katharina Müller qui m'a accompagné lors des premières séances. Merci à elle également pour sa bonne humeur, ses conseils et de m'avoir permis de travailler sur des ossements analysés par le LRMH.

Je remercie ainsi l'équipe du LRMH, Geneviève Orial et ses collègues qui ont participé à la compréhension des mécanismes microbiens par des mises en culture.

Je tiens également à remercier Céline de m'avoir accueilli au Ladir à Thiers et de m'avoir initié au RAMAN.

Je remercie Pierre Magnier pour ses conseils dans le choix de mes échantillons, Anne-Marie Moigne de m'avoir permis de travailler sur ceux de Bize-Tournal.

Merci à Xavier Gallet de m'avoir aidé à comprendre les processus sédimentaires de Song Terus et de m'avoir conseillé.

Merci à toute l'équipe du Département de Préhistoire du Muséum national d'histoire naturelle qui, de près ou de loin a permis la réalisation de ce travail ; Christophe Falguère pour son acceuil, Simon, Xavier, Pierre, Nassima, et les doctorants Davinia et Qingfeng et les autres…

Merci à mes collègues de promo de l'IPH d'avoir éclairé mes journées par leur visite au sous-sol…

Je remercie enfin grandement ma famille, mes amis et Julien pour leur soutien sans faille durant cette année.

Merci à Mathieu pour son omniprésence permanente, ses encouragements et son aide.

A mon cher grand-Père qui m'a tant soutenu et qui nous a quitté avant cette année universitaire…

Sommaire

PARTIE I : LE SYSTEME OSSEUX ET ALTERATIONS *7*

Chapitre 1 : Le système osseux **8**
I Les os : caractéristiques générales 8
A Fonctions du système osseux : 8
B Types morphologiques des os : 8
II Composante structurale des os : 8
A Architecture du tissu osseux : 9
B Matrice extracellulaire osseuse : 12

Chapitre 2 : Processus d'altération taphonomique **15**
I Biostratinomie et enfouissement : 15
A La biostratinomie : 15
B L'enfouissement : 16
II Diagenèse : 16
A Altération de la phase minérale : 16
B Altération de la phase organique : 18

Chapitre 3 : Microorganismes et altérations de la micro-structure de l'os **20**
I Altérations biochimiques : 20
A Facteurs environnementaux et biologiques : 20
B Premières altérations subies par un corps : 21
C Dégradation du tissu osseux : 21
II Caractérisation des attaques microbiennes : 24
A Les altérations d'origine fongique : 25
B Les altérations d'origine bactérienne : 26
C Expérimentations dans la littérature : 28

PARTIE II MATERIEL ET METHODES *31*

Chapitre 1 : Présentation du référentiel moderne **32**
I Corrosion du sol : 32
A Immersion des ossements dans des solutions à pH différents : 32
B Enfouissement des ossements dans des sols de nature différente : 33
II Altérations microbiennes en milieu contrôlé: 33
A Mise en culture : 34
B Enfouissement prolongé (2 ans) dans un sol forestier : 34
C Expérimentation d'ensemencements bactériens par le LRMH : 34

Chapitre 2 : Présentation des sites archéologiques et des vestiges osseux associés **36**
I Le site de Song Terus (Java, Indonésie) : 36
A Présentation du site : 36
B Présentation des échantillons: 38
II Le site de Bize-Tournal (Fance) : 40
A Présentation du site : 40
B Présentation des échantillons : 41

Chapitre 3 : Présentation des méthodes **45**

I Traitement des échantillons avant analyses : 45
II Microscopie électronique à balayage (MEB) : 45
A Principes de cette méthode : 45
B Description de l'histologie osseuse : 46
III Spectrométrie (PIXE) : 46
A Principes de cette méthode : 46
B Applications : 47

***PARTIE III : RESULTATS* 48**

Chapitre 1 : Le référentiel moderne 49
I Le référentiel moderne expérimental : 49
A Corrosion de surface : 49
B Porosités et fissurations : 52
C Altérations microbiennes : 53
D Différences d'altérations : 56
II Expérimentation d'ensemencements bactériens par le LRMH : 57

Chapitre 2 : Le site de Song Terus 59
I Histologie osseuse : 59
A Les ossements de la zone M8: 59
B Les ossements de la zone M10: 64
C Conclusion: 67
II Analyses élémentaires (PIXE): 68
A Concentrations en éléments : 70
B Comparaison MEB/PIXE : 71

Chapitre 3 : Le site de Bize-Tournal 73
I Histologie osseuse : 73
A Les ossements du niveau G : 73
B Les ossements du niveau H : 74
C Conclusion : 77
II Analyses élémentaires : 78
A Concentration en éléments : 80
B Comparaisons MEB/PIXE : 81

Chapitre 4 : Synthèse sur les modifications des ossements lors de la diagenèse 82

***Conclusion et perspectives* 84**

***Liste des illustrations* 86**

***Liste des tableaux* 91**

***Annexes* 92**

***Références bibliographiques* 102**

Introduction

Les processus intervenant au cours de l'histoire taphonomique affectent et biaisent l'état des vestiges archéologiques, et notamment les vestiges osseux. Les processus qui se produisent pendant la phase d'enfouissement (diagenèse osseuse), qui nous intéressent particulièrement dans le cadre de cette étude, peuvent affecter les fractions minérales et/ou organiques aux niveaux structural et chimique.

L'étude des phénomènes diagénétiques et des traces associées aux niveaux de la structure et de la composition élémentaire des ossements peut fournir de précieuses indications. Leur identification peut ainsi permettre de reconstituer l'histoire taphonomique et donc plus globalement, d'obtenir des informations sur les modes de mises en place des sites archéologiques ou paléontologiques. Ces phénomènes, relatifs à l'environnement sédimentaire dans lequel ils se produisent, peuvent également permettre de déterminer si les vestiges osseux sont plus susceptibles d'être conservés dans un environnement ou site particulier. Enfin, leur étude permet de déterminer si les vestiges, malgré des états d'altération plus ou moins avancés, sont potentiellement exploitables pour des analyses postérieures biomoléculaires, élémentaires et/ou isotopiques qui renseignent sur les comportements alimentaires, le climat, les datations, etc.

De nombreuses études se sont intéressées à ces processus diagénétiques (Fernandez-Jalvo *et al.*, 2010, Hedges *et al.*, 1995, etc.). En revanche, les altérations biologiques sont relativement peu documentées et les systèmes d'altérations microbiens encore difficiles à comprendre et à modéliser.
Dans le cadre de ce travail de Master, nous nous sommes ainsi particulièrement intéressés à la l'étude des différents types de faciès d'altération d'origine microbienne (bactériennes et fongiques) rencontrés sur des ossements archéologiques provenant des grottes de Song Terus (Java, Indonésie) et Bize-Tournal (France).

Au sein du large panel de méthodes ayant été mises en œuvre pour l'étude des processus taphonomiques, nous avons choisi d'utiliser la microscopie électronique à balayage (MEB) et la spectroscopie par émission de rayons X induits par un microfaisceau de particules chargées (microPIXE). Le MEB permet de visualiser les modifications induites pas les micro-organismes au niveau de la structure histologique des ossements, et ainsi de reconnaitre les faciès d'altération biologique. La méthode PIXE, permet de déterminer la composition élémentaire des échantillons osseux et de caractériser les modifications induites par les processus d'altération diagénétiques.

Enfin, un référentiel d'ossements modernes altérés expérimentalement a été réalisé afin d'identifier et de comprendre au mieux les altérations affectant les ossements anciens. L'établissement du référentiel

consiste à l'enfouissement et à l'immersion de fragments osseux dans différents types de milieux, dans le but de simuler et documenter des phénomènes tels que des attaques par des micro-organismes ou des phénomènes de corrosion dans le sol.

Dans ce travail de recherche, nous présenterons dans un premier temps l'organisation du système osseux et les différentes modifications taphonomiques qui peuvent l'affecter. Nous évoquerons, dans un second temps, les sites archéologiques et milieux artificiels d'où proviennent les ossements expérimentaux analysés. Et enfin, dans un troisième temps, les résultats obtenus seront décrits et discutés avant de conclure et de présenter les perspectives de ce travail.

PARTIE I : LE SYSTEME OSSEUX ET ALTERATIONS TAPHONOMIQUES

Chapitre 1 : Le système osseux

I Les os : caractéristiques générales

Les os sont formés de l'assemblage de plusieurs tissus : le tissu osseux, le périoste, le cartilage et la moelle osseuse (Baronne, 1999 ; Ruzon *et al*., 2005). Par sa structure composite et son hétérogénéité, le système osseux est multifonctionnel.

A Fonctions du système osseux :

Structurés par la combinaison de plusieurs tissus, les os sont durs et rigides, ce qui permet à la charpente osseuse de soutenir les tissus mous, de protéger les organes internes et de permettre le mouvement. Cette fonction mécanique est produite par les muscles qui prennent attache sur les os grâce aux tendons et agissent sur eux comme sur des leviers. Le tissu osseux a également une fonction homéostasique par sa capacité de réserve de substances minérales qui peuvent être puisées ou déposées par le sang pour maintenir une composition constante. De plus, les os, par le biais de la moelle osseuse, élaborent les cellules sanguines : c'est le processus d'hématopoïèse (Baronne, 1999, Tortora *et al*., 2007).

B Types morphologiques des os :

Dans la littérature, trois types d'os sont principalement distingués: les os longs, plats et courts (Baronne, 1999 ; Guay, 2005).

- Les os longs situés les membres, dont une des dimensions est plus grande que les autres, sont constitués d'un corps (ou diaphyse) et de deux extrémités (ou épiphyses). Les os allongés comme les clavicules et les côtes (ou os arqués) peuvent être inclus dans cette classe.
- Les os plats, minces et larges, se caractérisent par l'équivalence de deux des dimensions, longueur et largeur. Ils se rencontrent dans les ceintures, scapulaires et pelviennes, la face et le crâne.
- Les os courts se distinguent par des dimensions (largeur, longueur et épaisseur) à peu près égales. Ces os se retrouvent dans les extrémités des membres (carpes, tarses, doigts) et la colonne vertébrale.

Enfin, certains os dans l'organisme sont inconstants. Il s'agit des os suturaux, sésamoïdes et surnuméraires.

II Composante structurale des os :

La structure des os peut s'étudier à différentes échelles.

A Architecture du tissu osseux :

L'os au niveau macroscopique : Un os long adulte est constitué d'une diaphyse et de deux épiphyses. La diaphyse se caractérise par une structure osseuse compacte nommée os cortical. Elle est parcourue en son centre d'une cavité remplie de moelle. Les épiphyses sont constituées d'os spongieux appelé aussi os trabéculaire.

Les autres os (plats, courts et longs), quant à eux, sont seulement composés d'une mince couche d'os cortical sous laquelle prend place le tissu spongieux (cf. Fig. 1)

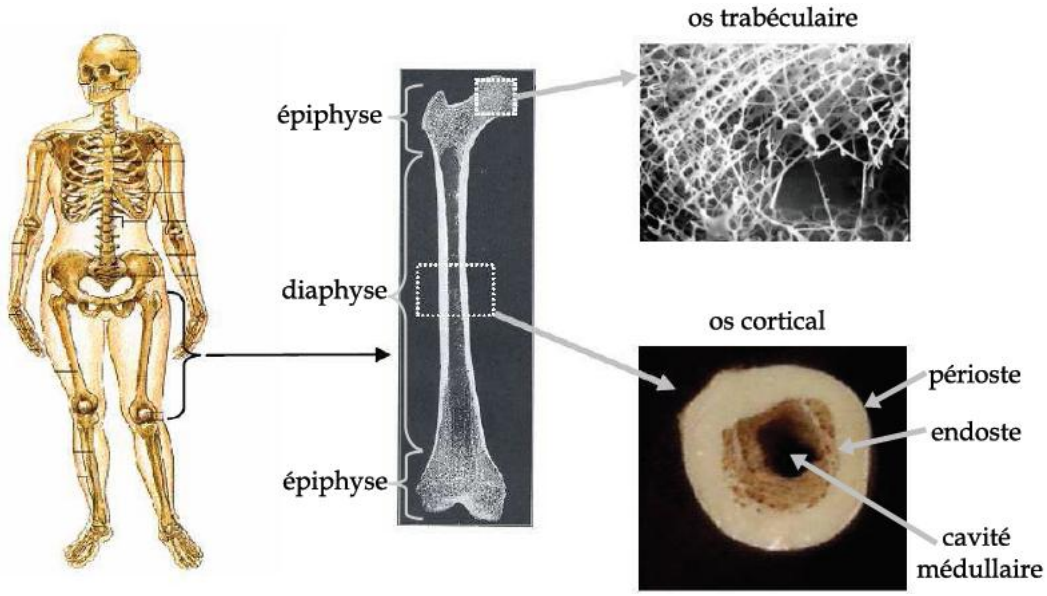


Figure 1 : L'os et ses différentes composantes (Sasso, 2008).

La formation du tissu osseux : Deux types principaux de tissus osseux sont reconnus : le tissu osseux primaire et le tissu osseux secondaire. Le tissu osseux primaire, se formant au début des étapes de l'ossification, est dépourvu de structure particulière. En effet, sa principale fonction est de servir de réserve minérale pour l'édification de l'os secondaire qui le remplacera rapidement. Le tissu osseux secondaire, qui retiendra par la suite toute notre attention, est ainsi constitué d'un assemblage de lamelles osseuses. L'os lamellaire le plus caractéristique est l'os cortical (Baronne, 1999).

L'os cortical au niveau microscopique : L'os cortical est constitué de plusieurs couches osseuses structurées différemment. De la partie externe à la partie la plus interne sont retrouvés : le périoste, membrane fibreuse recouvrant la majorité de l'os, la zone intra-corticale qui constitue la zone médiane de l'os et l'endoste, enveloppe interne de l'os cortical (An & Martin, 2003) (cf. Fig. 2).

Ces différentes couches osseuses sont caractérisées par des systèmes lamellaires distincts :

Sous le périoste, de larges lamelles d'os périostal, ou lamelles externes, sont disposées concentriquement et parallèlement à la surface externe de l'os. Située au plus près de la cavité

médullaire se trouve la couche de lamelles internes, constituées de lamelles concentriques et irrégulières, fabriquée par la moelle. Entre ces deux couches précédentes se trouve le système de Havers (cf. Fig. 3).

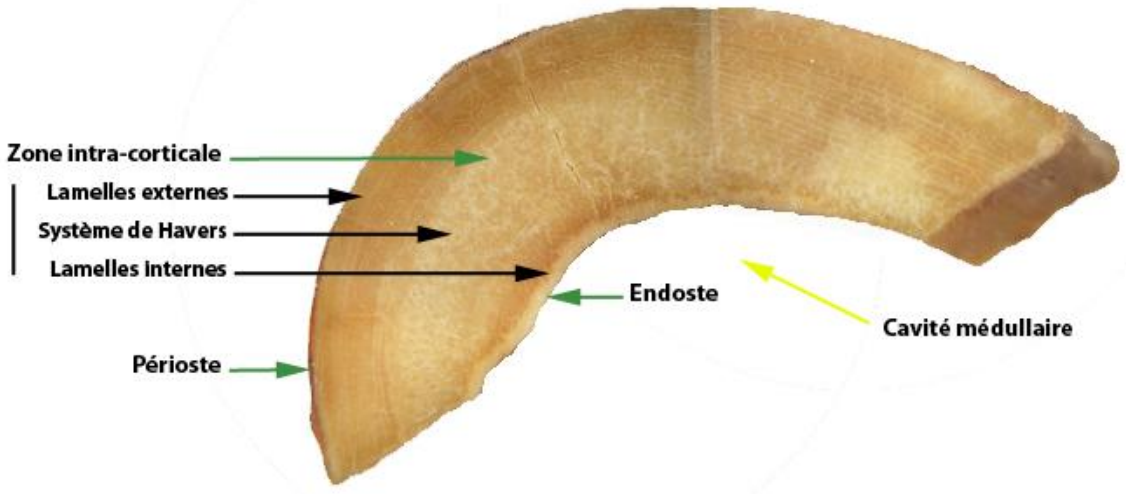


Figure 2 : L'os cortical et sa structure (BZ2011-05).

Le système de Havers est composé d'unités microscopiques cylindroïdes, ou ostéons (cf. Fig. 3) jointes les unes aux autres de façon à peu près parallèle. Chaque ostéon est constitué d'un canal central, ou canal de Havers, de section plus ou moins ovoïde (30 à 40 µm de diamètre) et de lamelles osseuses. Les canaux de Havers sont occupés par des fibres nerveuses et capillaires et sont reliés entre eux par d'étroits canaux perforants, appelés canaux de Volkmann. Autour du canal central, la matrice osseuse est disposée en lamelles concentriques, entre lesquelles des petites cavités, ou lacunes, s'observent. Ces dernières contiennent des ostéocytes, anciens ostéoblastocytes à l'origine de l'ostéification. Les ostéocytes s'irradient en prolongements cytoplasmiques au niveau des canalicules leur permettant de s'unir aux lacunes voisines.

Les ostéons sont délimités à leur périphérie par une fine couche, appelée cément, fortement minéralisée et dépourvue de collagène. Cette dernière marque la limite atteinte par l'ostéon lors de son édification. Enfin, entre les ostéons, des lamelles interstitielles subsistent ; elles correspondent aux vestiges d'ostéons plus anciens détruits par l'ossification secondaire (Baronne, 1999 ; Olszta *et al.*, 2007) (cf. Fig. 4).

L'existence d'un os lamellaire peut être une indication de l'âge de l'individu. Le compte des ostéons, plus particulièrement, pourrait permettre une estimation de l'âge chez les adultes les plus jeunes (Jackes *et al.*, 2001).

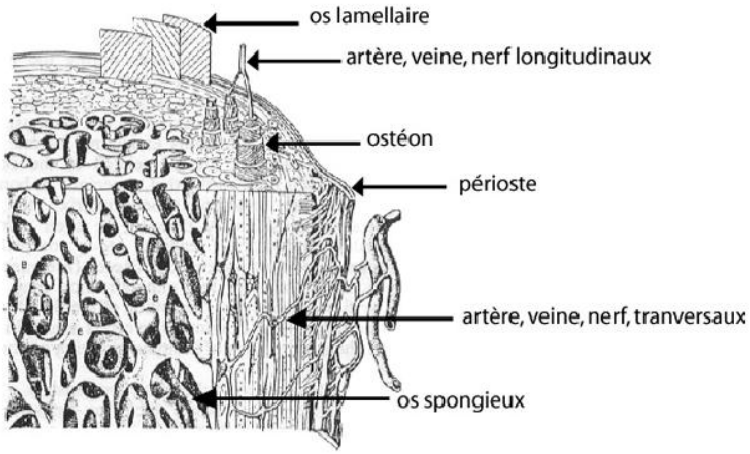


Figure 3 : Représentation de la structure d'un os long (Baronne, 1986).

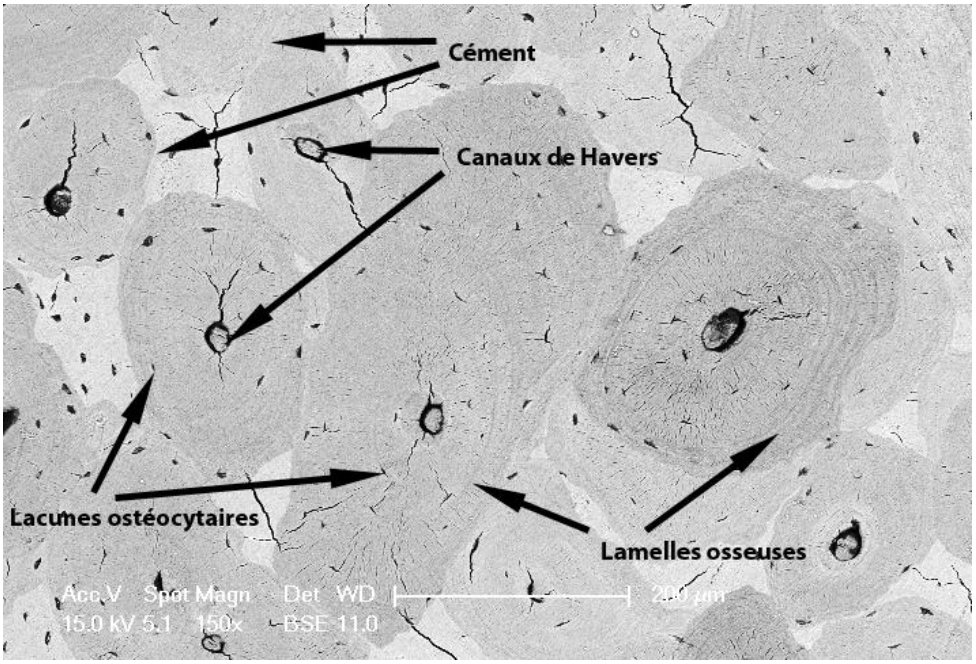


Figure 4 : Photographie MEB (échantillon moderne témoin, 200 µm) ; figuration des canaux de Havers, lamelles osseuses, lacunes ostéocytaires et ligne de cément ; ostéons interstitiels entre les ostéons.

L'os trabéculaire au niveau microscopique : L'os trabéculaire est constitué d'ostéons courts, dilatés et irréguliers dont les cavités centrales sont plus ou moins communicantes. Les lamelles d'ostéons adjacents s'unissent pour former les trabécules osseuses (Baronne, 1999).

Les processus diagénétiques se répercutent fortement sur la structure histologique comme nous le verrons dans les chapitres suivants. L'histologie a également d'autres intérêts notamment dans la distinction des espèces animales ou déterminer si le fragment squelettique est d'origine humaine ou animale (Hillier *et al*., 2007).

B Matrice extracellulaire osseuse :

La matrice extracellulaire de l'os est composée d'une phase organique (20-30% du poids sec de l'os) et d'une phase minérale (60-70% du poids sec de l'os) intimement liées. L'os contient un troisième constituant : l'eau à hauteur de 10% du poids d'un os (Reiche, 2002 ; Olszta *et al.*, 2007).

La phase organique: La phase organique confère à l'os son élasticité. Elle est constituée à 90% de collagène de type I et de divers protéines non-collagéniques (glycoprotéines, protéoclycanes, etc .), lipides, enzymes, carbohydrates et hormones (Plate, 1994 ; Pate, 1998 ; An & Martin, 2003).
Le collagène de type I est une protéine constituée de trois chaines polypeptidiques : deux chaines α1 et une chaîne α2 qui s'organisent en une triple hélice (tropocollagène). L'association de plusieurs molécules, de façon parallèle, formera des fibrilles et l'assemblage de ces dernières des fibres. (Collins *et al.*, 1995 ; Olszta *et al.*, 2007 ; Lebon, 2008 ; Nehlich *& Richards*, 2009 ; Fratzl, 2008). Les fibres s'organisent parallèlement pour former les lamelles osseuses (cf. Fig. 5).

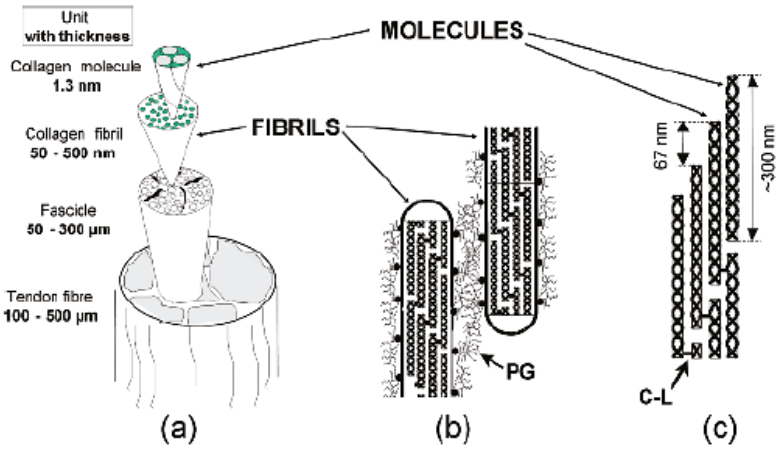


Figure 5 : Figuration de la structuration des molécules de collagène au sein des fibres (Fratzl, 2008), où (a) représente les différents niveaux d'insertion de la molécule de collagène et où (b) et (c) illustrent les interactions entre fibrille et molécules.

La phase minérale : La phase minérale permet à l'os d'être rigide. Elle est composée de phosphate de calcium plus ou moins carbonaté et appartient à la famille des apatites (Trueman & Martill, 2002). Elle dérive par substitution de l'apatite phosphocalcique ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) qui porte aussi le nom d'hydroxyapatite (HAP). Cette dernière se présente sous forme de cristaux qui ont la particularité d'être extrêmement petits (50 nm x 25 nm x 2,5 nm) (Weiner et Traub in Lebon, 2008).

La phase minérale a la caractéristique d'être mal cristallisée (Person *et al.*, 1995) et de contenir de nombreuses impuretés qui peuvent se substituer aux groupements Ca^{2+}, PO_4^{3-} ou OH^- (Na^+, K^+, Mg^{2+}, HPO_4^{2-}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, Pb^{2+}, etc.) (Reiche *et al.*, 2002).

La molécule d'hydroxyapatite peut évoluer en stabilité lorsque les carbonates se substituent aux groupements phosphates et/ou aux groupements hydroxyles. Les carbonates, lorsque leur concentration est importante, agissent en diminuant la taille et en modifiant la forme des cristaux (Legeros, 1981 in Lebon, 2008).

Liens phases organique/minérale : Les phases minérale et organique sont intimement associées. La première renforce et protège la seconde.

Des cristaux d'hydroxyapatite de formes irrégulières se déposent dans les espaces formés par le réseau des molécules de collagène. Les cristaux croissent préférentiellement dans le sens de la longueur des molécules de collagène et leurs faces sont approximativement parallèles entre elles (cf. Fig. 6 et 7) (Olszta *et al.*, 2007 ; Lebon, 2008).

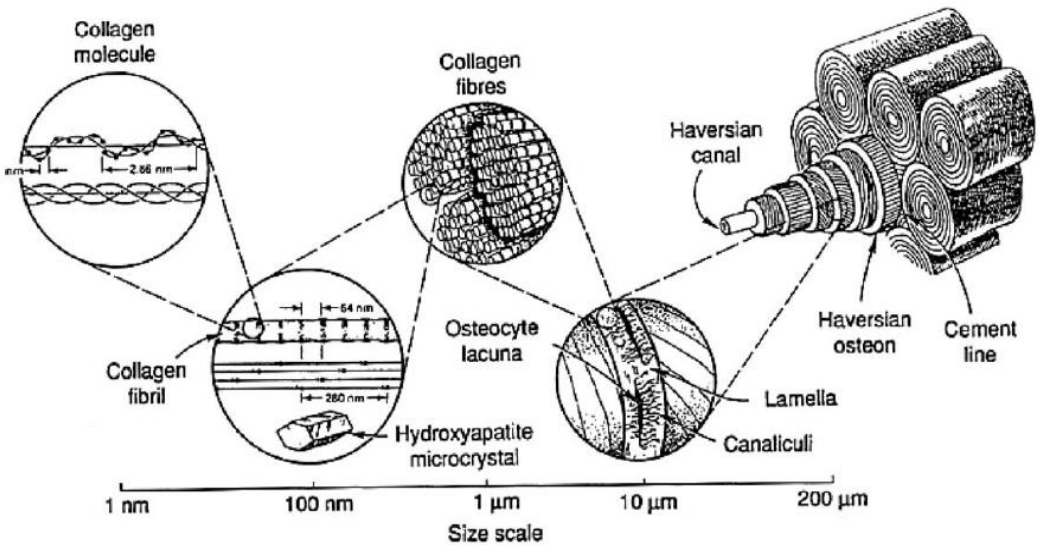


Figure 6 : Illustration de l'organisation du système de Havers à différentes échelles (Katz *et al.*, 2006).

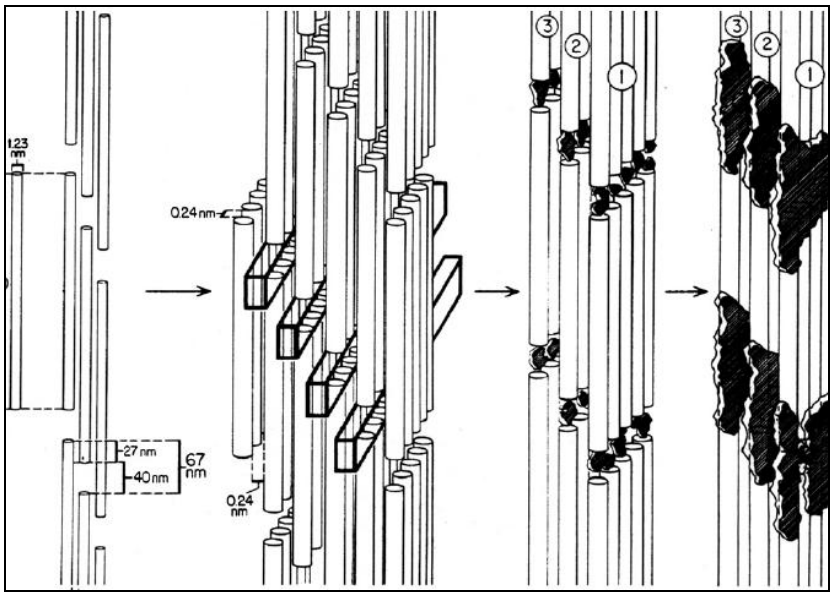


Figure 7 : Illustration de l'organisation des fibrilles de collagène et leur minéralisation progressive (Olszta *et al.*, 2007). Chaque tube représente une molécule de tropocollagène, les mesures associées sont les distances inter-moléculaires.

Chapitre 2 : Processus d'altération taphonomique

Le terme « taphonomie » a été créé et défini par le paléontologue russe Efremov en 1940. Il provient des mots grecs *taphos* (enfouissement) et *nomos* (lois).
Il s'agit de l'étude des restes animaux qui résultent du passage biosphère/lithosphère. Ainsi, la taphonomie se concentre sur l'histoire *post-mortem* (pré-enfouissement ou biostratinomie, enfouissement, et post-enfouissement ou diagenèse) des vestiges (Lyman, 1984). Ces trois étapes qui constituent l'histoire taphonomique sont distinctes par leurs agents, processus et par conséquent par les traces retrouvées à la surface des vestiges.
Ainsi, la taphonomie est une donnée importante puisqu'elle affecte et donc biaise l'état et la fréquence des vestiges. Son étude et sa compréhension permettent non seulement une meilleure compréhension des contextes archéologiques et paléontologiques, mais permet aussi d'évaluer le potentiel des vestiges, dont les altérations pourraient interférer avec des analyses postérieures sur les biomolécules, les compositions élémentaires et isotopiques (Lyman, 1984).

L'ensemble des processus taphonomiques peuvent se synthétiser en trois dimensions : l'objet, l'espace et l'aspect transformation. Tout d'abord, la dimension objet est constituée de trois catégories : les vestiges sont ajoutés, enlevés d'un assemblage ou maintenus en position (addition, soustraction, maintien). La dimension spatiale, quant à elle, inclut le mouvement ou la staticité des vestiges. Enfin, la dimension transformation, implique que l'objet soit modifié (fragmenté, chauffé, etc.) ou conservé dans son intégrité (Lyman, 1984). Dans ce travail de master, nous nous sommes essentiellement concentrés sur cette dimension transformation.

I Biostratinomie et enfouissement :

A La biostratinomie :

La carcasse ou les tissus squelettiques initiaux subissent de nombreuses transformations avant l'enfouissement. Plusieurs grandes catégories se dégagent : la squelettisation, qui consiste en la disparition des tissus mous par l'action d'animaux tels que les carnivores, les insectes, les microorganismes, la désarticulation, la dispersion (fluviatile, anthropique, animale), l'accumulation, les actions anthropiques (fracturations, broyage, chauffages, traces de boucheries, traces technologiques, etc.), les actions naturelles (abrasion, intempérisation, minéralisation, dissolution, coloration, etc.) et animales (rongements, griffages, fracturations, piétinements, digestion, etc.) (Lyman, 1984 ; Andrews & Cook, 1985 ; Denys, 2002 ; Fernandez-Jalvo *et al*., 2002).

B L'enfouissement :

Deux étapes majeures sont distinguées : la déposition et la sédimentation. Les os, par divers processus, se retrouvent parfois enfouis de plus en plus profondément, et subissent ainsi l'accroissement du poids de la couverture sédimentaire. Ainsi, selon le degré d'altération diagénétique des vestiges, les ossements seront plus ou moins sensibles aux pressions physiques s'exerçant. Ces pressions entraîneront de multiples déformations et fracturations. D'autres phénomènes influent également sur la préservation des vestiges comme l'action des racines et des animaux, ou encore la perméabilité et la nature chimique des sédiments.

Les processus de sédimentation modifient la distribution spatiale des vestiges par des dispersions verticales et/ou horizontales plus ou moins prononcées (Lyman, 1984 ; Fernandez-Jalvo *et al*., 2002).

Ces deux étapes de l'histoire taphonomique ne doivent pas être négligées car l'altération des surfaces externes peut se répercuter au niveau de la structure osseuse sous la forme de traces et de modifications de la composition chimique des ossements, et donc influencer les transformations post-enfouissement.

II Diagenèse :

Le terme « diagenèse », défini initialement en géologie, correspond aux processus menant à la transformation des dépôts sédimentaires (Foucault *et al.*, 1988 ; Lyman, 1984). Appliquée aux vestiges osseux, la diagenèse implique l'ensemble des phénomènes physico-chimiques et biologiques qui peuvent affecter le tissu osseux au niveau structural et chimique (Reiche, 2000).

Les processus diagénétiques sont régis par un certain nombre de facteurs intrinsèques, liés aux propriétés du matériau (taille du spécimen, porosité, structure moléculaire et chimique), et extrinsèques liés aux propriétés du milieu (pH du milieu sédimentaire, régimes hydriques et de température, activité microbienne, etc.) (Lyman, 1984, Sasso, 2008). Les transformations osseuses causées par les microorganismes seront plus longuement évoquées dans la partie suivante.

Les phases minérales et organiques de l'os seront plus ou moins affectées par les divers processus diagénétiques.

A Altération de la phase minérale :

Enrichissement en constituants exogènes:

Enrichissement et phénomènes d'absorption et de substitution : Le tissu osseux peut être sujet à des enrichissements en éléments provenant du milieu environnant. Il s'agit entres autres du carbone, soufre, aluminium, potassium, manganèse, fer, cuivre, baryum, plomb, uranium, fluor et du chlore (Reiche, 1999).

Certaines espèces chimiques seront absorbées à la surface des cristaux d'hydroxyapatite carbonatées. Cette absorption se fait par un échange entre les ions situés au niveau de la couche hydratée superficielle des cristaux et les espèces chimiques présentes dans l'eau interstitielle (Fe^{3+}, Pb^{2+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Sr^{2+}, CO_3^{2-}, F^-, UO_2^{2+} etc.). Après cette étape d'absorption, certains éléments (Pb^{2+}, Sr^{2+}, F^-, CO_3^{2-}, etc.) peuvent être incorporés au sein même des cristaux par des phénomènes de diffusion et de substitution. (Reiche, 2000).

Enrichissement et formation de nouvelles phases minérales : La structure poreuse de l'os peut recevoir des inclusions minérales tels que la calcite, le quartz, les oxydes de manganèse, les aluminosilicates, etc. (Lambert *et al.*,1984 in Reiche, 2000). Certaines substances peuvent secondairement précipiter. La calcite, par exemple, provient de la précipitation du carbonate de calcium des eaux d'infiltration. De plus, dans des conditions oxydantes et sèches, des précipitations de fer et de manganèse se retrouvent dans les pores sous la forme de dépôts noirs ou bruns. Certains microorganismes pourraient favoriser ces dépôts d'oxydes métalliques (Lopez-Gonzales *et al.*, 2005).

<u>Appauvrissement et processus de dissolution-recristallisation:</u>

Altération par lixiviation: La lixiviation correspond à la percolation de l'eau à travers le sédiment. Elle s'accompagne de phénomènes de dissolution qui entrainent la perte de la phase minérale du tissu osseux (Reiche, 2000). La dissolution peut éventuellement débuter avant l'enfouissement de l'os sous l'effet des acides organiques et carboniques produits par les tissus lors de leur décomposition (Plate, 1994).

Un équilibre relatif entre le matériel osseux et l'environnement extérieur tend à s'établir. En effet, si la composition chimique du tissu squelettique diffère de celle de la matrice sédimentaire, l'os tendra à perdre des éléments chimiques (dont il est riche) et en gagner d'autres (dont il est pauvre) (Lyman, 1984).

Les processus de dissolution de la phase minérale dépendent de différents facteurs dont:

- Le pH du sédiment environnant : La solubilité de la phase minérale de l'os est minimale à pH légèrement basique (pH8). Lorsque le pH est inférieur à 7, les ossements sont susceptibles d'être complètement atteints par les phénomènes de dissolution (Berna *et al.*, 2004).
- La température du milieu : La dissolution est plus importante à température plus élevée.

- La composition et la cristallinité du matériau osseux : Certains ions absorbés ou substitués inhibent (aluminium, fluor, etc.) ou catalysent (carbonate, cadium) la dissolution. De plus, une apatite sera d'autant plus soluble qu'elle contraindra plus de carbonates. Une apatite mal cristallisée sera ainsi plus soluble qu'une apatite bien cristallisée (Reiche, 2000).

Les éléments minéralogiques résultants de la dissolution peuvent être lessivés par les eaux d'infiltration (Lyman, 1984).

Recristallisation : La phase minérale dissoute peut subir des processus de recristallisation isomorphe ou hétéromorphe.

Selon les conditions chimiques du milieu (composition chimique, température, pH) les phases cristallines se transforment en phases thermodynamiquement plus stables telles que l'hydroxyapatite ou la fluorapatite. Le pH est déterminant dans la formation de nouvelles phases : concernant les phosphates, il est constaté que la brushite se forme entre 4,5 et 6,0, l'octacalciumphosphate entre 6,0 et 7,0 et l'hydroxyapatite entre 7,0 et 7, 5 (Reiche, 2000).

La recristallisation engendre des modifications de la taille et de la morphologie des cristaux qui se traduisent par une augmentation de la cristallinité de la phase minérale. Cette augmentation réduit le rapport surface/volume des cristaux et par conséquent entraîne une baisse de leur surface d'échange et de leur solubilité (Berna *et al.*, 2004). Les modifications de la phase minérale de l'os et notamment de l'apatite sont, semble-t-il, accélérées pendant et après la décomposition de la matière organique (Price *et al.*, 1992). Cela peut être expliqué par la présence du collagène qui fournit, en effet, une protection aux cristallites d'apatite (Trueman & Martill., 2002).

Altérations biochimiques:

Les activités microbiennes peuvent agir sur la dégradation de la fraction minérale. Les microorganismes peuvent, en effet, avoir une action de catalyseur et modifier les conditions géochimiques telles que le pH. Ce type d'altération sera détaillé plus longuement dans la partie suivante.

B Altération de la phase organique :

Un certains nombre de biomolécules, lipides, peptides et acides nucléiques sont susceptibles d'être conservées au sein de l'os. Cependant, les molécules solubles dans l'eau auront tendance à être rapidement lessivées (Hedges *et al.*, 1995).

Deux processus principaux sont à l'origine de la perte du collagène. Il s'agit de l'hydrolyse, et de la dégradation de la fraction minérale sous tendant la biodégradation.

Hydrolyse : L'hydrolyse correspond à la coupure hydrolytique des liaisons peptidiques entre les différents acides aminés qui constituent les protéines. La fragmentation de ces chaînes polypeptidiques, rendant les molécules plus solubles, facilite leur lessivage.
Certains milieux sont propices à la préservation de la phase organique comme les milieux immergés et arctiques. De plus, plus le pH et la température seront élevés, plus la dégradation du collagène sera importante. La fraction minérale aurait tendance à tamponner les pH élevés ; ainsi, la dégradation du collagène sera d'autant plus importante que l'altération de la phase minérale est avancée.
La simple dégradation chimique (hydrolyse) du collagène engendrerait des ossements avec une histologie très bien préservée (Lyman, 1984 ; Collins *et al.*, 1995, 2002 ; Dobberstein *et al.*, 2009 ; Harbeck & Grupe, 2009).

Biodégradation par la perte de la phase minérale : La dégradation de la fraction minérale entraîne l'ouverture de voies d'accès vers le collagène accélérant ainsi la prolifération bactérienne et la dégradation chimique (Nielsen-Marsh *et al.*, 2000 ; Trueman & Martill, 2002).

La perte de la matière organique se traduit pas une augmentation de la porosité osseuse (Trueman & Martill, 2002 ; Hedges, 1995 et 2002).

Ainsi, il a pu être constaté que la structure osseuse est sujette à de multiples modifications pendant la diagenèse.

Chapitre 3 : Microorganismes et altérations de la micro-structure de l'os

Parmi les nombreux micro-organismes existants (protozoaires, champignons, bactéries, virus et prions), seules bactéries et champignons, par le biais des traces qu'ils laissent dans les structures osseuses, seront étudiés dans le cadre de cette étude. En effet, l'os constitue un milieu nutritif de choix pour ces microorganismes et sera ainsi l'objet de multiples altérations.

I Altérations biochimiques :

A Facteurs environnementaux et biologiques :

Quand le milieu est favorable, les microorganismes interviennent dès la mort de l'individu et ce jusqu'à ce qu'ils ne puissent plus subvenir à leur besoins nutritifs.

Différents facteurs environnementaux et biologiques interfèrent avec le développement des microorganismes :

La température : La dégradation des tissus sera plus importante si l'individu n'est pas enfoui immédiatement après sa mort. En effet, la croissance des microorganismes sera inhibée par les basses températures de l'environnement sédimentaire (Child, 1995). Les températures inférieures à 4°C empêchent notamment la croissance des bactéries (Janaway, 1990 ; Lyman, 1984).

L'hydrométrie : Les sites bien drainés, ainsi que les alternances humidité/sécheresse des sols, tendent à accélérer la perte des matériaux solubles ce qui, par conséquent, ouvrent les tissus pour les activités microbiennes. Les champignons, presque tous aérobiques, ne sont ainsi pas retrouvés dans les sols gorgés d'eau. Les altérations microbiennes sont, en revanche, réduites lorsque les sols sont secs (Nicholson, 1996).

La nature, le pH du sol et les inclusions minérales : Les sols acides sont favorables à la décomposition des tissus au contraire des sols alcalins qui tamponneront les acides microbiens. Cependant, la plupart des microorganismes, sauf quelques espèces fongiques, ne supportent pas les sols très acides (pH<4-5). Ils seront, au contraire, plus fréquemment nombreux dans des sols dont les ph sont compris entre 6 et 7,5 (Nicholson, 1996).

La présence de métaux lourds dans le sol et les conséquences qu'ils peuvent avoir sur les populations microbiennes est encore un sujet à forte controverse (Davet, 1996). La présence d'ions métalliques en excès, comme le cuivre (Child, 1995 ; Müller *et al.*, 2011) peut avoir des effets inhibiteurs sur la

croissance de certains microorganismes. D'autres substances comme l'ammoniac, au contraire, peut stimuler certaines bactéries (Davet, 1996).

-*Les interactions microbiennes :* De nombreux microorganismes génèrent des sous-produits métaboliques qui inhibent les autres microorganismes y compris ceux de la même espèce (Child, 1995). Les espèces fongiques ont la capacité de se développer dans des sols à pH varié ; mais dans des sols à pH neutre ils seront inhibés par les bactéries qui produisent des métabolites toxiques pour les champignons. Les espèces fongiques seront ainsi davantage retrouvées dans les environnements acides (Hanson & Buikstra, 1987 ; Child, 1995).

Pression du sol, entrainement vertical par les pluies, composés volatils émis par les débris végétaux sont d'autres facteurs, rarement évoqués, qui limitent les microorganismes (Davet, 1996).

B Premières altérations subies par un corps :

Une fois l'individu mort, la destruction biogénique prend place. Le corps se dégrade à la fois à l'intérieur et à l'extérieur par différents processus.

A l'extérieur de l'individu, la dégradation des tissus mous impliquent de nombreux organismes (vertébrés et insectes nécrophages, arthropodes, bactéries aérobiques et champignons (Lyman, 1984 ; Piepenbrick, 1986 ; Nicholson, 1996). Les processus de putréfaction engendrent une diminution de l'oxygène provoquant le remplacement progressif des bactéries aérobiques par des bactéries anaérobiques (Janaway, 1987 in Nicholson, 1996 ; Child, 1995).

Parallèlement, l'intérieur du corps est dégradé par des bactéries indigènes anaérobiques provenant des viscères abdominales et thoraciques. Cette décomposition engendre la production d'acides organiques qui peuvent déminéraliser l'os environnant (Lyman, 1984 ; Janaway, 1985 in Nicholson, 1996 ; Child, 1995).

Parallèlement à l'action des organismes, le corps s'autodégrade par autolyse enzymatique. Quand une cellule meurt, des enzymes autolytiques sont libérées engendrant une accélération des processus de dégradation du tissu (Child, 1995 ; Nicholson, 1996). De plus, l'autolyse a pour effet d'augmenter les voies d'accès pour les microorganismes. (Child, 1995).

Quand les tissus mous ont disparu, la dégradation chimique continue d'attaquer la fraction minérale exposant ainsi la fraction organique aux microorganismes (Nicholson, 1996).

C Dégradation du tissu osseux :

Les différentes étapes d'altérations du tissu osseux sont décrites ci-dessous.

Pénétration des microorganismes dans l'os :

Les bactéries pénètrent dans toutes les parties de l'os par les porosités naturelles, canalicules et lacunes ostéocytaires (Baud, 1986). Quelque soit le type de destruction histologique, l'invasion de l'os par les microorganismes se déroule sensiblement de la même façon. Elle débute à la fois sur les surfaces extérieures et intérieures de l'os cortical, et s'étend alors à travers le milieu du cortex. Les microorganismes suivent les canaux vasculaires et le tissu osseux se remplit progressivement d'altérations (Hackett, 1981).

Liens phases minérales/organiques :

Les deux fractions minérales et organiques de l'os sont intimement liées. Les microorganismes croissent dans l'os grâce à l'ingestion de matière organique par la production d'exoenzymes spécifiques, les collagénases. Il semblerait que la taille des enzymes microbiennes excèderait la taille des espaces inter-cristallins. Par conséquent, les enzymes seraient incapables d'accéder au collagène des os pleinement minéralisés. L'accès au collagène est rendu possible lorsque la phase minérale est altérée et notamment lorsque celle-ci est mise en solution.

De plus, il est constaté que les lignes de cément et les parois des canaux de Havers, très minéralisées, sont fuies par les microorganismes. Ces zones sont moins appropriées pour l'implantation microbienne que l'os haversien qui est perforé de nombreux espaces vasculaires (Collins *et al.,* 1995 ; 2002 ; Child *et al.,* 1993 ; Child, 1995 ; Nielsen-Marsh *et al.,* 2000 ; Trueman & Martill., 2002).

Ainsi, les relations qu'entretiennent les phases minérales et organiques sont inhérentes à l'appréhension des processus d'implantations et d'extensions des attaques microbiennes.

Dégradation de la phase minérale :

Les microorganismes sont un facteur important de dégradation du tissu osseux en contribuant notamment à la modification des conditions géochimiques du milieu.

Production de métabolites : Les processus de transformation du tissu osseux par les microorganismes produit entre autres, des acides, des acides gras, des composés sulfurés, des amines, de l'ammoniac ce qui entraîne des acidifications locales (Davet, 1996). La croissance et l'extension des colonies seront limitées, voire stoppées par l'acidité excessive provoquée par les accumulations de déchets métaboliques. Ces derniers pourront être lessivées postérieurement plus loin et ainsi encourager la reprise de la croissance des colonies et donc de l'altération de l'os (Hackett, 1981 ; Molleson, 1990).

Par ces modifications des conditions du milieu, les microorganismes provoquent des solubilisations et de reprécipitations de la fraction minérale (Stoklasa, 1900 et 1903 in Baud, 1986 ; Brady *et al*., 2008).

L'altération résultante de l'hydroxyapatite entrainera la formation de nouvelles phases minérales, comme la brushite, qui causeront la destruction mécanique de l'os par la fragmentation des structures lamellaires (Hanson & Buikstra, 1987).

Etapes de la dégradation de la phase minérale : La phase minérale, altérée par les microorganismes, est sujette aux phénomènes d'humidité qui, par les porosités, provoquent des enlèvements et des dépôts minéralisés (Hackett, 1981) décrits ci-dessous. La dégradation de l'os débute par une série de points (foci) éparses de déminéralisation causées par les métabolites microbiens qui se diffusent plus ou moins profondément dans le tissu environnant (Hackett, 1981 ; Piepenbrick, 1986 ; Nicholson, 1996 ; Collins *et al*., 2002). Les foci initiaux fusionneront petit-à-petit jusqu'à former de larges nappes d'os déminéralisé pouvant conduire à la disparition complète de la structure interne par un effacement des lamelles et des ostéocytes (Hanson & Buikstra, 1987).
Les dépôts provenant du minéral osseux, préalablement déminéralisés, ainsi que les minéraux du milieu extérieur amenés par l'humidité peuvent reprécipiter et former des zones et limites hyperminéralisées (Hackett, 1981 ; Collins *et al*., 2002).
Un troisième type d'altération (Hedges *et al*., 1995) est constitué par des zones ovalaires irrégulières (environ 5 à 40 µm) où la structure osseuse n'est plus visible car remplacée par une masse inorganique ou nodule (ou « hypermineralized destructive foci » selon Bell, 1990). Cela correspondrait à l'apparition de nouvelles populations de cristaux (Baud, 1986). Des auteurs parlent à ce sujet de contenu granuleux. Des études, sur la composition de ces contenus, indiquent qu'ils contiennent du phosphate de calcium ou du carbonate de calcium provenant de la matrice osseuse et d'autres phosphates et carbonates du sol environnant. Ces corps granuleux n'auraient en fait pas encore progressé dans leur développement de l'étape d'incorporation de calcium (Salomon & Hass, 1967).

Des déminéralisations secondaires peuvent également se produire par la perte du contenu des foci et des zones hyperminéralisées.

Quand le tissu osseux est complètement altéré, seules quelques petites aires triangulaires d'os restent intactes et sont progressivement dégradées à leur tour. La phase finale de l'altération de l'os consiste en la subsistance d'étroits anneaux osseux hyperminéralisés (Hackett, 1981) (cf. Fig. 8).

Les différents processus d'altération du tissu osseux ont pour conséquence une modification de la porosité osseuse favorisant ainsi les interactions entre les composés chimiques contenus dans l'eau et l'os (Hedges *et al*., 1995 ; Turner-Walker & Syversen, 2002 ; Müller *et al.*, 2011).

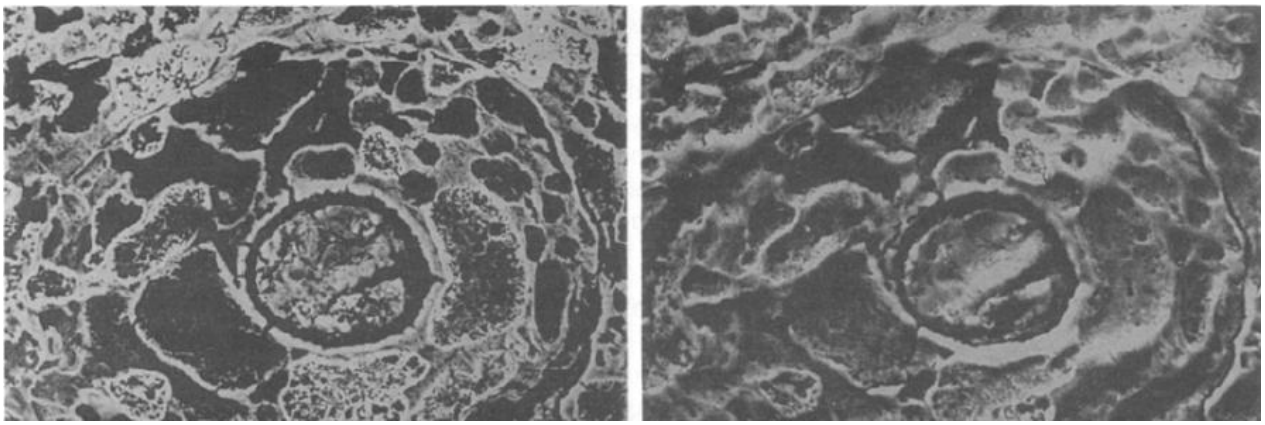


Figure 8 : Photographies MEB : Altération avancée d'un ostéon. Gauche : zones déminéralisées et hyperminéralisées. Droite : image topographique, les zones claires sont basses et donc déminéralisées contrairement aux zones foncées qui sont hyperminéralisées (Bell, 1990).

Dégradation du collagène :

Deux types d'enzymes microbiennes peuvent être responsables de la détérioration du collagène osseux. Il s'agit des collagénases et des protéases.

Les collagénases microbiennes hydrolysent la triple hélice du collagène et la séparent à de multiples endroits en courts peptides. Le collagène osseux, insoluble sous des conditions environnementales normales, est désormais facilement lessivé accélérant ainsi sa disparition (Child, 1995 ; Nicholson, 1996 ; Trueman & Martill, 2002 ; Smith *et al*., 2002).

Les protéases, ou enzymes protéolytiques, sont des enzymes qui s'attaquent aux protéines en poursuivant la dégradation des polypeptides courts issus de l'action des collagénases.

La perte de phase organique provoque le rétrécissement du tissu restant et engendre ainsi la formation de fissures (Piepenbrick, 1986).

Ces différents processus de dégradation de l'os provoquent des altérations caractéristiques.

II Caractérisation des attaques microbiennes :

Il est suggéré que chaque type de modification peut être la conséquence de l'action d'organisme spécifique qui reflèteraient ainsi la composition des populations microbiennes du sol (Hackett, 1981 ; Nicholson, 1996). Les auteurs distinguent les canaux de type Wedl, les canaux linéaires longitudinaux (« Linear Longitudinal tunnels »), les canaux en forme de bourgeon (« Budded tunnels ») et les foci lamellaires (« Lamellate foci ») (cf. Fig. 9). Les champignons semblent être à l'origine des canaux de

type Wedl et notamment le *Mycelites ossifragus* (Hackett, 1981 ; Trueman & Martill, 2002). Les trois derniers types de canaux sont plus généralement attribués à l'action de microorganismes bactériens (Hackett, 1981 ; Bell, 1990, Bell *et al*., 1996 ; Child, 1995).

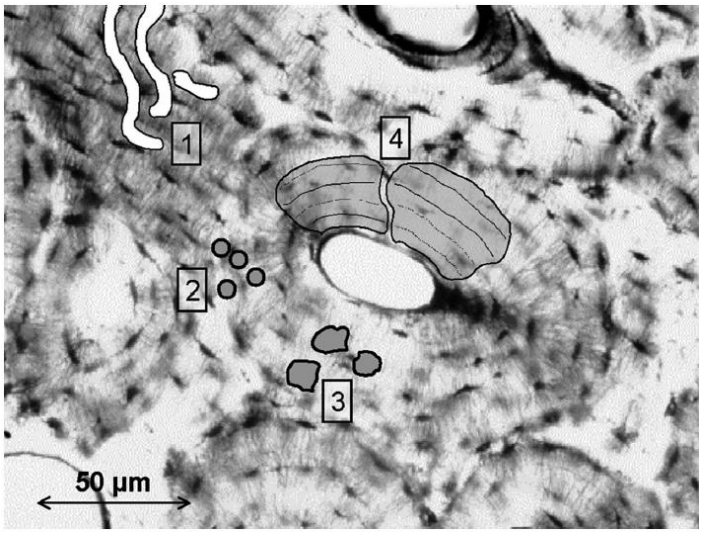


Figure 9 : Photographie MEB : Illustration des quatre types d'altération décrites par Hackett (1981). 1 : Canaux de type Wedl ; 2 : Canaux « linear longitudinal » ; 3 : Canaux de type « budded » ; 4 : Canaux lamellaires (Jans *et al.*, 2004).

A Les altérations d'origine fongique :

Les canaux de type Wedl ont été décrits pour la première fois par l'auteur de même nom, Wedl, qui en 1864, décrit les modifications causées par les microorganismes sur le tissu osseux. Ils correspondent à des canaux de 5 à 10 µm qui peuvent se ramifier et qui ne suivent jamais de trajectoire régulière ni longitudinale (cf. Fig. 10 ; Hackett, 1981).

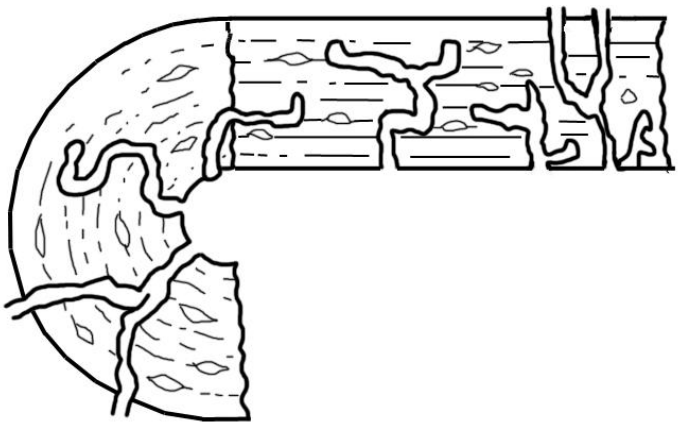


Figure 10 : Représentation des canaux de type Wedl, sections transversales (partie gauche de l'os) et longitudinales (partie droite de l'os) (D'après Hackett, 1981).

Trueman & Martill (2002) décrivent deux types de canaux de type Wedl qu'ils observent presque exclusivement dans des ossements fossiles (cf. Fig. 11).

Le premier de type Wedl observé, se caractérise par des canaux relativement simples d'un diamètre compris entre 10 et 15 µm. Ce type, concentré sur les marges extérieures de l'os, se limite souvent à de simples canaux ou à des ramifications non complexes. Ces canaux ne semblent en aucun cas contrôlés ou affectés par la micro-structure osseuse puisqu'ils peuvent facilement traverser les limites des ostéons.

Le deuxième de type Wedl se définit par des canaux de forage plus fins, d'environ 5 µm de diamètre, qui forment des réseaux beaucoup plus complexes et qui s'étendent des canaux haversiens aux ostéons adjacents. Les auteurs ajoutent que ces canaux ne sont pas non plus affectés par les lignes de cément.

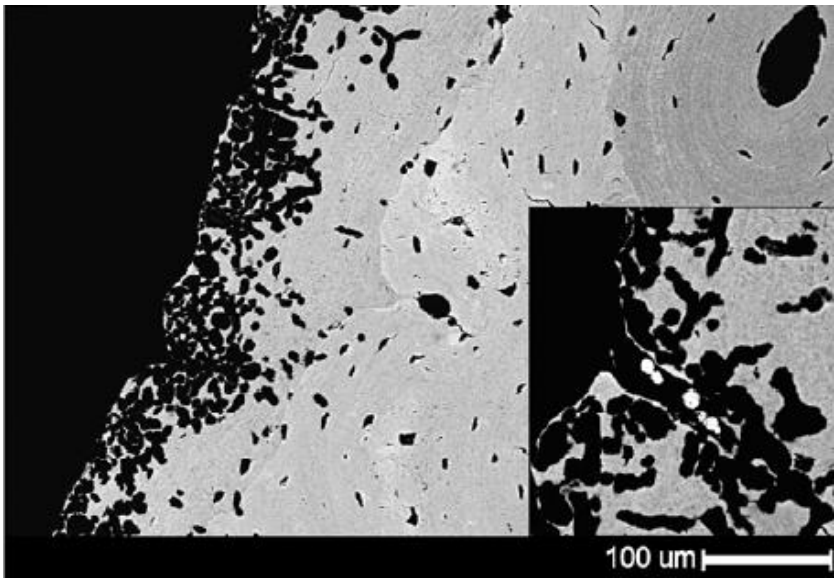


Figure 11 : Photographie MEB ; Bordure extérieure de l'os cortical perforée de canaux de type Wedl (Turner-Walker & Jans, 2008).

B Les altérations d'origine bactérienne :

L'ensemble des types décrits ci-dessous se manifestent par des foci, de tailles variables, qui peuvent être entourés d'un anneau hyperminéralisé provenant du minéral osseux préalablement dissout) et présente parfois des trous (section transverse) ou des canaux (section longitudinale) causés par l'activité bactérienne.

Les tunnels linéaires longitudinaux (« Linear longitudinal tunnels ») (cf. Fig. 12) : En section transverse, sont observés des foci arrondis de 5 à 10 µm de diamètre et parfois jusqu'à plus de 50 µm. L'observation de coupes longitudinales révèle la présence de canaux linéaires longitudinaux (sous forme de cavités à l'intérieur de foci en section transverse) parfois orientés verticalement. Enfin,

l'extension des canaux hors des ostéons est entravée par la ligne de cément. Jans (Jans *et al.*, 2004) indique que ce type de canal est retrouvé en association avec tous les autres types de modifications histologiques décrites par Hackett (1981).

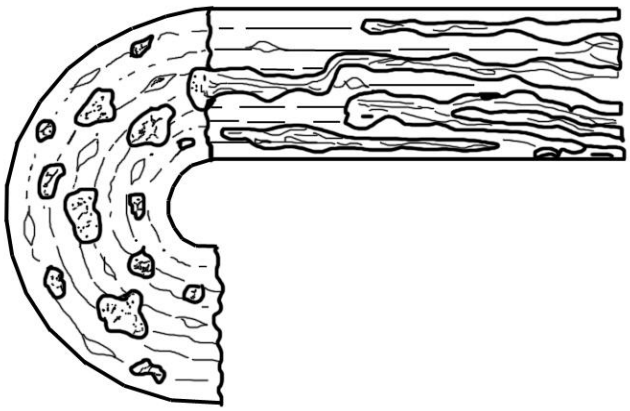


Figure 12 : Représentation des canaux linéaires longitudinaux, sections transversales (partie gauche de l'os) et longitudinales (partie droite de l'os) (D'après Hackett, 1981).

Les canaux en forme de bourgeon (« Budded tunnels ») (cf. Fig. 13) : En sections transverses, les « budded tunnels » ou canaux en forme de bourgeon, se manifestent par des foci arrondis de 30 µm ou plus. L'observation, en section longitudinale permet de constater que les canaux courent la plupart du temps le long des canaux de Havers. A partir de ceux-ci, ils colonisent les ostéons. Des excroissances latérales peuvent se développer à des intervalles plutôt irréguliers d'environ 80-90 µm (Hackett, 1981).

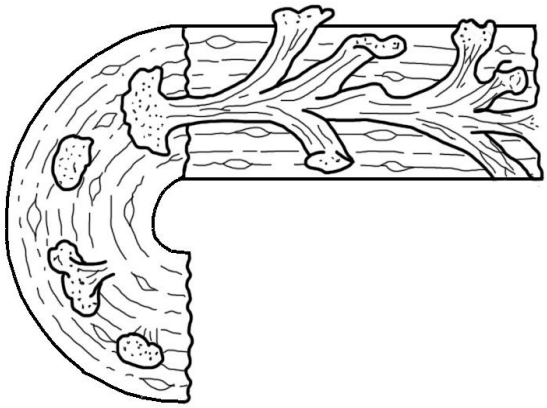


Figure 13 : Représentation des canaux en forme de bourgeon, sections transversales (partie gauche de l'os) et longitudinales (partie droite de l'os) (d'après Hackett, 1981).

Les foci lamellaires (« Lamellate foci ») (cf. Fig.14 et 15) : En sections transverses, Hackett (1981) observe des formes courbées, de 10-20 µm à 60x250 µm, qui se conforment aux contours circulaires des lamelles osseuses. Les foci apparaissent plus ou moins éloignés des canaux de Havers. Des foci

formés d'une seule lamelle (« mono-lamelatte ») ou de plusieurs lamelles (« poly-lamellate »), sont observés. Enfin, ce type de foci peut traverser les lignes de cément.
Ce type de canal est généralement retrouvé en association avec les « Budded tunnels », et ce malgré leurs grandes différences morphologiques (Jans *et al.*, 2004).

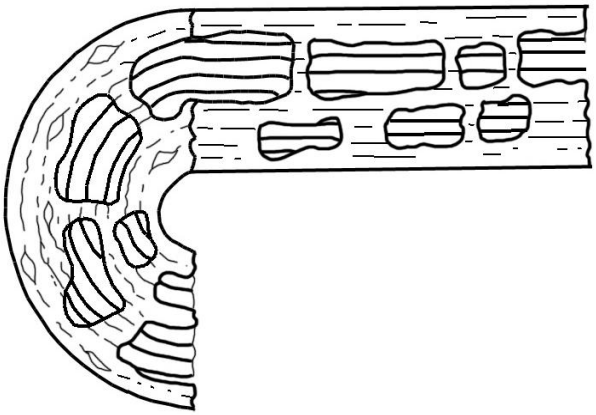


Figure 14 : Représentation des canaux de type lamellaire, sections transversales (partie gauche de l'os) et longitudinales (partie droite de l'os) (D'après Hackett, 1981).

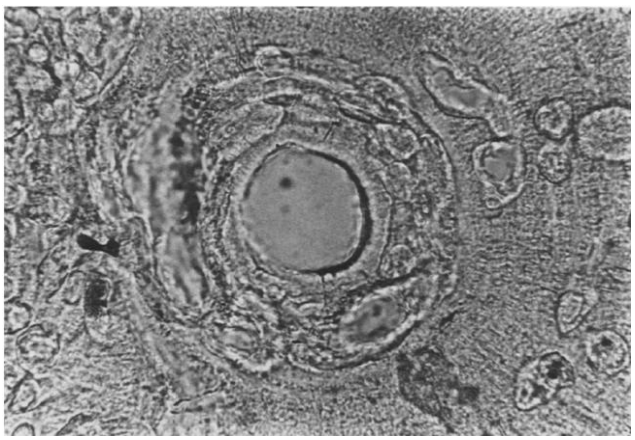


Figure 15 : Photographie MEB ; Ostéons envahis par des foci de type lamellaire (Piepenbrick, 1986).

C Expérimentations dans la littérature :

Dans un but de compréhension et de comparaison, des expérimentations sont réalisées pour reproduire les transformations structurelles des tissus osseux causées par le sol environnant et les microorganismes.

L'influence des variations de l'acidité du sol sur les ossements :

En partant du constat que les sols hautement alcalins ou acides peuvent corroder les tissus osseux, deux types principaux d'expériences sont faites : immersion des ossements dans des solutions à pH différents et enfouissement dans différents types de sol.

Solutions acides et basiques : Des dents humaines ont été plongées dans des solutions KOH et HCl à des pH extrêmes (pH 14 et 1,07 respectivement) pendant 1 heure, 12 heures, 24 heures, 48 heures et 72 heures pour les premières solutions et 15 minutes, 40 minutes et 60 minutes pour les secondes. Les dents extraites des solutions basiques montrent des modifications structurelles, notamment au niveau du collagène, après 48 heures. Dans les solutions acides, au contraire, les dents témoignent d'une légère corrosion après seulement une minute (Fernandez-Jalvo *et al.*, 2002).
Une autre expérimentation, par l'immersion d'os dans des solutions à pH 2,35 et pH 5, témoigne de légères modifications des surfaces osseuses après 21,5 heures pour la première solution et au contraire, d'absence de corrosion pour la seconde, même après cinq jours (Denys, 2002).

Enfouissement : D'autres expérimentations, nombreuses, ont été réalisées sur des périodes de temps beaucoup plus longues. Par exemple, Andrews (1995) évoque l'enfouissement de carcasses dans une tourbière dont le pH est égal à 4 et de cadavres laissés à macérer pendant 4 ans dans un contenant en plastique avec un peu d'eau. Ces milieux acides affectent fortement les os. Nicholson (1996) réalise le même genre d'expérience en laissant des cadavres complets d'animaux domestiques de taille variées dans différents sols pendant plus de 7 ans.

Les expérimentations montrent des résultats équivalents : la corrosion des tissus osseux est d'autant plus importante et rapide que le sol est acide.

<u>Altération artificielle des ossements par les microorganismes:</u>
Plusieurs types d'expérimentation sont menés dans la littérature afin d'altérer des ossements avec des microorganismes : enfouissement des ossements ou mise en contact de ceux-ci avec divers média et bouillons. Ces expérimentations répondent à de nombreuses questions telles que les formes d'altération selon le type de microorganismes impliqué, les zones concernées par l'altération, les facteurs inhibant les microorganismes, etc.

Des ossements sont enfouis dans des sédiments (type terre de jardin) gardés humides et à température ambiante pendant des durées variables (45 jours : Marchiafava *et al.*, 1974 ; un an : Hackett, 1981 et Baud, 1986) . Il généralement est constaté que la colonisation microbienne se fait en quelques jours.

Wedl (1864 in Hackett, 1981), quant à lui, a choisi d'immerger des sections de dents fraichement extraites dans de l'eau non traité pendant 10 jours. Après cette période de temps, des canaux de forage, d'origine fongique, seraient visibles dans le cément et la dentine.

Jackes (Jackes *et al.*, 2001) réalise une contamination d'ossements modernes stérilisés avec des bactéries du genre *Clostridium (C. sporogens, C. septicum, C. perfrigens)* au sein d'un bouillon de viande. Seuls les ossements au contact de l'espece *C. sporogens* montrent de modifications et notamment des dissolutions de surface. Aucune trace de canal n'est observée. Pour la culture de bactéries et champignons, Child (1995) utilise divers media (médium à base de collagène, médium de soja Trypton, etc.) dans lesquels sont inoculés les sols associés aux ossements et les os eux-mêmes.

A travers cette première partie, il a été constaté que les altérations affectant les ossements sont multiples. Il s'agit maintenant d'identifier les traces afin de reconstituer l'histoire taphonomique.

PARTIE II MATERIEL ET METHODES

Afin de comprendre et de comparer les processus taphonomiques qui affectent les ossements archéologiques étudiés provenant des sites de Song Terus et de Bize-Tournal, un référentiel moderne est crée.

Chapitre 1 : Présentation du référentiel moderne

En s'appuyant sur les expérimentations réalisées dans la littérature, il s'agit de simuler différents processus taphonomiques en procédant à des altérations dans des milieux artificiels : la corrosion du sol et les attaques microbiennes qui se produisent dans un environnement naturel.
Des enfouissements, en milieux basique (calcaire), acide (silice) et de type forestier ainsi que des immersions en solutions basiques et acides sont réalisés. Des pH modérés ont été choisis, contrairement aux expérimentations généralement relevées dans la littérature, afin de s'approcher au plus près des conditions naturelles. Enfin, des cultures de microorganismes ont été tentées. Pour réaliser l'ensemble des expérimentations des fragments d'un centimètre d'épaisseur d'os longs de cheval et des os longs de boucherie (veau et bœuf) ont été utilisés.
En complémentarité, des ossements modernes, qui ont fait l'objet d'ensemencements bactériens par le Laboratoire de restauration des musées de France (LRMH), ont été analysés.

I Corrosion du sol :

A partir des études évoquées précédemment, nous avons choisit de mettre en place deux types d'expérimentation : immersion des os dans des solutions à pH différents et enfouissement dans des sols de nature différente.

A Immersion des ossements dans des solutions à pH différents :

La corrosion du sol peut être simulée par l'immersion d'os dans des solutions d'acidité différente. Dans le cadre de ces expérimentations, des solutions d'HCl à pH=5 et KOH à pH=9 sont utilisées. Des pH plutôt modérés ont été choisis afin de s'approcher au plus près des conditions naturelles d'enfouissement. Des échantillons osseux ont été prélevés à une semaine d'immersion, deux semaines, un mois, deux mois et quatre mois.

Des échantillons, de bœuf d'une part (N=11) et de veau d'autre part (N=11), ont été immergés dans quatre béchers contenants de l'eau distillée (cf. Tableau 1). Des solutions acides et basiques ont été préparées respectivement par ajout de chlorure d'hydrogène (HCl) et d'hydroxyde de potassium (KOH) ou potasse. Le pH a été contrôlé et réajusté quotidiennement pendant la durée de

l'expérimentation. De plus, les solutions ont également été mélangées quotidiennement afin d'éviter une sédimentation dans le fond des béchers et ainsi de maintenir les propriétés de la solution (Denys, 2002). Enfin, une température assez constante des solutions d'environ 20° a été enregistrée.

B Enfouissement des ossements dans des sols de nature différente :

Afin de simuler la corrosion du sol (et les attaques microbiennes), les échantillons ont été enfouis dans des sols de nature plus ou moins acide (cf. Tableau 1) : des sédiments sableux (sol acide), calcaires (sol basique) et enfin un sol de type forestier. Des échantillons osseux ont été prélevés au bout d'une semaine, deux semaines, un mois, deux mois et quatre mois.

Vingt-deux échantillons ont été enfouis par milieu artificiel : onze échantillons de veau et onze de bœuf. Dans les contenants, ces deux types d'échantillons ont été séparés par un système de cloisonnement réalisé à l'aide d'une toile moustiquaire qui permet la circulation des fluides. Ces derniers ont été évacués par un système de perforation au fond des bacs. Ces différents milieux ont été maintenus humides par ajout régulier d'eau.

Une fois les échantillons prélevés, ils ont été rincés plusieurs fois à l'eau distillée, rincés une fois à l'éthanol et enfin laissés dans l'eau distillée quelques dizaines de minutes. Les échantillons sont ensuite placés à sécher sous une sorbonne.

Temps	**Solution**				**Enfouissement**					
	HCl		**KOH**		**Silice**		**Calcaire**		**Sol forestier**	
	Bœuf	**Veau**	**Bœuf**	**Veau**	**Bœuf**	**Veau**	**Bœuf**	**Veau**	**Bœuf**	**Veau**
7 j.	HClB 1	HClV1	KOHB1	KOHV1	SiB1	SiV1	CaB1	CaV1	ForB1	ForV1
15 j.	HClB 2	HClV2	KOHB2	KOHV2	SiB2	SiV2	CaB2	CaV2	ForB2	ForV2
1 mois	HClB 3	HClV3	KOHB3	KOHV3	SiB3	SiV3	CaB3	CaV3	ForB3	ForV3
2 mois	HClB 4	HClV4	KOHB4	KOHV4	SiB 4	SiV4	CaB4	CaV4	ForB4	ForV4
4 mois	HClB 5	HClV5	KOHB5	KOHV5	SiB 5	SiV5	CaB5	CaV5	ForB5	ForV5

Tableau 1 : Dénomination des différents échantillons, du type de milieu et de la durée à laquelle ils ont été prélevés.

II Altérations microbiennes en milieu contrôlé:

Deux types d'expérimentation ont été effectués afin de contaminer des ossements avec des microorganismes : culture de microorganismes avec un média à base de gélatine et enfouissement d'ossements.

A Mise en culture :

Afin de simuler expérimentalement les attaques microbiennes, une mise en culture a été réalisée. Un échantillon de terre végétale, correspondant au sol forestier utilisé pour les enfouissements, a été dilué avec de l'eau, laissé à sédimenter et puis filtré. Cette solution a été ajoutée à un milieu nutritif constitué de gélatine alimentaire. La solution finale a été versée sur des coupes de bœuf qui ont été prélevés toute les semaines (cf. Tableau 2). Ces dernières ont été stockées sous une sorbonne.

Temps d'immersion	Echantillon
1 semaine	CultB1
2 semaines	CultB2
3 semaines	CultB3
4 semaines	CultB4
5 semaines	CultB5
6 semaines	CultB6
7 semaines	CultB7
8 semaines	CultB8
9 semaines	CultB9
10 semaines	CultB10
11 semaines	CultB11
12 semaines	CultB12

Tableau 2 : Dénomination des différents échantillons et de la durée à laquelle ils ont été prélevés.

B Enfouissement prolongé (2 ans) dans un sol forestier :

Des os de chevaux ont été enfouis ou semi enfouis pendant deux ans dans un sol de type forestier. Un échantillon provenant d'un os long a été prélevé (Ch).

Les échantillons prélevés subissent le même protocole de rinçage et séchage que précédemment.

C Expérimentation d'ensemencements bactériens par le LRMH :

Des analyses microbiologiques, réalisées par le Laboratoire de Restauration des Musées de France (LMRH, Champs-sur-Marne, 77), ont été réalisées sur des ossements archéologiques fortement altérés par les bactéries (Müller *et al.*, 2011) provenant du site médiéval de Mongelas (France). Ces analyses ont permis d'isoler plusieurs espèces à l'origine des altérations. Il s'agit des *Bacillus sp*. (*bacille gram* +), *Pseudomonas sp*. (*bacille gram* -) et *Stenotrophomonas maltophilia* (*bacille gram* -) (pers. Comm.

G. Orial). Les deux premières sont citées par Baud (1986) comme faisant parti des plus actives bactéries dans la destruction des ossements.
Des essais d'ensemencement sont ensuite effectués en inoculant deux types de bactérie (*Bacillus sp*. : BG + et *Pseudomonas sp*. : BG-) à un milieu liquide (Tryptone caséine soja) et en y intégrant les ossements modèles (trois par essai). Afin de fournir un apport nutritif suffisant, les milieux de culture sont renouvelés tous les mois et ce pendant trois mois. Un dénombrement du nombre de bactéries est réalisé avant chaque renouvellement (Cf. Tableau 6). Un témoin 0, plongé dans le même type de bouillon mais sans microorganisme, est gardé en référence.

Un échantillon par type de bactérie à trois mois de culture a été observé au microscope électronique à balayage et comparé à l'échantillon de référence.

Chapitre 2 : Présentation des sites archéologiques et des vestiges osseux associés

I Le site de Song Terus (Java, Indonésie) :

A Présentation du site :

Situation géographique et géologique : La grotte de Song Terus est localisée dans la région des Gunung Sewu au sud de l'île de Java en Indonésie, près de la ville de Pacitan. La région est formée de collines constituées principalement de calcaire récifal du Miocène et parcourue par un important réseau karstique. De nombreuses grottes y sont ainsi creusées.
Cette région est caractérisée par un climat équatorial avec des températures élevées (27°) et une pluviométrie importante (2000 mm) (Chacornac-Rault, 2004).

Présentation de la grotte de Song Terus : Soejono dirige les premières fouilles de la grotte de Song Terus en 1950. Le remplissage de surface est alors attribué à la période Néolithique. Depuis 1994, le chantier est repris par Sémah (Département de Préhistoire du Muséum National d'Histoire Naturel de Paris) et Simanjuntak (Centre de Recherche Archéologique Indonésien) qui instaurent une fouille systématique.

La grotte de Song Terus est formée d'un conduit orienté est-ouest d'une centaine de mètres de long et de 10 à 20 mètres de large. Elle s'ouvre par deux ouvertures aux deux extrémités de la colline. La fouille principale est située au niveau de l'entrée ouest qui forme un vaste abri.

Contextes stratigraphique, archéologique et chronologique: La fouille a porté sur deux sondages à une vingtaine de mètre du porche d'entrée ouest à proximité de la paroi (Gallet, 2004): les puits KI et KII de plus de 15 m de profondeur et de 8 m de profondeur respectivement (Cf. Fig 16.).

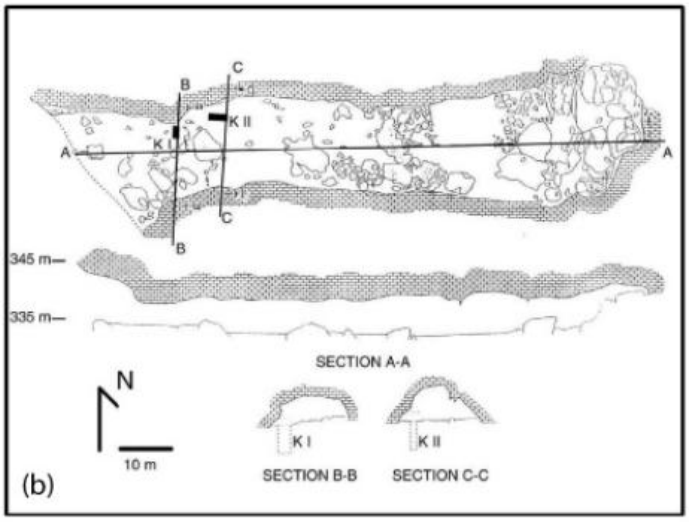


Figure 16 : Plan et section de la grotte de Song Terus, emplacement des deux puits (KI et KII) (Sémah *et al.*, 2004).

Trois grands ensembles sédimentaires sont mis en évidence (Gallet, 2004). Il s'agit de niveaux argileux à la base de la séquence, de niveaux fluviatiles et de dépôts de grotte.
Ces ensembles ont révélé trois niveaux archéologiques : les niveaux Terus, les niveaux Tabuhan et les niveaux Keplek (cf. Fig. 17). Le second, détaillé par la suite, nous intéresse particulièrement. Les deux niveaux inférieurs renferment de nombreux vestiges lithiques ; industrie sur éclats essentiellement composée de grattoirs pour les niveaux Terus et une industrie de type Keplek au sein des niveaux Keplek. Plusieurs vestiges d'ossements humains et une sépulture ont également été mis à jour dans les niveaux Keplek (Détroit, 2002).

Les niveaux Keplek, par des datations 14C correspondent à des âges compris entre 5770 ± 60 ans BP et 9330 ± 90 ans BP. Les niveaux Tabuhan, quant à eux, sont datés de la seconde moitié du Pléistocène moyen (80-30 ka). Enfin, les niveaux Terus sont estimés à environ 300 ka. Ces deux dernières datations ont été réalisées par l'association des méthodes ESR et U/Th (Hameau, 2004).

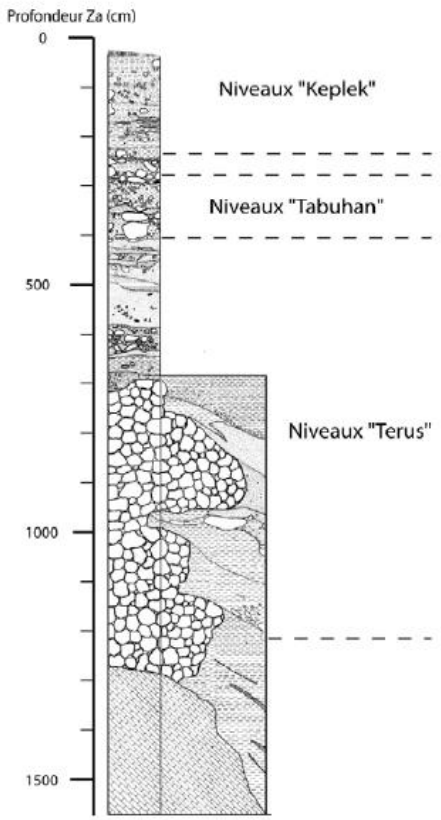


Figure 17 : Relevé des niveaux archéologiques de la grotte de Song Terus (Sémah *et al*., 2004).

B Présentation des échantillons:

Les échantillons étudiés proviennent des niveaux Tabuhan. Ces derniers, en position intermédiaire, témoignent des plus anciennes occupations humaines de la grotte. Ils renferment très peu d'industrie mais la faune y est au contraire abondante notamment en ce qui concerne les restes de bovidés et de cervidés (Sémah *et al.*, 2004).

Altérations : Au sein des niveaux Tabuhan, les échantillons proviennent des zones M8 et M10 localisées entre les niveaux H et G. M8 se situe plus en avant de la grotte au niveau du porche, éloignée de 3 à 4 m de M10. Ces niveaux sont globalement constitués de dépôts argilo-limoneux. Ils se caractérisent par la présence de blocs de calcaire centimétriques et pluri-décimétriques qui proviennent manifestement de plusieurs phases d'effondrement du toit de la grotte. Une fraction sableuse réduite, des cailloutis, quelques poches de cendres volcaniques et des plaquettes de calcaire se remarquent également. Les niveaux correspondant aux os semblent beaucoup plus secs que les niveaux supérieurs lesquels sont très carbonatés (X. Gallet, comm. pers.).

Les ossements retrouvés dans ces niveaux se caractérisent par une surface altérée par d'importants dépôts de manganèse. Ces dépôts peuvent être très localisés ou recouvrir toute la surface. Seuls quelques os brûlés sont retrouvés dans ces niveaux (Lebon, 2008).

Echantillonnage : Quelques ossements sont sélectionnés au sein de ces deux zones (cf. Tableau 3 et Fig. 18).

Echantillon	Contexte stratigraphique		Provenance x ; y ; z	Z Ref.	N° inv.
ST2010-06	Zone M8	Couche 13HP1	-	Z sl	2034
STTA02	Zone M8	Couche 13HI1	142 ; 5 ; 165	Z sl	1214
STTA13	Zone M8	Couche 13HG1	134 ; 48 ; 182	Z sl	955
STTA14	Zone M8	-	-	Z sl	1204
STTA08	Zone M10	Couche 13JP2	141 ; 183 ; 188	Z sl	8511
STTA17	Zone M10	Couche 13JF3	184 ; 82 ; 68	Z sl	10665
STTA18	Zone M10	Couche 13JO3	183 ; 188 ; 200	Z sl	10625
STTA20	Zone M10	Couche 13JV2	159 ; 7 ; 95	Z sl	9535
STTA22	Zone M10	Couche 13JP2	141 ; - ; -	Zsl	-

Tableau 3 : Echantillons sélectionnés au sein des zones M8 et M10.

Figure 18 : Echantillons sélectionnés du site de Song Terus provenant des zones M8 et M10.

II Le site de Bize-Tournal (Fance) :

A Présentation du site :

Situation géographique et géologique : La grotte Tournal se localise dans l'Aude en Languedoc-Roussillon à quelques centaines de mètre du village de Bize-Minerval. Elle prend place dans le massif des Corbières orientales au niveau de la vallée de la Cesse. Elle est surplombée par le plateau de la Verdeyre situé à l'extrémité occidentale du chaînon de Saint-Chinian (Tavoso, 1987).

Présentation de la grotte Tournal : Dans le massif de nature karstique, de nombreuses diaclases sont élargies localement en salles et galeries. Les conduits principaux, découverts en 1826 par P. Tournal, se verront attribuer les noms de Grande Grotte de Bize ou grotte Tournal (le chantier principal), et de Petite Grotte de Bize. A partir de cette date, de nombreuses campagnes de fouille s'y succédèrent. En 1970, le chantier de la grotte Tournal est repris par A. Tavoso jusqu'en 1988, année de sa mort.
La grotte Tournal, qui nous intéresse particulièrement, possède une salle d'entrée qui se prolonge en deux couloirs. Le plus long, d'environ 120 m, forme cinq salles successives.
Les fouilles de Tavoso portent sur deux zones (cf. Fig. 19) : le chantier principal à une cinquantaine de mètre de l'entrée dans le couloir principal et le second vers l'entrée de la grotte le long de la paroi nord (Tavoso, 1987 ; Patou-Mathis, 1994).

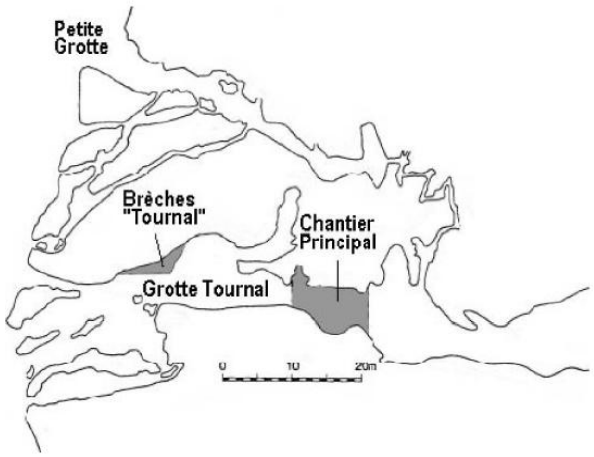


Figure 19 : Localisation des zones fouillées (Tavoso, 1987).

Contextes stratigraphique, paléontologique et chronologique: Des horizons de référence, avec une sédimentologie et une stratigraphie complexes, sont établis. Tavoso subdivise ces derniers en quatre ensembles (Ensemble I, II, III et IV), eux même formés chacun de plusieurs niveaux. L'ensemble IV, détaillé par la suite, nous intéresse particulièrement. Le secteur étudié, divisé par une cloison rocheuse au niveau des zones 28 à 32, est constitué de deux demi-galeries (Nord et Sud, cf. Fig. 20).

Les ensembles contiennent des niveaux archéologiques souvent très riches : des occupations humaines du Paléolithique moyen et supérieur sont mises en évidence (Tavoso, 1987).

Plusieurs datations ont été émises par ESR (Yokoyama, 1987 in Lebon, 2008) et U/Th (Yokoyama & Falguères, 1988 in Lebon, 2008). L'étude ESR propose un âge compris entre 38000 et 48000 ans pour l'ensemble II inférieur et l'étude U/Th donne un âge de 33000 ans ± 1000 ans.

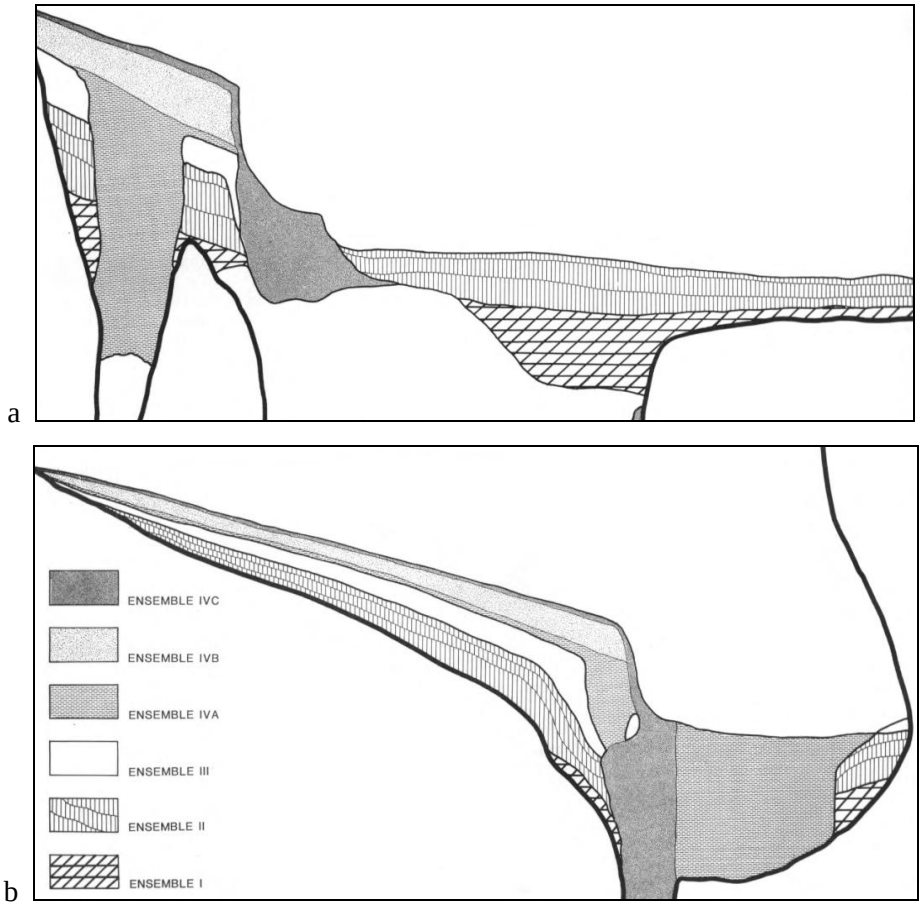


Figure 20 : Coupes synthétiques longitudinales des remplissages des demi-galeries Nord (a) et Sud (b) (Tavoso, 1987).

B Présentation des échantillons :

Contexte des échantillons : L'ensemble des échantillons appartiennent à l'ensemble IV. Ce dernier comble de grandes cavités creusées par l'érosion karstique au sein des ensembles I, II, III et même dans l'ensemble IV lui même. Les échantillons osseux appartiennent aux niveaux G et H.

Le niveau G est constitué d'un cailloutis fin à matrice limoneuse. Les témoins archéologiques révèlent un très riche habitat du Paléolithique Supérieur qui succède à une période d'intense érosion karstique creusant d'importantes cavités. Un étroit fossé entre deux puits verticaux correspond aux zones N 33-

32. Les vestiges, qui correspondent aux zones d'habitat, se retrouvent accumulés dans le puits (L-M 33-34) par des phénomènes de ruissellement, encroutés de calcite et également colorés par des oxydes métalliques. Le matériel archéologique est essentiellement composé de vestiges fauniques dont 90 % de renne.

Le niveau H est composé d'un cailloutis cryoclastique qui, par des altérations diagénétiques, est transformé en une brèche très dure dont le ciment est composé de calcite, d'oxydes métalliques, de phosphates et d'argiles. Des niveaux limoneux et argileux s'interposent indiquant des périodes tempérées. Les échantillons étudiés, provenant de la zone O30 ou «Foyers noirs supérieurs » (zone O30 et O31), correspondent au remplissage d'un puits. Il s'agirait d'un comblement intentionnel lié à des activités domestiques. Un riche matériel archéologique (outillage en bois de renne ; débitage et retouche du silex ; galets rubéfiés, noircis et éclatés par le feu ; ossements très fragmentés, brulés ; etc.) est retrouvé permettant la formulation de l'hypothèse de poubelle pour ces zones O30-31, dans lesquelles les populations magdaléniennes ont jeté les produits de vidange des foyers et du nettoyage. L'assemblage faunique, dominé par le renne, est caractéristique du Tardiglaciaire. Le cheval est également bien présent (Tavoso, 1987 ; Patou-Mathis *et al*., 1999).

Etat de conservation :

Facteurs naturels *:* D'une manière générale, les vestiges fauniques de l'ensemble IV sont relativement bien préservés. Ils ne sont, en effet, que très légèrement affectés par les facteurs naturels post-dépositionnels ; le facteur principal de modification est l'homme par ces diverses activités. Ceci peut être expliqué par la localisation des dépôts en grotte et un enfouissement rapide et donc une conservation dans un milieu préservé. Ainsi, par exemple, les altérations causées par les processus d'intempérisation sont très faibles (stades de weathering entre 0 et 1) (Magniez, 2009).

Oxydation : Dans le niveau H, 40% des vestiges osseux ont une fine couche de sédiments cimentés qui adhère à leur surface. Contrairement aux ensembles moustériens où ce dépôt cimenté est accompagné d'oxydes métalliques, ceux-ci sont rares pour les os provenant du niveau H. L'éventuelle existence de dépôt d'oxyde est en fait probablement biaisée par la carbonisation des os.

Chauffage *:* Les traces de chauffage sont très nombreuses dans l'ensemble IV. Dans le niveau G, 11,4% des grands ongulés et 25,4% des petits et moyens ongulés montrent des traces de carbonisation. Dans le niveau H, 41,9% des restes appartenant aux grands ongulés et 63,3% des petits et moyens ongulés présentent des traces de brûlure. La fréquence des os complètement carbonisés est de 2,4% dans le niveau G pour l'ensemble des ongulés et de 17,7% pour les grands ongulés et de 24,1% pour les petits et moyens ongulés dans le niveau H (Magniez, 2009).

Echantillonnage : Un échantillonnage est effectué au sein des ossements (cf. Tableaux 4 et 5 ; Fig. 21 et 22).

Echantillon	Contexte stratigraphique			
BZ2010-01	Ensemble IV	Niv. G	Couche PJ1	Zone N32
BZ2010-03	Ensemble IV	Niv. G	Couche PJ1	Zone N32
BZO30-18	Ensemble IV	Niv. G	Couche 1	Zone O30

Tableau 4 : Echantillons sélectionnés au sein du niveau G.

Figure 21 : Echantillons sélectionnés du site de Bize-Tournal provenant du niveau G.

Echantillon	Contexte stratigraphique			
BZ2010-14	Ensemble IV	Niv. H	Couche I	Zone O30
BZ2010-15	Ensemble IV	Niv. H	Couche I	Zone O30
BZ2010-16	Ensemble IV	Niv. H	Couche I	Zone O30
BZ2010-19	Ensemble IV	Niv. H	Couche I	Zone O30
BZ2010-21	Ensemble IV	Niv. H	Couche IND	Zone IND
BZ2010-22	Ensemble IV	Niv. H	Couche IND	Zone IND
BZ2010-23	Ensemble IV	Niv. H	Couche IND	Zone IND
BZ2010-24	Ensemble IV	Niv. H	Couche IND	Zone IND

Tableau 5 : Echantillons sélectionnés au sein du niveau H.

Figure 22 : Echantillons sélectionnés du site de Bize-Tournal provenant du niveau H

Chapitre 3 : Présentation des méthodes

I Traitement des échantillons avant analyses :

L'ensemble des échantillons sélectionnés ont été photographiés, scannés et enfin tronçonnés. Deux coupes transversales de 3 mm ont été réalisées sur chacun des ossements, à l'aide d'une scie Minitom à meule de tronçonnage diamantée (127 mm X 0,4 mm).

Les échantillons du site de Song Terus, trop fragiles et donc friables, ont été enrobés dans la résine avant d'être coupés. Pour cela, une résine Epoxy (EpoFix Resin) a été utilisée.

Les coupes réalisées ont été ensuite polies en utilisant des suspensions diamantées de 9, 6 puis 3 µm.

Ces coupes, fines et polies, correspondent aux critères exigés pour l'ensemble des techniques d'analyse évoquées ci-après.

II Microscopie électronique à balayage (MEB) :

A Principes de cette méthode :

Ces analyses seront réalisées au C2RMF avec le MEB Philips XL 30CP.

La technique de la microscopie électronique à balayage permet l'obtention d'images de la surface des coupes par le principe des interactions électrons-matière. La surface est balayée par un faisceau focalisé d'électrons à des tensions variables de 15 à 20 kV dans le cadre de cette étude. L'interaction faisceau-matière résulte en la production de rayonnements secondaires (électrons rétrodiffusés et électrons secondaires) que l'on exploite avec les détecteurs correspondants. Le détecteur d'Emission d'Electrons Rétrodiffusé (Back Scattering Electron - BSE), uniquement utilisé dans cette étude, permet la formation d'images en contraste de composition selon le numéro atomique : plus la masse atomique est faible plus l'image est sombre et inversement.

L'interaction faisceau-atomes, crée également des photons X qui sont collectés par un détecteur en spectrométrie d'énergie (EDS : Energy Dispersive Spectrometry) lequel permet des microanalyses des éléments chimiques et l'obtention de spectres. L'énergie des photons est, en effet, caractéristique des atomes qui les ont émis (E. Laval, comm. pers.).

Les ossements, matériaux non conducteurs, sont préalablement métallisés avec une fine couche de carbone afin d'éviter la formation de charges électrostatiques en surface. Cette métallisation est associée avec un travail dans une chambre sous vide.

B Description de l'histologie osseuse :

Altérations microbiennes : L'état d'altération diagénétique a été évalué à l'aide de l'index histologique (Histological index ou IH) décrit par Hedges (Hedges *et al.*,. 1995). Ainsi, les valeurs comprises entre 0 et 5 seront attribuées à chacun des échantillons. La valeur 0 correspond à un état très altéré où la structure histologique originelle n'est plus visible et la valeur 5 correspond à l'état inverse où l'ossement est très bien préservé.

Porosité : La porosité de l'os est importante puisqu'elle détermine comment il interagit avec son milieu environnant. Son augmentation mène ainsi à une accroissement des échanges entre l'os et le milieu environnant par les eaux d'infiltration (Hedges *et al.*, 1995, 2002). Leur observation permet de déterminer quelle partie de l'os interagit avec son milieu.
Un essai de mesure de la porosité globale a été réalisé avec le logiciel Image J lequel a permis de calculer l'aire totale de la porosité sur une image représentative d'un échantillon.

Fissuration : Les macrofissures, généralement observables à l'œil nu, sont distinguées des microfissures qui sont à l'échelle des ostéons. Ces différences de taille reflètent des causes différentes. En effet, il est reconnu que les fissures les plus larges sont la conséquence de stress physique de l'os comme les phénomènes de piétinement, les variations d'humidité ou de température, ou par les pressions subies lors de la fouille et des préparations de laboratoire. Les microfissures sont plutôt le résultat de processus comme la reminéralisation et la perte de matière organique qui engendrent des rétrécissements de la structure osseuse, mais aussi la déposition de carbonate de calcium qui aura un effet de la désintégration de la micro-structure (Piepenbrick, 1986 ; Jans *et al.*, 2002).

Inclusions de minéraux exogènes : De nombreux éléments sont intégrés à la matrice osseuse. Des microanalyses localisées seront effectuées à l'aide du détecteur EDS.

III Spectrométrie (PIXE) :

A Principes de cette méthode :

Les manipulations ont été réalisées au C2RMF qui dispose d'un accélérateur électrostatique tandem de 2 Millions de volts: Accélérateur Grand Louvre pour l'Analyse Elémentaire (AGLAE).

Cette méthode PIXE (Particle Induced X-ray Emission ou en français : émission de rayons X induite par particules chargées) permet de déterminer la concentration des différents éléments chimiques (majeurs, mineurs et traces) qui composent les échantillons. L'interaction d'un faisceau de particules chargées (des protons) et les atomes composants l'échantillon produit des rayonnements X caractéristiques de chaque élément. L'énergie des rayons X émise est mesurée grâce à deux détecteurs (Si (Li)) permettant de détecter les rayonnements X de faible énergie (1 à 20 keV) et haute énergie (3-40 keV) (Calligaro *et al.*, 2004). Il est ainsi possible d'effectuer une analyse simultanée des éléments légers (Na, Mg, Si, Cl, S et Ca) et lourds (Mn, Fe, Cu, Sr et Zn, etc.). Les concentrations en éléments et les erreurs de mesure associées ont été établies grâce au logiciel GUPIX (Maxwell *et al.*, 1988). La méthode de traitement des données et d'étalonnage des concentrations est présentée en détail dans Reiche (2000). Les profils de concentration ont été réalisés sur les coupes transversales des os en le déplaçant devant le faisceau avec des d'analyses compris entre 200 et 200 µm ou entre 300 et 300 µm. La pénétration des protons est de moins de 100 µm.

B Applications :

A partir des valeurs obtenues, des moyennes de concentrations en éléments seront établies pour chaque échantillon et les valeurs maximales et minimales précisées. Des profils de concentration seront ensuite créés afin d'évaluer comment sont répartis les éléments au sein de l'ossement.

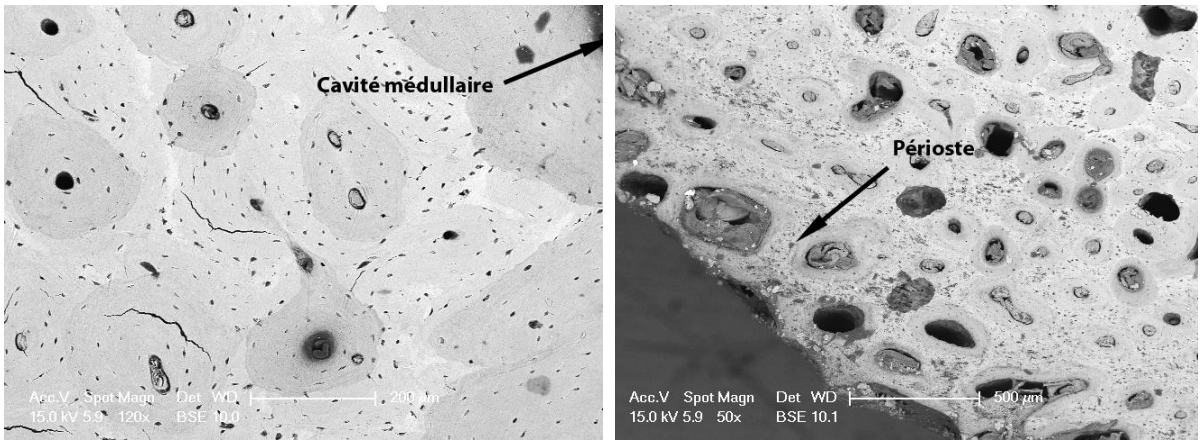
PARTIE III : RESULTATS

Chapitre 1 : Le référentiel moderne

Les ossements étudiés ci-après proviennent d'expérimentations d'enfouissement (milieux siliceux, calcaire et de type forestier) et d'immersion (culture bactérienne, solutions KOH et HCl). Après prélèvement, certains échantillons ont été sélectionnés afin d'être observés au microscope électronique à balayage (cf. ANNEXE A). Les ossements de bœuf ayant subi les expérimentations et qui ont été analysés ont été prélevés à une semaine (CaB1, ForB1, SiB1 et HClB1) et/ou un mois (CaB3 et KOHB3) et quatre mois (CaB5, ForB5, SiB5, KOHB5 et HClB5). Ceux issus des mises en culture ont été prélevés à deux, trois, sept et 12 semaines (CultB2, 3, 7 et 12) d'immersion. Seuls deux ossements de veau (CaV5 et ForV5) et un échantillon de cheval enfouis pendant deux ans (Ch), faute de temps, ont pu être analysés.
Des échantillons modernes témoins, de bœuf (BM1 et BM2), de cheval (ChM) et de veau (V) qui n'ont pas subi de traitement ont également été observés.

I Le référentiel moderne expérimental :

Les ossements traités se caractérisent par une bonne préservation de la structure histologique au niveau de la cavité médullaire et des altérations, plus ou moins importantes, près du périoste (cf. Fig. 26 et 27 et cf. ANNEXE E). Ces altérations se présentent sous la forme de marques de corrosion, de modifications des porosités et de fissurations et d'attaques microbiennes.



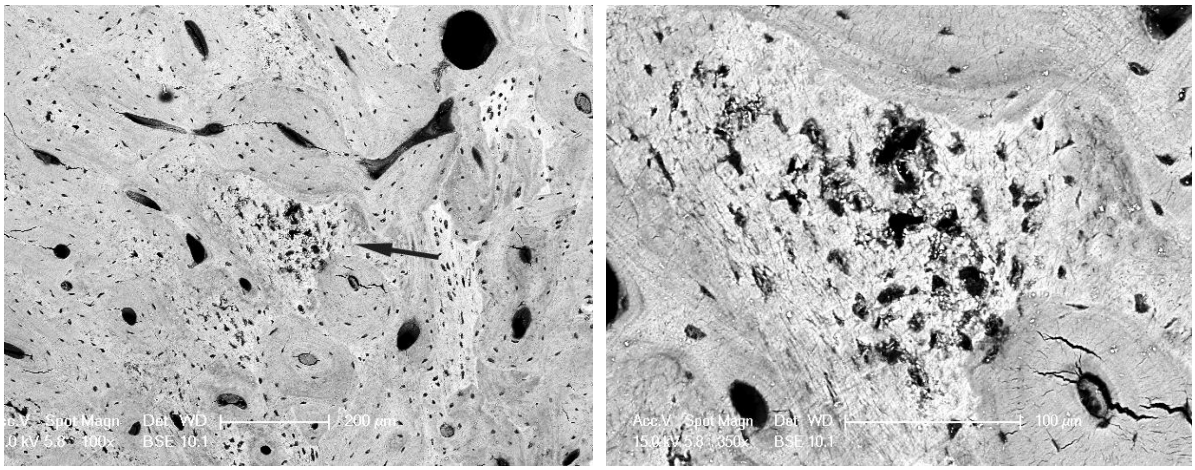
Figures 23 et 24 : Photographie MEB, SiB1 ; Gauche : histologie bien préservée contre la cavité médullaire (échelle 200 µm). Droite : Augmentation de la porosité et corrosion de surface, partie périostéale (échelle 500 µm).

A Corrosion de surface :

Tous les ossements sont sujets à des corrosions de surface principalement au niveau des lamelles interstitielles dans la zone périostéale, et ceci dès la première semaine.

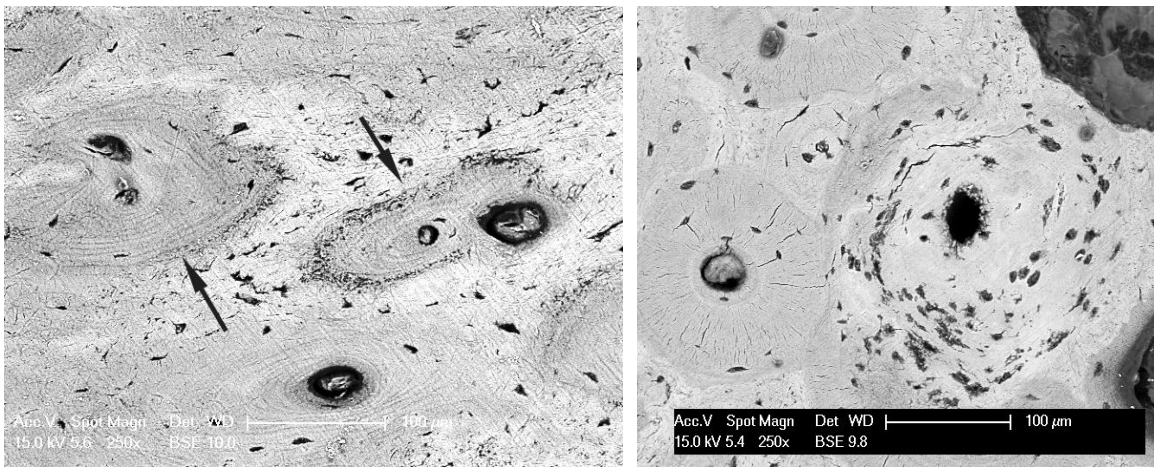
Les aires corrodées arborent plusieurs formes :

La plus fréquente, et présente en nombre variable sur tous les ossements, prend la forme de perforations de la surface associées à une augmentation de la porosité et d'une concentration de microfissures. Ces zones altérées sont parfois délimitées de l'os inaltéré par une surface plus ou moins minéralisée selon l'état d'altération de l'échantillon (cf. Fig. 28 et 29). Elles se distinguent très nettement des altérations bactériennes par leur localisation et par l'irrégularité des perforations.

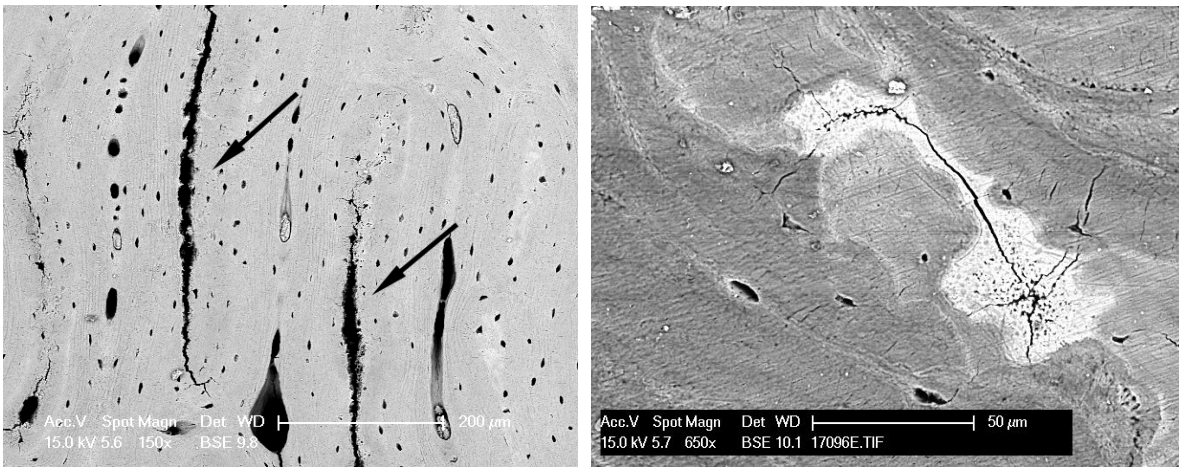


Figures 25 et 26 : Photographies MEB CaV5, gauche : lamelles interstitielles corrodées et plus minéralisées (200 µm). Droite : Grossissement zone altérée (100 µm).

Il est constaté que ces traces de corrosion peuvent suivre de très près les limites des ostéons (BM1) ou empiètent sur les ostéons (ForB1) (cf. Fig. 30 et 31). Ces zones altérées peuvent engendrer des fissurations les traversant plus ou moins complètement (SiB5) (cf. Fig. 32). Sur un échantillon, ces zones corrodées sont associées à des dépôts minéralisés (CAB3) (cf. Fig. 33).

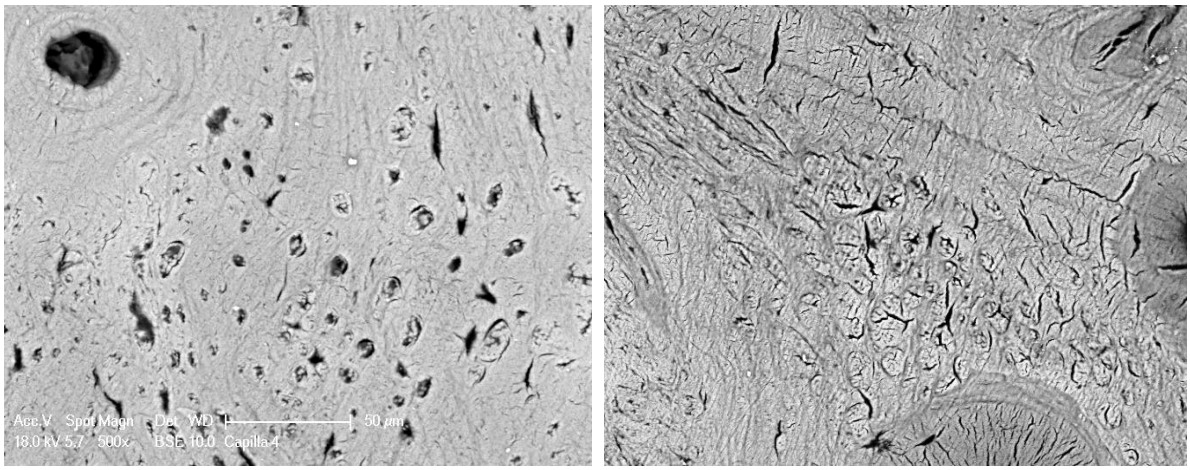


Figures 27 et 28 : Photographies MEB. Gauche : Altérations au niveau des limites externes de l'ostéon (BM1, 100 µm). Droite : Altérations qui suivent la structure lamellaire concentrique de l'ostéon (ForB1).



Figures 29 et 30 : Photographies MEB, gauche : Altérations qui se transforment en fissures (SIB5, 200 µm). Droite : Zone hyperminéralisée associée à des phénomènes de corrosion (CaB3).

Un autre type de corrosion retrouvé sur quelques échantillons (CaB1 et ForB5) est constitué de petites zones ovoïdes délimitées dans certains cas par un anneau hyperminéralisé et parcourues de microfissures (cf. Fig. 34 et 35). Il semblerait qu'il s'agisse de petites zones ayant subi des processus de dissolution.

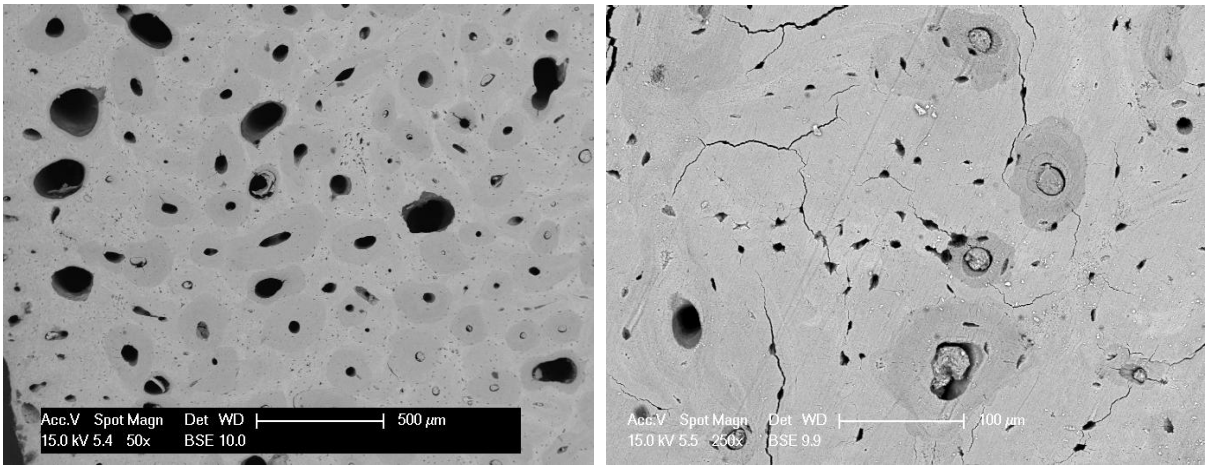


Figures 31 et 32 : Photographies MEB, CAB1, Petites zones circulaires altérées (50 µm).

Ces zones de corrosion observées sont importantes dans le cadre de cette étude puisqu'elles ne sont pas décrites dans la littérature. Ces zones plus ou moins minéralisées attestent de modifications non seulement physiques de l'échantillon mais aussi chimiques.

B Porosités et fissurations :

La porosité est globalement augmentée au niveau de la zone périostéale (cf. Fig. 36). Au sein des zones corrodées, un agrandissement des lacunes ostéocytaires interstitielles (ForB5) est observé (cf. Fig. 37).



Figures 33 et 34 : Photographies MEB, Gauche : augmentation de la porosité au niveau du périoste (KOHB3). Droite : Accroissement de la taille des lacunes interstitielles (ForB5).

Cependant, deux échantillons témoignent d'une diminution très nette de la porosité le long du périoste (CAB1, KOHB5). Ces augmentations ainsi que cette rétractation pourraient être causées par des modifications importantes des structures de l'os (cf. Fig. 38).

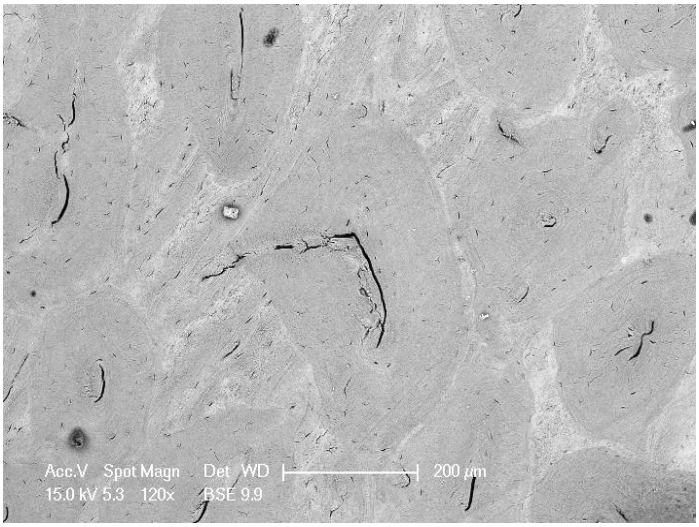
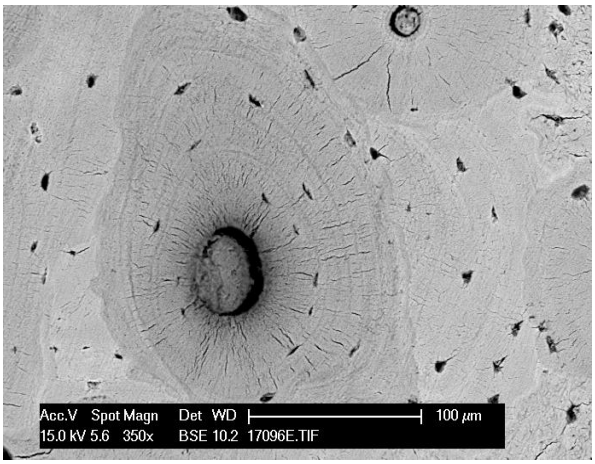
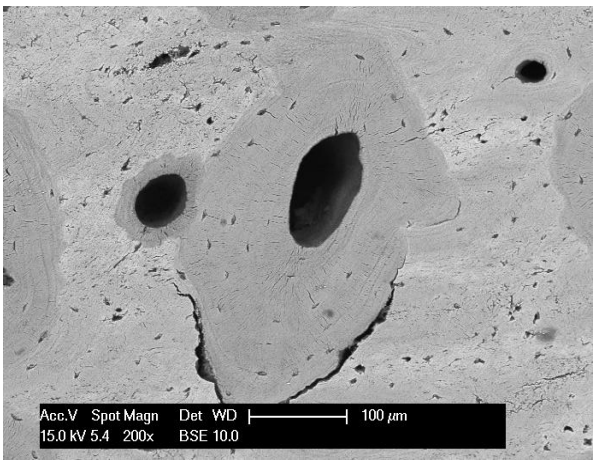


Figure 35 : Photographie MEB, Rétractation de la porosité (KOHB5).

Les micro et macrofissures sont très abondantes. De larges fissures parcourent toute la surface des ossements. Présentes également au sein de la structure des échantillons témoins, il pourrait être déduit qu'elles sont causées par les préparations. De plus, dans les os très altérés, de nombreuses microfissurations à l'intérieur des ostéons sont observées (cf. Fig. 39 et 40).





Figures 36 et 37 : Photographies MEB, Gauche : Microfissurations à l'intérieur de l'ostéon (CultB2). Droite : Fissure qui suit le contour de l'ostéon (KOHB3).

C Altérations microbiennes :

Peu d'altérations bactériennes sont observées. Seul un échantillon (CaV5) présente des attaques bactériennes importantes situées le long de la paroi externe du périoste (cf. Fig. 41). Ces altérations se manifestent par des zones hyperminéralisées de couleur blanche sur les photographies MEB. Elles se caractérisent par leur grande étendue contre le périoste et au contraire leurs faibles dimensions quand elles sont situées plus au centre de l'échantillon. Ces foci sont perforés de petits trous de taille similaire qui se chevauchant plus ou moins avec des canaux. Sur certaines photographies, ces derniers se propagent, depuis la surface externe de l'échantillon, nettement vers le centre de la surface de l'échantillon, ce qui indique la zone d'implantation originelle des micro-organismes. Cette dernière peut se trouver soit directement au niveau de la surface externe du périoste, soit près de grosses porosités. Les trous formés par les canaux sont plus ou moins visibles indiquant que des apports extérieurs chargés en éléments ou des minéralisations, amenées par la formation de canaux voisins, les recouvrent peu à peu. Il est distingué, sur l'échantillon ForB5, quelques zones d'attaques contre la paroi externe du périoste.

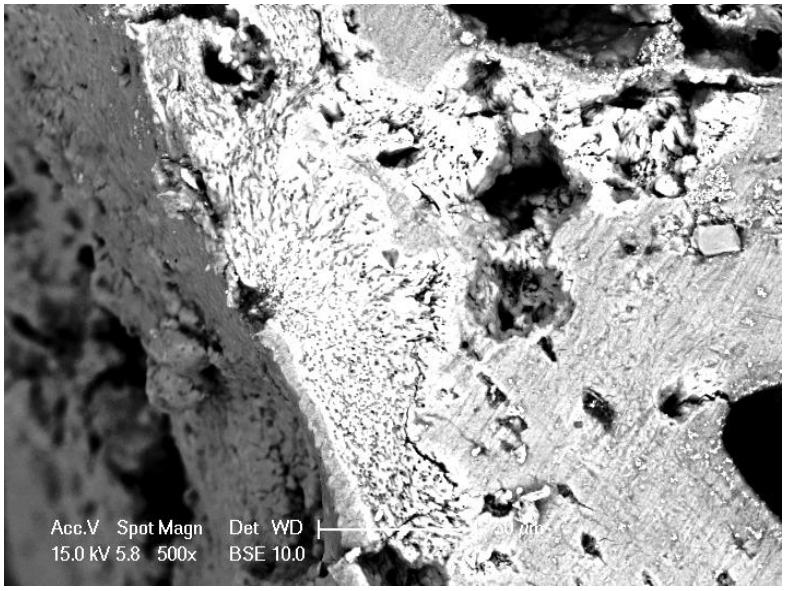
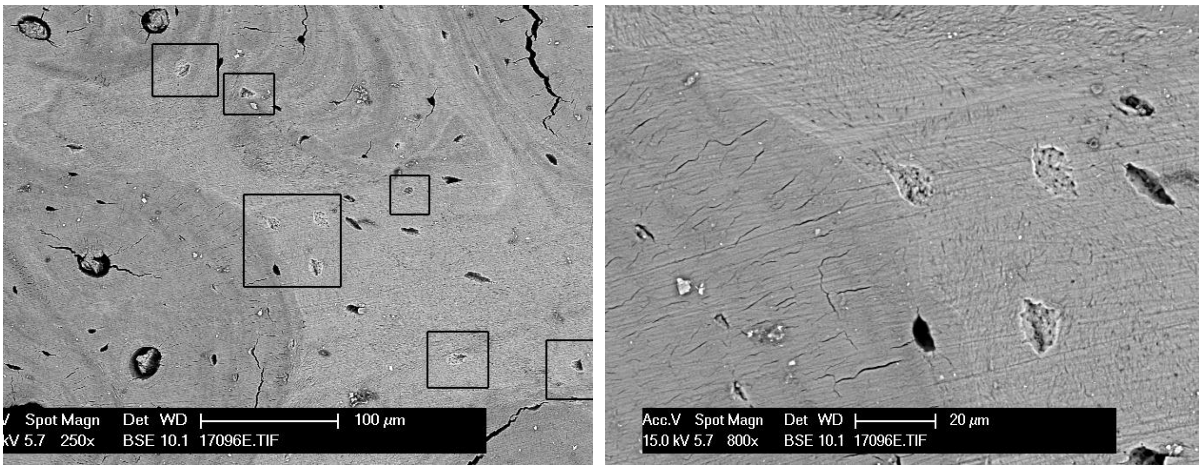


Figure 38 : Photographie MEB, CAV5, Foci hyperminéralisé avec trous et canaux qui partent dans toutes les directions à partir du point d'implantation contre la surface externe du périoste (50 µm).

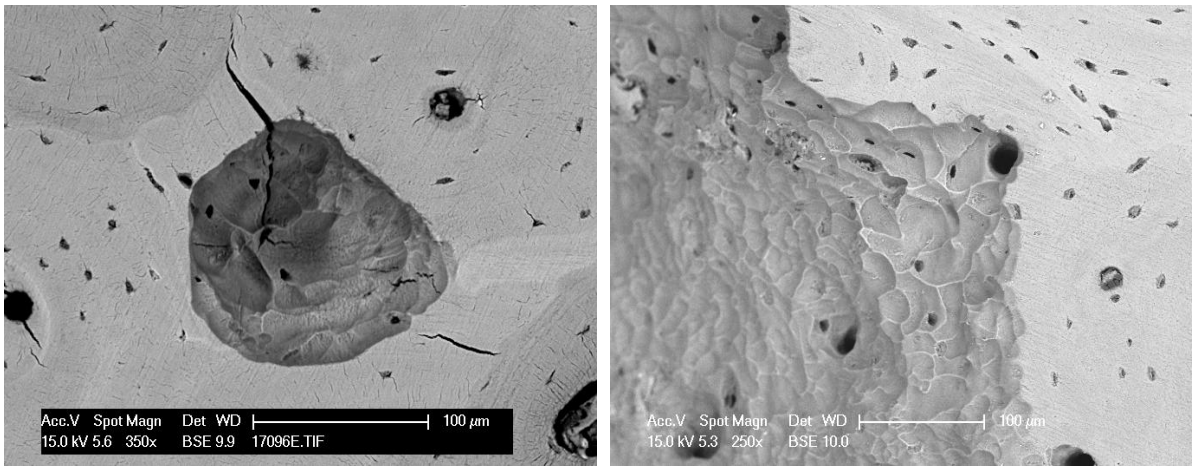
Dans la zone intra-corticale de l'échantillon CaB3 des petites zones déminéralisées ou hyperminéralisées, perforées de trous, ressemblent à des foci d'origine bactérienne (cf. Fig. 42 et 43).



Figures 39 et 40 : Photographies MEB, CaB3 ; Gauche ; Foci encadré. Droite : Agrandissement de la zone centrale encadrée (gauche), limite hyperminéralisée et perforations de petits trous.

D'autres formes d'altérations semblent d'origine biologique. Il s'agit de cavité, paraissant débuter de porosité existante (canaux de Havers ou lacune), plus ou moins étendues. Les cavités semblent creusées par des arcs de cercle progressifs aux limites saillantes et plus minéralisés. Ces traces se retrouvent sur l'ensemble des échantillons, y compris ceux plongés dans un milieu liquide et les ossements témoins. Ces contaminations sont vraisemblablement postérieures aux prélèvements, et à la réalisation de coupe, puisque les porosités d'où partent les traces, ne sont pas agrandies (cf. Fig. 44).

De plus, les porosités offrent une meilleure surface d'attaque que les surfaces planes (CULTB3). Un échantillon (FORV5) présente ce type de trace de façon extensive sur l'extérieur du périoste (cf. Fig. 45).



Figures 41 et 42 : Photographies MEB ; Gauche :(CultB3). Droite : zone externe du périoste complètement rongée (ForV5).

De plus, un os montre un motif d'altération en ligne brisé (BM1) formé vraisemblablement par une espèce fongique (cf. Fig. 46) (Fernandez-Jalvo *et al.*, 2010).

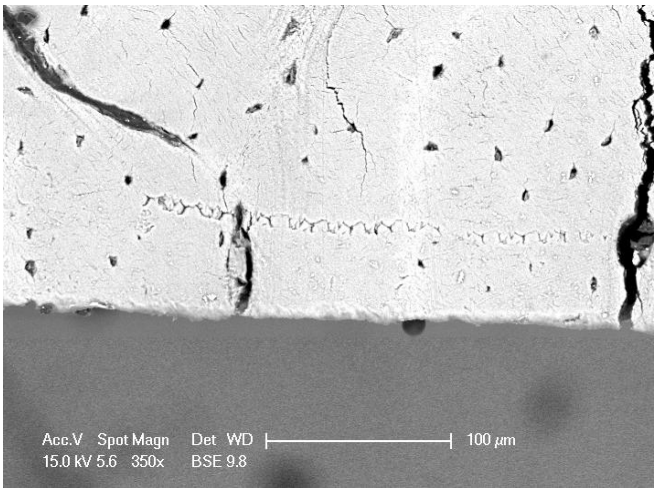
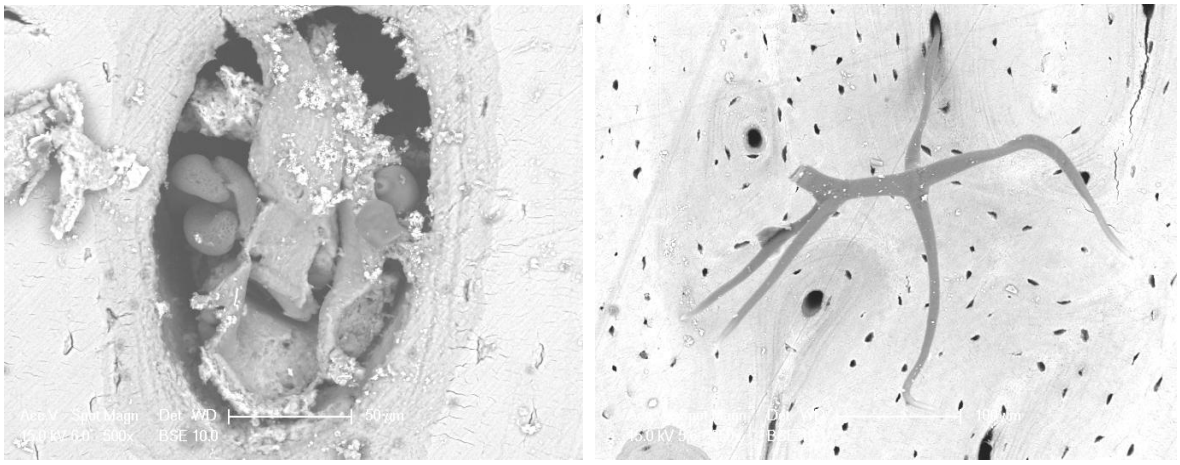


Figure 43 : Photographie MEB, BM, altération linéaire en zig-zag.

Quelques microorganismes, présents sur les ossements au moment de leur observation, peuvent être également source de destruction de l'os (cf. Fig. 47 et 48). Leur présence aurait tendance à indiquer qu'il trouve dans les ossements des éléments nutritifs nécessaires à leur survie. Il est difficile de dire quelles pourraient être leurs implications dans les altérations de surface observées.



Figures 44 et 45 : Photographies MEB, Gauche (CaB5, 50 µm). Droite (CultB7, 100 µm).

D Différences d'altérations :

Il est difficile de comparer les échantillons provenant de milieux différents et à temps de prélèvement égaux, puisqu'au sein d'un même milieu les échantillons présentent des états d'altérations divers. C'est le cas des ossements enfouis dans les sols calcaire, forestier et siliceux où les premiers prélèvements peuvent être plus altérés que les suivants. Les ossements provenant de ces sols sont néanmoins assez altérés (cf. ANNEXE E). Un temps d'enfouissement plus long auraient été nécessaire.
Un échantillon de veau, en milieu calcaire (CaV5), a été fortement altéré par les bactéries. Ceci peut être expliqué par une minéralisation moins importante des ossements de jeunes animaux. Cependant, il est difficile de comparer les altérations des ossements de bœuf et de veau, car, faute de temps, seuls deux échantillons de veau ont pu être étudiés.

A la différence des milieux d'enfouissement expérimentaux, les échantillons provenant des milieux de cultures témoignent d'une corrélation entre altérations et temps d'immersion. Une telle différence pourrait être due à des modifications très locales au sein même des milieux artificiels d'enfouissement. Il est certain que ces modifications locales doivent être plus importantes dans des milieux artificiels non contrôlés et encore plus au sein de milieux naturels.

Les ossements provenant des solutions KOH et HCl sont assez bien préservés (HI= 4 et5, cf. ANNEXE E) et montrent peu de différences entre les prélèvements. Cela peut être expliqué par la difficulté certaine de stabiliser les pH lors des expérimentations. De plus, les échantillons, dont les surfaces témoignent de quelques zones corrodées mais d'aucune attaque bactérienne, confirment que les zones altérées observées sur les échantillons enfouis sont effectivement des zones de corrosion.

L'os de cheval, quant à lui, ne montre aucune altération.

II Expérimentation d'ensemencements bactériens par le LRMH :

Des échantillons modernes ont subi des essais d'ensemencement avec plusieurs espèces de bactérie (*Bacillus sp.* : BG + et *Pseudomonas sp.* : BG-). Les résultats sont présentés dans le tableau suivant (cf. Tableau 6).

Type de bactéries	**Dénombrement (UFC/ml)**		
	1 mois	**2 mois**	**3 mois**
BG+	$1,68*10^7$	$1,3*10^7$	$2,4*10^7$
BG-	$4*10^8$	$1,5*10^8$	$3,6*10^8$
BG+		$4*10^6$	$2*10^6$
BG-		$7,8*10^8$	$3*10^8$
BG+			$1,5*10^6$
BG-			$1,5*10^8$

Tableau 6 : Dénombrement des ossements (d'après comm. pers. Orial, 2011).

Un échantillon par type de bactérie à trois mois de culture a été observé au microscope électronique à balayage et comparé à l'échantillon de référence.

Des petits foci (jusqu'à 10 µm) sont perçus. Sur les os altérés avec la *bacillus sp* quelques rares foci sont observés et ressemblent à ceux retrouvés sur les os archéologiques : limite hyperminéralisée avec une aire interne plus ou moins déminéralisée. Il en est de même avec les os altérés avec la *Pseudomonas sp ;* mais les foci sont encore moins nombreux (cf. Fig. 98). Ces foci, qui semblent correspondre aux lacunes ostéocytaires, ne comportent vraisemblablement par de traces de canaux. Les petits trous à l'intérieur des lacunes paraissent plus concorder avec la structure des ostéocytes. Ainsi, aucun indice n'indique que les bactéries soient à l'origine de ces altérations.
D'autres altérations sont perçues. Il s'agit de microfissures que l'on retrouve près des macrofissures et d'une sorte de piquetage de la surface accompagné de microfissures (Cf. Fig. 99 et 100). Ces altérations sont sans doute provoquées par le milieu dans lequel les os sont plongés.

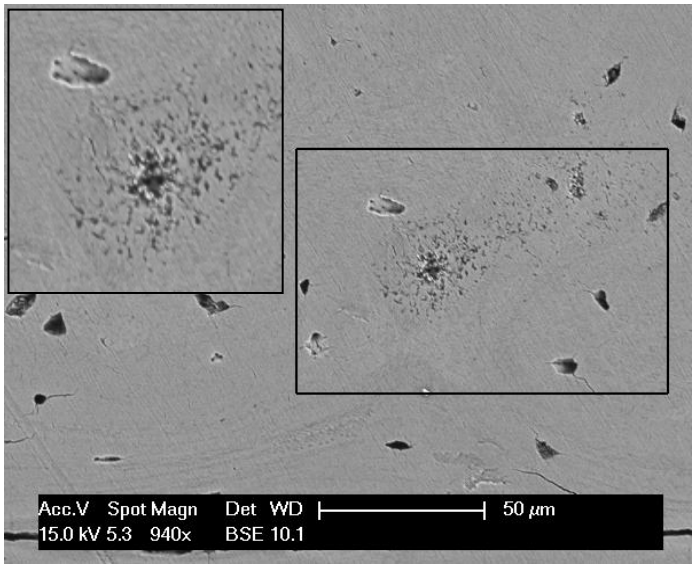
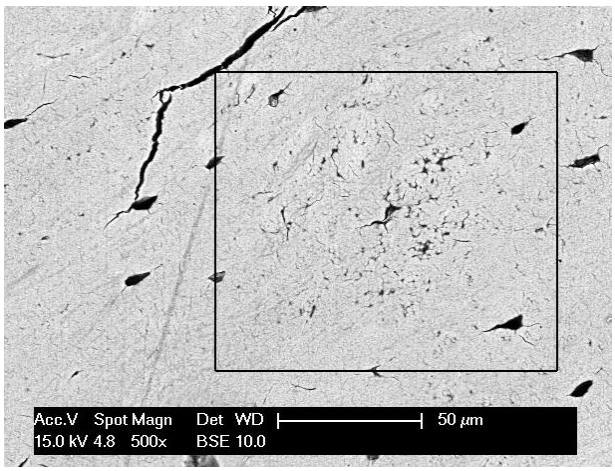
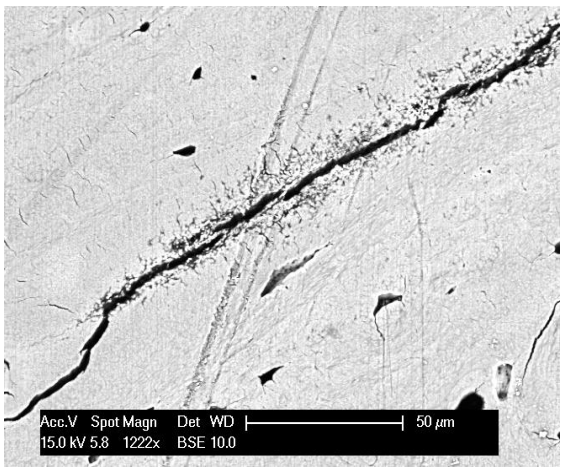


Figure 46 : Photographie MEB, BG + 3 mois ; foci serti d'un anneau hyperminéralisé au centre de l'image (grossissement à gauche) et zone piquetée.





Figures 47 et 48 : Photographies MEB, échantillon BG – 3 mois ; altérations piquetées et sous forme de microfissures.

L'expérience devrait être menée sur une période de temps plus longue et/ou avec un nombre d'organismes plus important au départ afin d'atteindre les niveaux d'altération avancée atteints par les ossements archéologiques.

Chapitre 2 : Le site de Song Terus

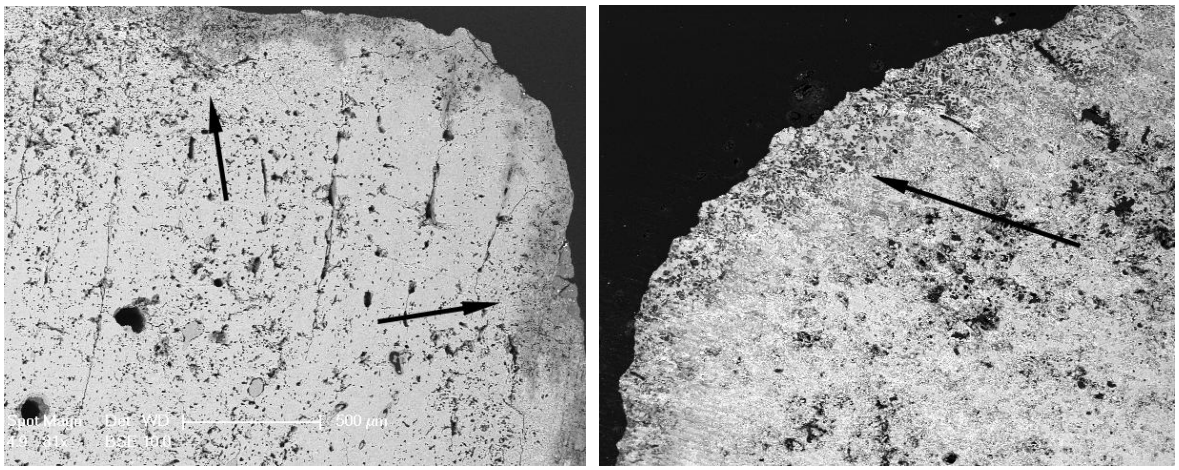
I Histologie osseuse :

Les échantillons du site de Song Terus étudiés par microscopie électronique à balayage dans le cadre ce mémoire, proviennent de deux zones : M8 et M10 (cf. Coupes ANNEXE B).

A Les ossements de la zone M8:

Les ossements de la zone M8 présentent de très importantes altérations bactériennes (HI= 0 pour ST06, STTA13, STTA14 et HI=1 pour STTA14) (Cf. ANNEXE F).

Description et distribution et des altérations : Globalement, les échantillons se caractérisent par des bords externes (zones du périoste, ZP et de l'endoste, ZE) beaucoup plus altérés que les zones intra-corticales (cf. Fig. 49 et 50). Cependant, de fines bandes sont parfois totalement préservées contre les parois extérieures (STTA02 et STTA13).



Figures 49 et 50 : Photographies MEB ; Gauche (STTA14) ; droite (ST06), zones d'altérations plus concentrées sur les limites externes de l'os (500 µm).

Selon le type d'altération, deux zones sont distinguées :

Les parties externes de l'os, plus sujettes aux apports provenant du milieu environnant, se caractérisent par des nappes déminéralisées et hyperminéralisées de taille variables (environ 20-100 µm). Les premières, moins denses, se repèrent sur les photographies MEB en mode BSE par leur couleur gris foncé, tandis que les secondes sont blanches (cf. Fig. 51 et 52).

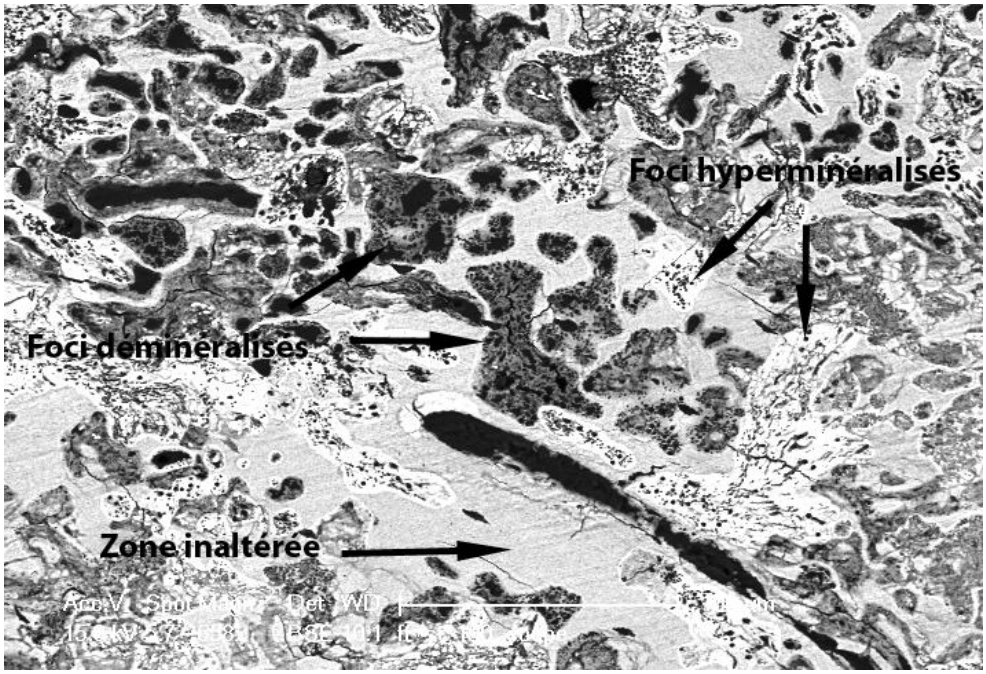


Figure 51 : Photographie MEB, STO6 ; visualisation des différents types d'altération, zones hyperminéralisées, déminéralisées et inaltérées, zones de chevauchements (haut gauche, bas droite et gauche) (50 µm).

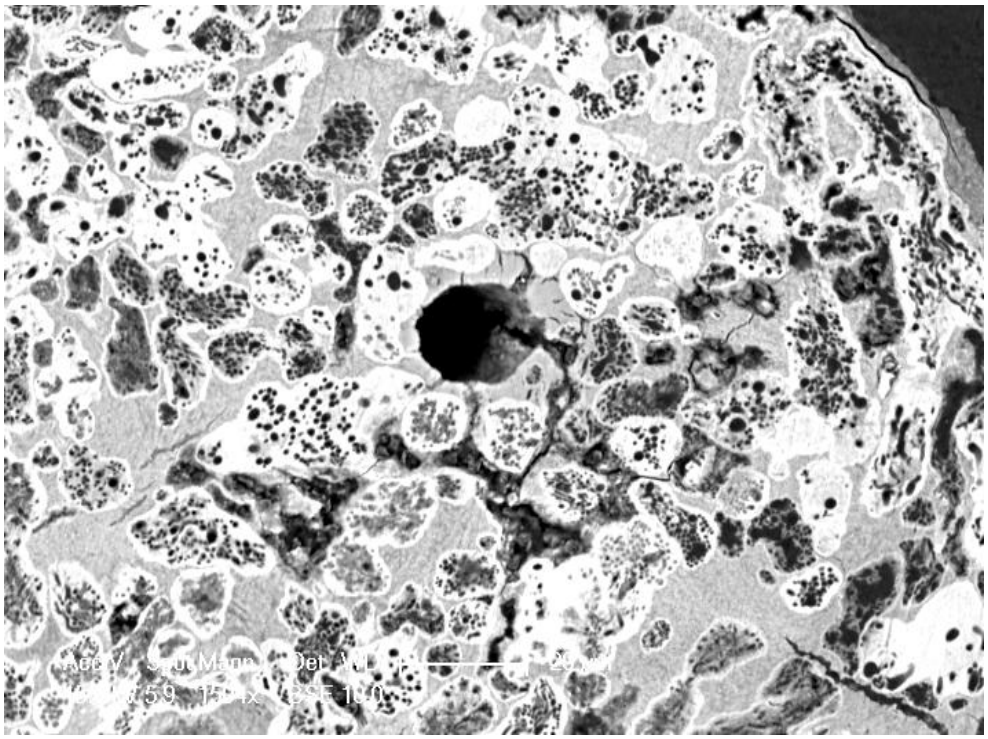
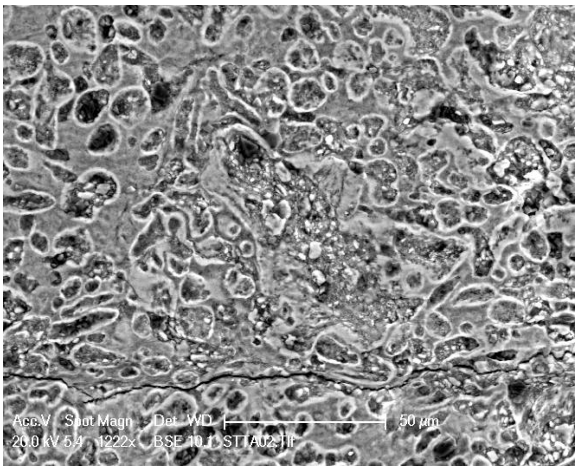


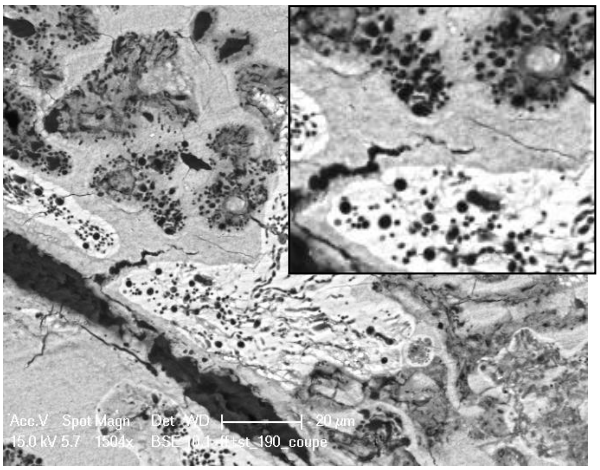
Figure 52 : Photographie MEB, STTA02 ; surface recouverte de zones hyperminéralisées et déminéralisées qui s'ordonnent autour du canal de Havers (20 µm).

Avec le logiciel image J, il a été possible de préciser l'étendue des altérations des différents types de zones (inaltérées, déminéralisées et hyperminéralisées) par des modifications de couleur ou des sélections de zone et de faire le calcul des aires correspondantes. Cette méthode, appliquée pour l'échantillon ST06 sur une zone représentative, a permis de préciser que les aires, inaltérées, déminéralisées et hyperminéralisées, représentent respectivement environ 19 % (39027 µm), 40 % (15955 µm) et 41 % (7536 µm) de la surface (cf. ANNEXE D).

La zone interne se caractérise par des foci plus petits (une dizaine de µm) et généralement à contenu recristallisé (cf. Fig. 53).
Les cavités, à l'intérieur des foci, plus rares dans les zones de recristallisation, exhibent deux tailles de diamètre (1 µm et moins de 0,5 µm). Cette bimodalité a été observée par Jackes (Jackes *et al.*, 2001) et a été identifié comme étant façonnés par les bactéries *Clostridium Histolyticum* qui sont anaérobiques et actives dans le sol et les intestins. Elles produisent des spores ovales causant un boursouflement de la cellule, créant ainsi des pores plus larges. Des canaux sont également visibles et présentent des trajectoires variables, parfois assez rectilignes ou plus ou moins sinueuses (cf. Fig. 54).

Les chevauchements fréquents des zones d'altérations montrent plusieurs vagues de développent de micro-organismes qui pourrait traduire plusieurs apports successifs lors de variation d'humidité (cf. Fig. 51 et 52).



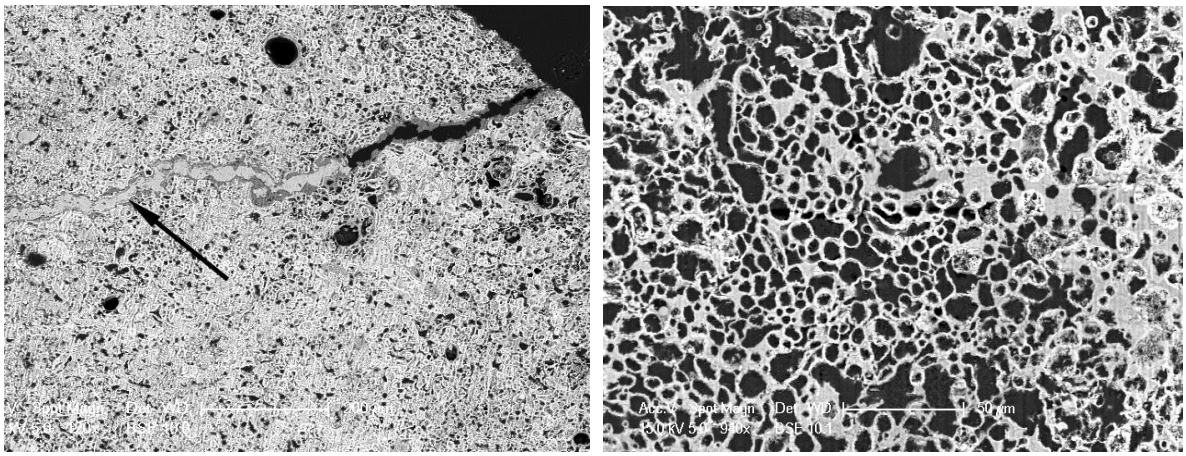


Figures 53 et 54 : Photographies MEB ; Gauche (STTA02) : Foci recristallisés (50 µm) Droite (ST06) : bimodalité des diamètres des trous dans les zones déminéralisées et hyperminéralisées (20 µm).

Porosité et fissurations : La porosité est très largement augmentée dans les échantillons fossiles (STTA13 : cf. Fig. 56 et STTA14). Cette augmentation peut renseigner sur le niveau d'altération de ces os. La porosité de l'échantillon STTA13 représente 43 % de la surface totale (Image J, cf. ANNEXE D). Cette valeur est très importante en comparaison de celle d'un échantillon dont la

structure histologique est bien préservée et dont la porosité ne représente qu'environ 15% de la surface (BZ2011-01, cf. ANNEXE D). La porosité des autres échantillons est complètement dissimulée par les altérations qui recouvrent cette première (STTA02, ST06).

De plus, de larges fissures qui peuvent être remplies de calcite (STTA13: cf. Fig. 55) ou de sédiment (STT02, ST06 et STTA13) parcourent les échantillons. Les dépôts témoignent de leur ancienneté.



Figures 55 et 56 : Photographies MEB, STTA13; Gauche : fissure centrale remplie de calcite (200 µm). Droite : surface très altérée par les micro-organismes, porosité très importante (50 µm).

Eléments exogènes : Certains échantillons laissent supposer, en comparant alternativement photographies binoculaires et MEB, que les limites externes de l'os, imprégnées de manganèse, présentent des états d'altération bactérienne plus avancés (cf. Fig. 49). Dans ces zones périphériques, les analyses EDS montrent clairement que les foci déminéralisés contiennent des inclusions de manganèse (cf. Fig. 57).

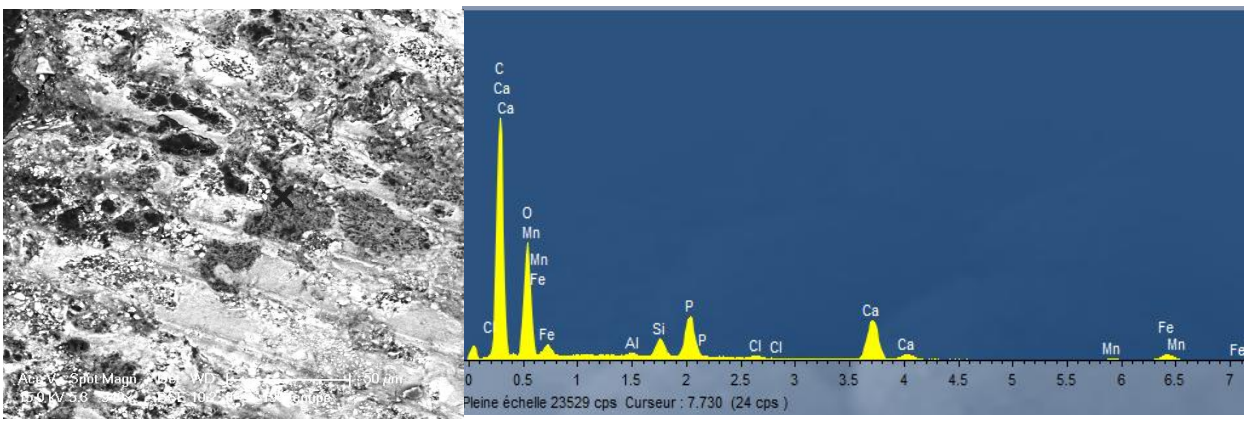


Figure 57 : Photographie MEB et spectre (abscisse en keV) associés, ST06 ; présence de manganèse dans la zone déminéralisée (50 µm).

Des inclusions de manganèse et de fer plus ponctuelles sont également visibles sur la structure (STTA14, cf. Fig. 58) ; sur l'échantillon STTA02, elles se retrouvent dans certains canaux de Havers associées à du silicium et de l'aluminium (cf. Fig. 59).

Des dépôts de calcite, non seulement dans les porosités et les fissures mais aussi sur la surface (STTA02, cf. Fig. 60) sont perçus ainsi que de fluor en légère quantité sur les surfaces osseuses des échantillons STTA06 et STTA14 (STTA14, cf. Fig. 58).

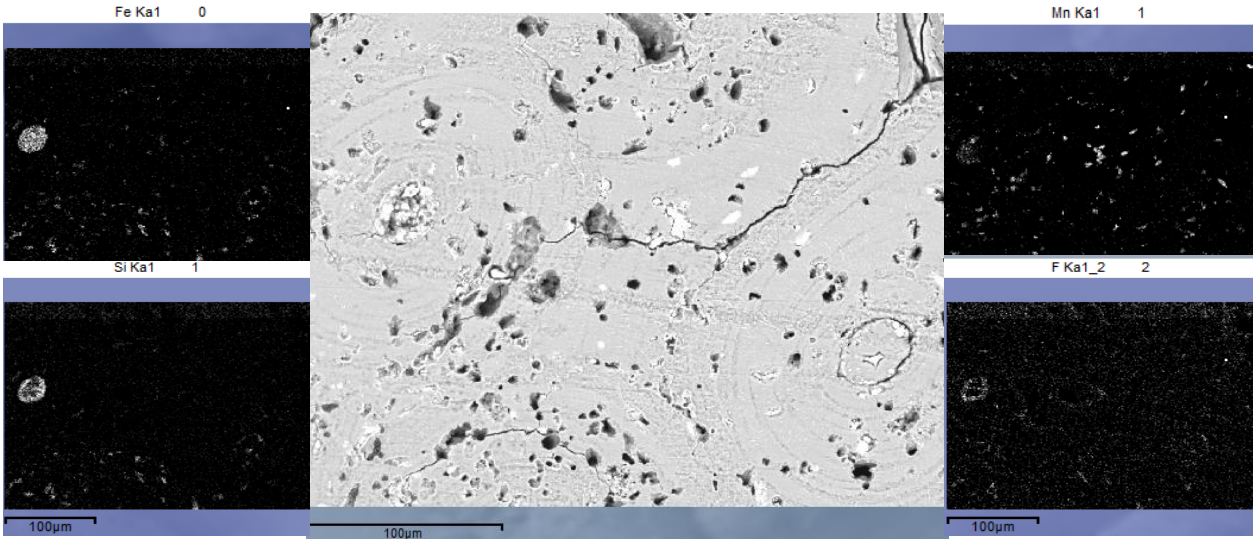


Figure 58 : Photographie MEB et cartographie associées, STTA14 ; pour le Mn, Fe, F et Si.

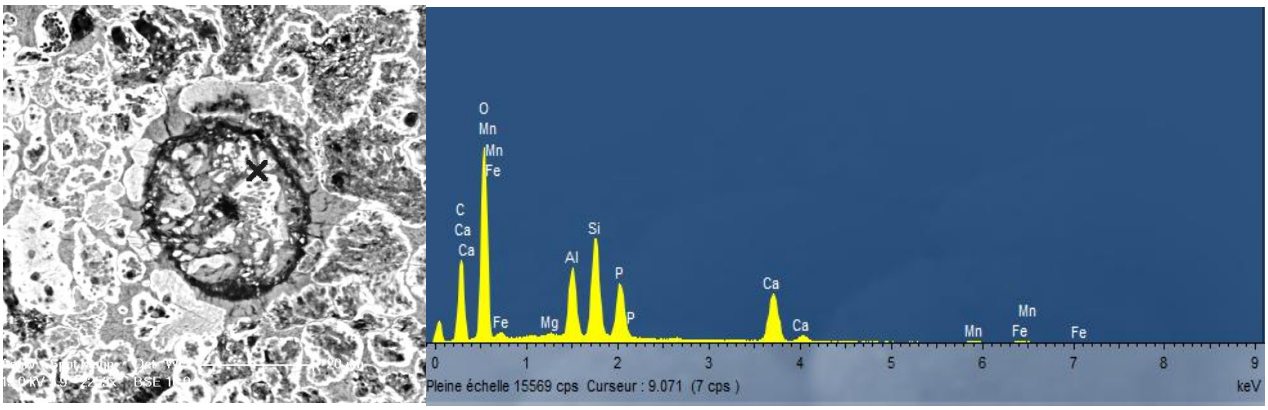


Figure 59 : Photographie MEB (20 µm) et cartographie associées, STTA02 ; canaux de Havers remplie de Mn, Fe, Si et Al.

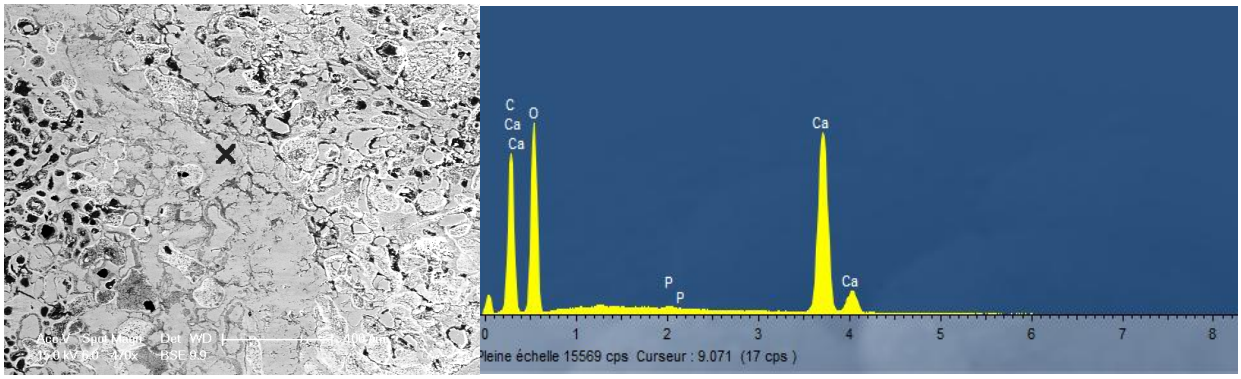


Figure 60 : Photographie MEB (100 µm) et spectres associés (abscisse en keV), STTA02 ; Imprégnations de calcite sur tout le surface osseuse.

B Les ossements de la zone M10:

Les ossements de la zone M10 (STTA08, 17, 18, 20, 22), située plus au fond de la grotte que la zone M8, sont globalement moins altérés (cf. Fig. 61).

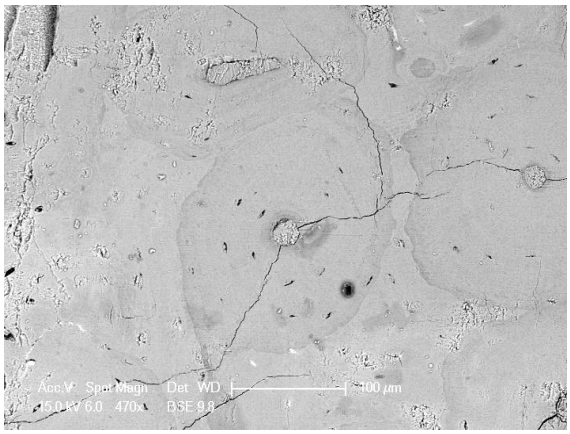
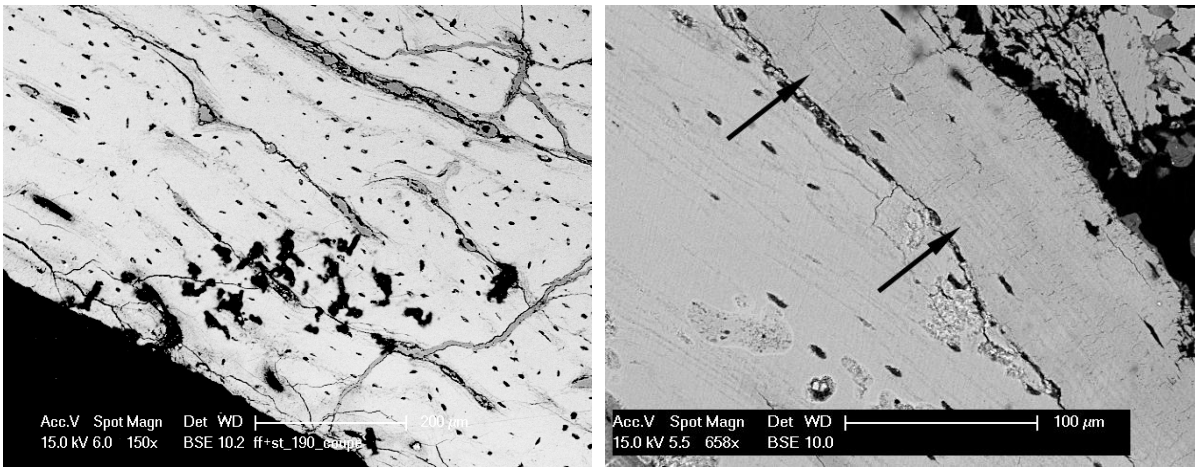


Figure 61 : Photographie MEB, STTA08 ; structure histologique très bien préservée (100 µm).

Toutefois, les échantillons STTA17 et 18, situés plus en haut de la couche (cf. tableau Partie 2), présentent des altérations plus importantes comme le montre l'indice de préservation (HI 2 et 4 respectivement). Les autres ossements ont un HI d'une valeur de 5 (cf. ANNEXE F).
Les altérations observées sont principalement de deux types : fongiques et bactériennes.

Altération de type fongique : les échantillons STTA18 et STTA20 ont la particularité de présenter, au niveau de leur périoste, des altérations de type fongique correspondant aux canaux de type Wedl (Hackett, 1981). Ces canaux se présentent sous la forme de courts et larges canaux (environ 10 x 20-40 µm) sur l'échantillon STTA20 (cf. Fig. 62). Ces derniers sont rares pour STTA18 lequel est surtout caractérisé par des perforations circulaires (environ 10 µm). Formées par de petites encoches, les perforations circulaires, de par leur proximité, semblent former les canaux.

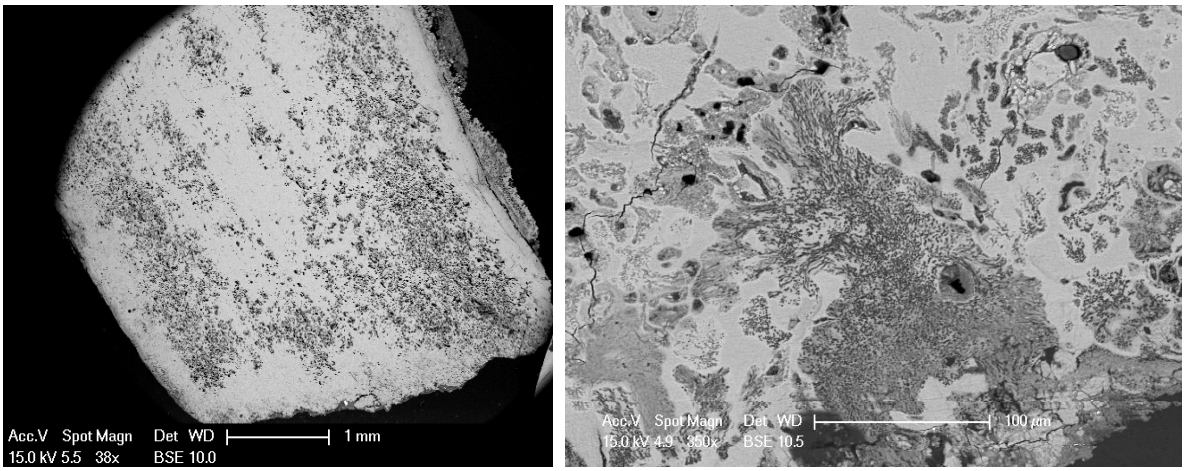
Les altérations de l'échantillon STTA17 ressemblent au type de stigmate laissé par des lichens ou des mousses (cf. Fig.63) caractérisé par des microfissures perpendiculaires à l'os (Fernandez-Jalvo *et al.*, 2002).



Figures 62 et 63 : Photographies MEB ; Gauche (STTA20) : altérations de type fongique (200 µm). Droite (STTA17) : altérations sous forme de microfissures type mousse ou lichen.

Altérations bactériennes : Deux échantillons présentent des altérations bactériennes. Ces altérations sont très localisées pour l'échantillon STTA18 (cf. Fig. 65). Cependant, l'échantillon STTA17 présente des états d'altérations bactériennes beaucoup plus importantes (cf. fig. 64).

Pour ces deux échantillons, on remarque que les trous à l'intérieur des foci ont tous la même taille (inférieure à 0,5 µm) contrairement à ceux de la première zone.



Figures 64 et 65 : Photographies MEB ; Gauche (STTA17) : état différentiel d'altération de la structure osseuse. Droite (STTA18) : zones déminéralisées et hyperminéralisées (100 µm).

Fissurations : La plupart des échantillons sont parcourus par de nombreuses macro et microfissures sur l'ensemble de leur structure. Les plus larges sont préférentiellement localisées dans la zone intra-corticale et sont perpendiculaires à la surface externe (STTA18, STTA20, cf. Fig. 66).

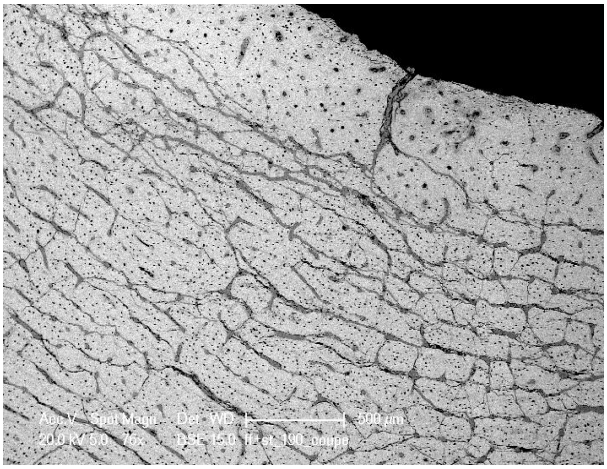


Figure 66 : Photographie MEB, STTA20 ; larges fissures longitudinales couvrant toute la zone intra-corticale (500 µm).

La présence de calcite dans ces dernières indique qu'elles sont anciennes. Elles sont probablement causées par des stress physiques comme le piétinement et la compression du sol (Jans *et al.*, 2002). De faibles pressions pourraient expliquer que les fissures suivent la structure osseuse. Certaines fissures (STTA18 : cf. Fig. 67), situées près de la cavité médullaire, ne contiennent pas de dépôt de calcite et sont perpendiculaires à l'axe longitudinal de l'os. Elles pourraient évoquer une pression physique importante agissant dans l'axe de ces fissures comme la fouille et/ou la préparation des ossements.

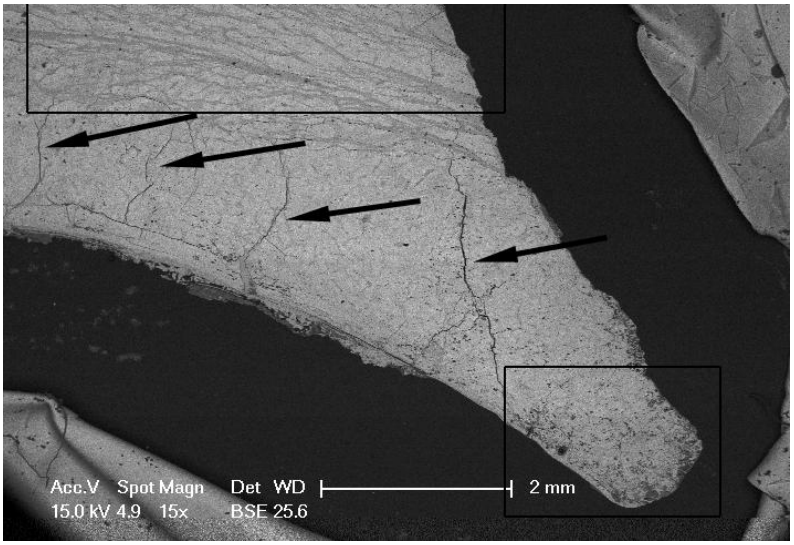


Figure 67 : Photographie MEB, STTA18 ; fissures perpendiculaires vides (flèches), parallèles remplies de calcite (encadré haut) et altérations bactériennes (encadré bas).

Porosité et éléments exogènes : Les imprégnations de calcite, parfois importantes dans les canaux de Havers et fissures (cf. Fig. 68), impliquent une réduction des macro et microporosités et donc une réduction des échanges avec le milieu environnant et par conséquent une altération globale moindre puisqu'empêchant des apports en micro-organismes. Différents échantillons présentent des pores vides dans les parties périphériques (STTA20 et STTA18). Cette absence de calcite pourrait être liée à des phénomènes antérieurs de dissolution causés par le ruissellement et l'humidité.

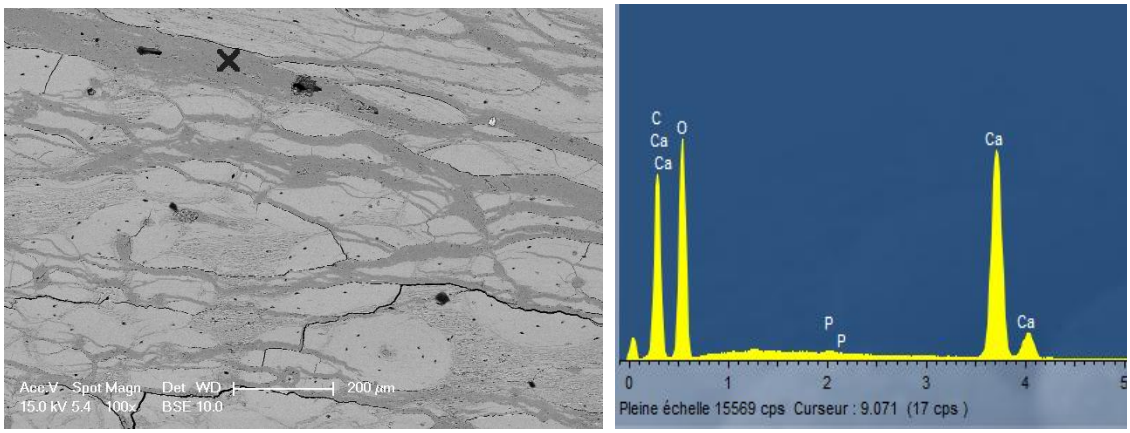


Figure 68 : Photographie MEB et spectres associés (abscisse en keV), STTA18 ; surface osseuse très fracturée et imprégnée de calcite (200 µm).

C Conclusion:

Les altérations, observées au MEB lors de cette étude, révèlent des différences entre les deux zones. Les ossements de la zone M8 présentent des altérations bactériennes très importantes sur toute la structure de leur surface transversale. Tandis que les échantillons de la zone M10, dont la majorité a une structure histologique bien préservée, montrent plutôt des altérations de type fongique. Seul un échantillon est clairement attaqué par les bactéries.

Les facteurs à l'origine des différents niveaux d'altération et la présence de divers types de micro-organismes peuvent être multiples.

Localisation : La situation de la zone M8, plus en avant de la grotte (Gallet, 2004) et donc plus sujette aux vagues d'humidités, pourrait expliquer la forte altération des ossements y gisant. *A contrario*, les ossements de la zone M10 étant davantage protégés ; les altérations sont moindres. Les altérations plus prononcées retrouvées sur certains échantillons pourraient être dues à leur position plus haute au sein de cette dernière (cf. Tableau Partie 2).

Mode d'accumulation : L'ensemble des échantillons proviennent théoriquement d'accumulation d'origine humaine puisqu'associé à des industries paléolithiques (Gallet, 2004). Les actions humaines,

telles un démembrement rapide, auraient pu limiter le développement de bactéries et entrainer les différentes altérations constatées entre les deux zones. En effet, le démembrement rapide, inhérent au traitement des carcasses destinées à la consommation, limite la prolifération des bactéries endogènes. De part la sous représentation des bactéries du sol, les champignons seront plus disposés à attaquer les ossements. Dépendants de certaines conditions comme la présence d'oxygène et d'humidité, il peut être estimé que les ossements se seraient trouvés soit à la surface, soit dans des niveaux proches de celle-ci et dans des zones suffisamment humides lors des attaques.

De même, un abandon des ossements dans des zones de rejet fortement humiques favorisent le développement des champignons qui sont plus aptes à vivre dans ces milieux acides que les bactéries (cf. partie 1) (Gutierrez, 2001 ; Trueman & Martill, 2002 ; Jans *et al.*, 2004 ; Nielsen-Marsh *et al.*, 2007).

Manganèse/bactéries : Trois ossements montrent des dépôts de manganèse importants en surface d'après les analyses PIXE (ST06 et STTA14 dans la zone M8 et STTA20 dans M10). Les attaques bactériennes de ces deux premiers échantillons sont plus importantes là où le manganèse s'est déposé. L'ossement STTA20 ne présente pas d'attaque bactérienne.
Deux facteurs peuvent induire des dépôts de manganèse :
Une origine environnementale : Le manganèse, abondant dans les roches calcaires, peut reprécipiter à la surface des ossements par l'intermédiaire de l'eau.
Une origine biochimique : Les micro-organismes peuvent être impliqués dans ces dépôts à la surface des ossements par la libération d'ions de manganèse lors de la transformation de molécules (Gutierrez, 2001 ; Denys, 2002 ; Reiche, 2003 ; Lopez-Gonzales *et al.*, 2005).
Les deux facteurs peuvent influer puisque certains échantillons, sans altération bactérienne, présentent des dépôts de manganèse.

II Analyses élémentaires (PIXE):

Différents échantillons (ST2011-06, STTA14, 17, 18, 20 et 22) ont subi des analyses PIXE (cf. Coupes ANNEXE C). Les valeurs obtenues par cette méthode sont synthétisées dans le tableau suivant (cf. Tableau 7) par les valeurs moyennes, maximales et minimales de concentration. Les données provenant des ossements archéologiques seront comparées à un échantillon moderne (Reiche *et al.*, 1999).

Ech.	Zone M8		Zone M10				Moderne
	ST2011-06	STTA14	STTA17	STTA18	STTA20	STTA22	
Ca	**417953** 426384 413593	**424838** 440916 397636	**426316** 448519 422460	**462259** 538320 428174	**443793** 454679 431359	**432910** 469394 412851	382000-386000
P	174117 178536 166762	*160649* 168538 107159	170128 173565 156610	148137 168213 103115	159769 166399 152193	163887 169716 143738	178000-180000
Na	3173 3948 1794	3720 4729 2469	4830 5771 3371	4269 6435 2708	3464 5279 2827	5445 9470 4153	5000-8000
Mg	1044 1720 355	1347 1951 816	1235 1639 680	1522 2298 712	1065 1471 501	1370 1897 744	3000-8000
Al	**835** 1602 241	**1391** 10418 552	**845** 1204 471	**1045** 5604 453	**1072** 1365 620	**1118** 4632 700	-
S	1056 1532 637	1099 1767 485	899 1841 428	604 887 295	464 588 264	1036 1344 664	1600
Cl	**1312** 3253 792	**1934** 26644 410	840 2506 320	467 894 168	**2834** 15976 133	**2565** 23253 921	700-1000
Mn	**1534** 4101 68	**7486** 28762 67	**41** 167 10	**28** 139 12	**1072** 5977 16	**232** 834 11	-
Fe	**1210** 3180 218	**4460** 22906 13	**53** 387 7	**129** 2224 8	**432** 1845 13	**176** 2585 12	-
Cu	**18** 34 6	**34** 88 12	**19** 33 11	**21** 44 15	**27** 45 16	22 32 8	-
Zn	119 149 84	114 145 85	106 160 80	82 114 48	85 110 67	79 98 62	130
Sr	**701** 881 574	**693** 786 498	**727** 923 577	**639** 884 436	**550** 598 488	511 612 400	200-500
Pb	**29** 46 14	**48** 106 28	**26** 50 16	**58** 187 24	**34** 46 15	**29** 59 16	-
U	**103** 160 62	**138** 207 75	**102** 177 42	**86** 154 20	**81** 116 26	**106** 152 57	-
Ca/P	**2,4**	**2,7**	**2,5**	**3,2**	**2,8**	**2,6**	2,1-2,2

Tableau 7 : Concentration en éléments (moyennes, maximales et minimales) pour les échantillons de Bize-Tournal en comparaison avec celles d'un os moderne (Reiche *et al.*, 1999), les valeurs en gras et soulignées sont respectivement supérieures ou inférieures à celle de l'échantillon moderne de référence.

A Concentrations en éléments :

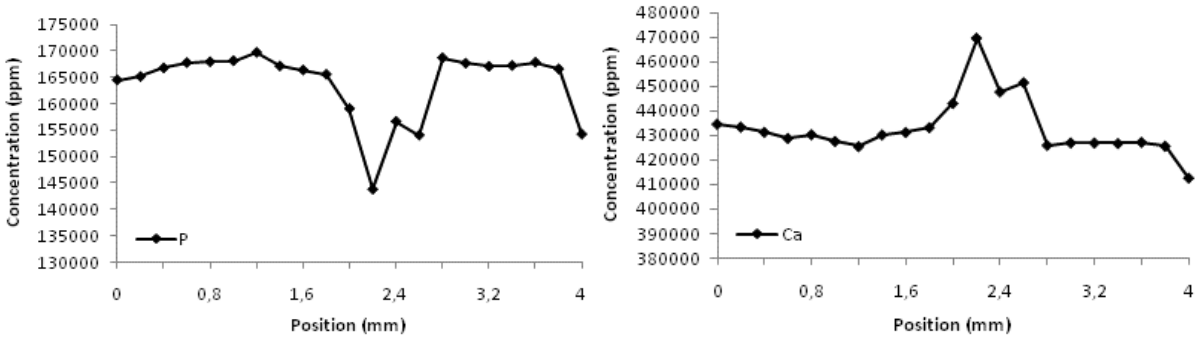
Types de profils de concentration : A l'aide des différentes concentrations en éléments au sein des échantillons, des profils sont établis. Différents types de profil ont pu être observés :

Des profils en U ou U inversés qui indiquent que les extrémités, périoste et endoste, présentent soit des enrichissements ou des appauvrissements en éléments.

Des profils irréguliers (linéaires, aléatoires, croissants et décroissants) qui montrent des pénétrations en éléments au cœur de l'échantillon.

Des profils plats qui témoignent d'un élément non altéré ou contaminé de façon homogène (Reiche *et al.*, 1999).

Eléments présents dans l'os in vivo : Les profils Ca et P, y compris pour les échantillons STTA20 et STTA22 qui ont une structure histologique très bien préservée, sont irréguliers (cf. Fig. 69 et 70). Cela peut témoigner d'une structure minérale altérée.



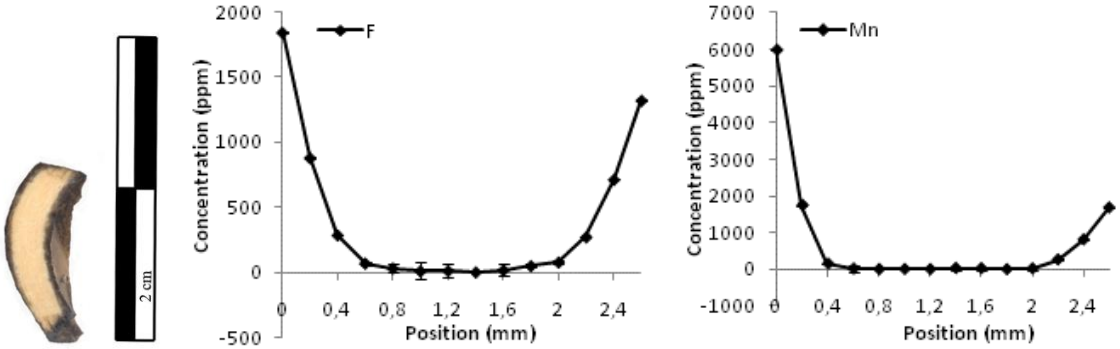
Figures 69 et 70 : Profils de concentration (STTA22) en calcium (gauche) et phosphate (droite).

Il est constaté que le rapport Ca/P, calculé pour chaque échantillon et qui s'échelonne de 2,4 à 3,2, présente une valeur supérieure à l'échantillon moderne (cf. tableau 7) et au rapport théorique d'un os inaltéré qui est de 2,15 (White & Hannus, 1983). Ces résultats s'expliquent par une augmentation de la teneur en calcium associée à une légère diminution du phosphate au sein des échantillons. Ceci peut s'expliquer par les nombreux dépôts de calcite qui sont observés au MEB et notamment à la surface de l'échantillon STTA18 (cf. Fig. 67).

Les autres éléments contenus également au sein des ossements *in vivo* et se caractérisant par leur profils irréguliers, se retrouvent affaiblis (Na, Mg, S et Zn) ou augmentés (Cl, Sr) dans les ossements archéologiques par rapport à l'os moderne. Les faibles concentrations des Na et Mg dans les échantillons sont fréquemment observées et s'expliquent par leur forte solubilité en milieu terrestre (Reiche *et al.*, 1999).

Eléments exogènes : Certains éléments, absents dans les os *in* vivo, se retrouvent dans les échantillons (Al, Mn, Fe, Cu, Pb, U). Ces éléments traces, provenant du sol, sont régulièrement mis en évidence au sein d'ossements affectés par la diagenèse (Reiche *et al.*, 1999).

Les Fe et Mn, se déposent essentiellement à la surface des os comme en témoignent leur profil en U. La couleur brun-noir des surfaces des ST06, STTA14 et STTA20, est confirmée par de très fortes concentrations de manganèse au niveau des périoste et endoste (cf. Fig. 71, 72 et 73). Le fer est également en concentration assez importante dans les ST06 et STTA14.



Figures 71, 72 et 73 : Coupe transversale et profils de concentration (STTA20) en manganèse (gauche) et fer (droite).

Les Cu et Pb mettent en évidence une pénétration au cœur de l'os (en quantité minime) comme le montrent les profils irréguliers. L'Al, quant à lui, pénètre profondément certains ossements (ST06, STTA 17 et 20) ou reste à la surface pour d'autres (STTA14, 18 et 22).

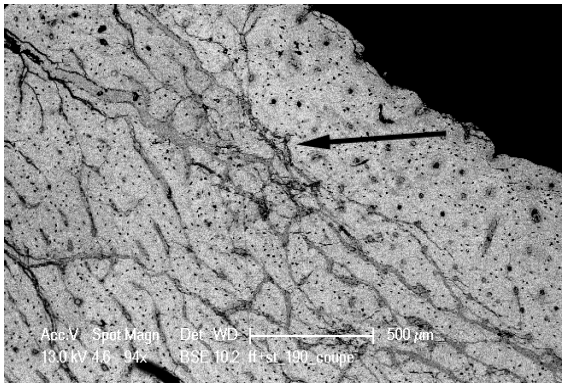
Les données PIGE n'ont pas été intégrées dans cette étude faute de temps. Cependant, des analyses PIGE antérieures (Lebon, 2010) indiquent que les échantillons des niveaux Tabuhan sont enrichis en fluor.

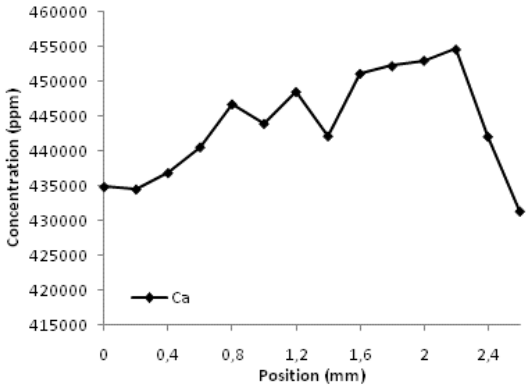
B Comparaison MEB/PIXE :

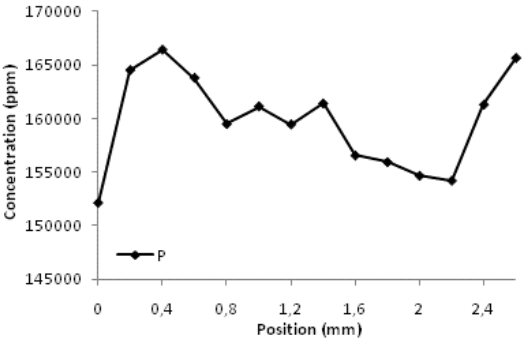
Les photographies MEB peuvent dans certains cas se corréler de très près aux données PIXE. C'est le cas de l'échantillon STTA20 (cf. Fig. 74) qui est imprégné de calcite au niveau des fissurations dans la zone intra-corticale, caractérisée au PIXE par une augmentation de la concentration en calcium (cf. Fig. 75 et 76).

Les échantillons ST06, STTA14 et 17, fortement altérés par les micro-organismes, présentent des concentrations en Ca moindres et une augmentation des teneurs en éléments tels que le Zn et Sr. Au contraire, STTA18, 20 et 22 qui ont une conservation relativement bonne de leur structure histologiques, présentent des teneurs plus importantes en Ca, et des concentrations globalement plus faibles en Zn Sr. Cet enrichissement en Ca peut s'expliquer par l'infiltration de calcite au sein des porosités naturelles de l'os. Les plus faibles teneurs en éléments exogène au sein de ces échantillons

pourrait s'expliquer par des échanges avec le milieux extérieurs rendu moins important suite à un comblement des porosités de l'os par de la calcite.







Figures 74, 75 et 76 : Photographie MEB, STTA20, 500 µm, Imprégnations de calcite dans la zone intra-corticale. Profils de concentration (STTA20) en calcium et phosphate.

Les processus diagénétiques ont ainsi fortement altéré les échantillons bien que des photographies MEB peuvent suggérer le contraire au vue de l'excellente conservation histologique de certains échantillons. Ainsi, des phénomènes physico-chimiques sont principalement rencontrés au sein de ces échantillons.

Chapitre 3 : Le site de Bize-Tournal

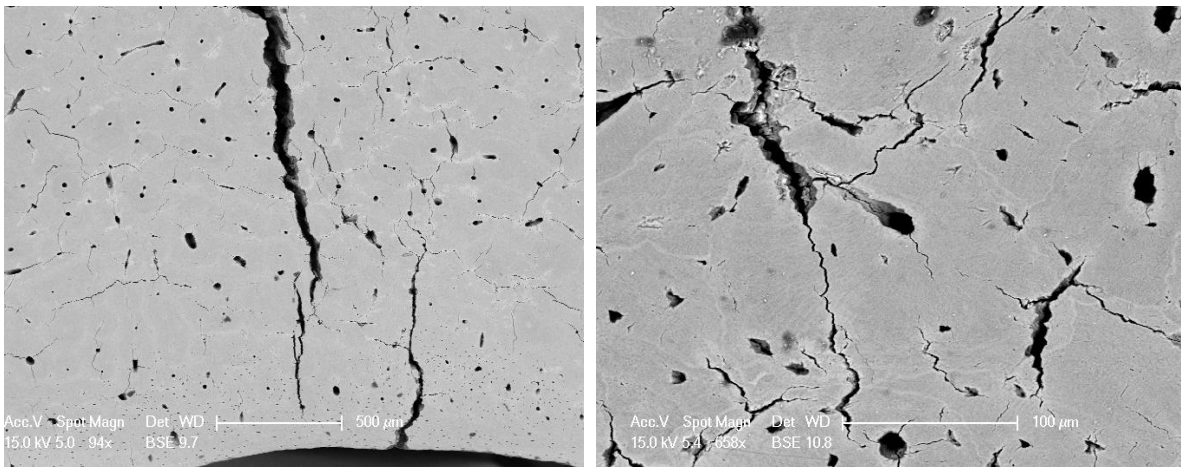
I Histologie osseuse :

Les ossements étudiés proviennent de deux niveaux archéologiques distincts : les niveaux G et H (cf. Coupes ANNEXE B) .

A Les ossements du niveau G :

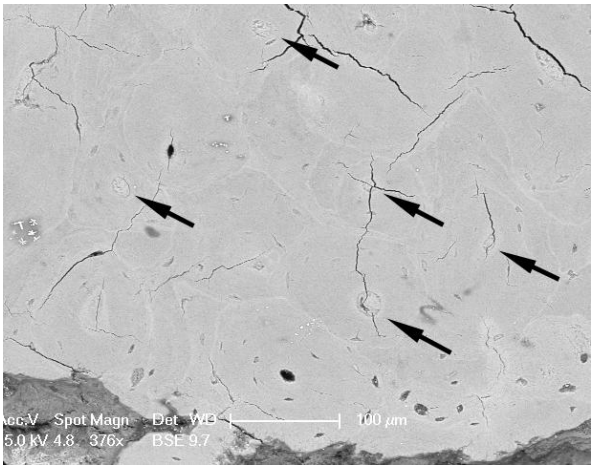
Les échantillons, localisés dans les couches 1 et PJI, se caractérisent par une très bonne conservation de la structure histologique comme le montre l'indice de préservation égal à 5 (BZ2011-01, BZ2011-03 et BZ30-18) (cf. ANNEXE F).

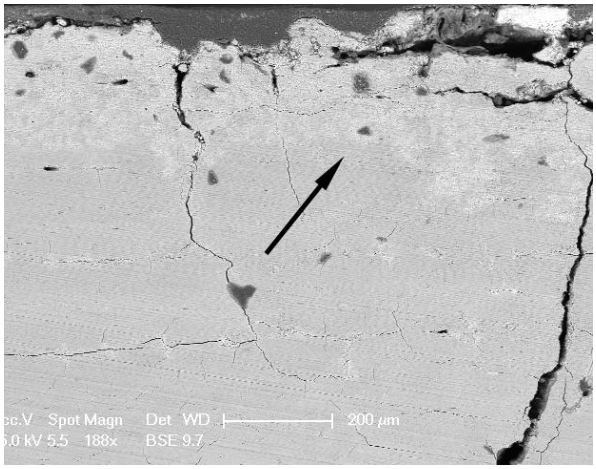
Porosité et fissuration : Les échanges avec le milieu environnant sont encouragés par la porosité qui reste globalement normale et les fissures, nombreuses (cf. Fig. 77 et 78). La porosité de l'échantillon BZ2011-01, dont l'aire totale a été calculée avec le logiciel Image J, est de 15% (Cf. ANNEXE D). Les microfissures sont abondantes et ne suivent pas la structure osseuse sauf certaines qui contournent clairement les ostéons. Il est difficile de déterminer l'origine des larges fissures de la zone intra-corticale qui sont vides de tout dépôt.



Figures 77 et 78 : Photographies MEB ; Gauche (BZ2011-01) : macrofissures (500 µm). Droite (BZ2011-03): microfissures (100 µm).

Concentration en éléments : Des dépôts, plus ou moins importants de calcite comblant canaux de Havers et lacunes ostéocytaires au niveau des périostes, témoignent de phénomènes de ruissellement. C'est le cas de l'échantillon BZ2011-01 où les dépôts de calcite sont prégnants au niveau du périoste (cf. Fig. 79). Un bandeau plus dense, donc plus minéralisé, suit également le périoste (cf. Fig. 80).





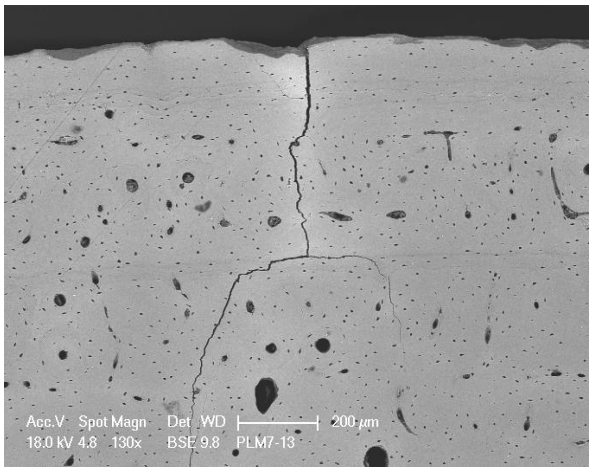
Figures 79 et 80 : Photographies MEB, BZ2011-01 ; Gauche : calcite comblant canaux de Havers (100 µm). Droite : bandeau hyperminéralisé (200 µm).

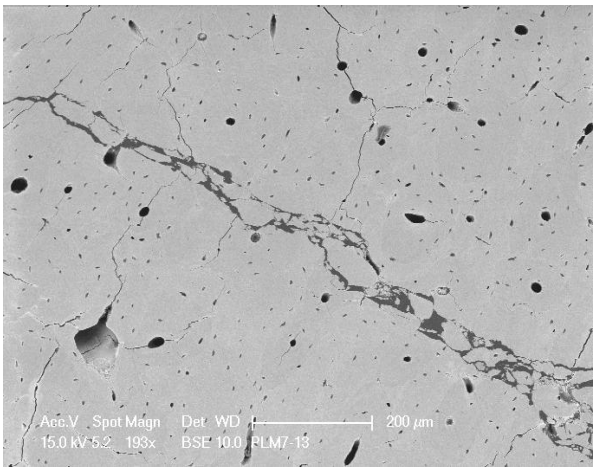
B Les ossements du niveau H :

Les ossements proviennent de la couche I (BZ2011-14, 15, 16 et 19) et d'une couche indéterminée (BZ2011- 21, 22, 23, 24 et 25) appartenant vraisemblablement au niveau H de part l'étude taphonomique réalisée (P. Magniez, comm. pers.).

Couche I: Les échantillons BZ2011-14, 16 et 19 ont une structure histologique très bien conservée (HI=5) au contraire de BZ2011-15, très altéré (HI=0) (cf. ANNEXE F).

Pour les trois premiers, seules de larges fissures, traversant les ossements, peuvent être causées par les fouilles ou les préparations. Les microfissures, quasiment absentes, peuvent en effet témoigner de la bonne conservation de la structure minérale (cf. Fig. 81 et 82).



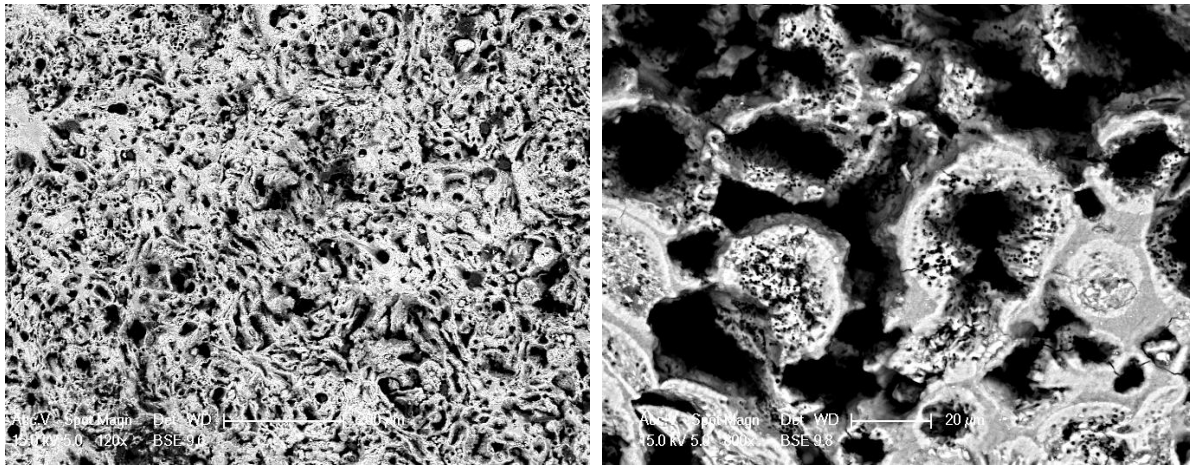


Figures 81 et 82 : Photographies MEB ; Gauche (BZ2011-19) et droite (BZ2011-14) : structure histologique très bien conservée parcourue de larges fissures.

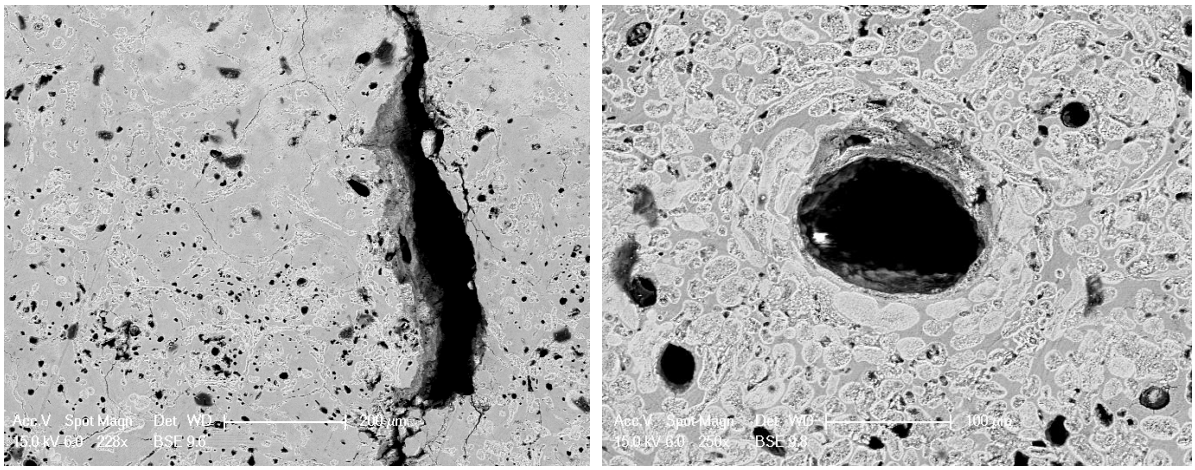
L’échantillon BZ2011-15, quant à lui, expose une structure entièrement touchée par les attaques. La zone intra-corticale, complètement perforée, montre une porosité beaucoup plus importante que sur les limites externes de l’os (cf. Fig. 83 et 84).

D’autres zones moins altérées et éparses, sont recouvertes de petits foci (d’une dizaine de microns) à contenu recristallisé qui remplissent chaque porosité telles que les lacunes ostéocytaires, et qui sont ordonnés selon la structure lamellaire des ostéons (cf. Fig. 85 et 86). Ces zones montrent une porosité importante laissant supposer que ce sont les préparations qui ont détaché les foci. Quelques zones hyperminéralisées, dans lesquelles les contenus recristallisées sont plus ou moins recouverts, restent perceptibles.

Les trous formés par les canaux bactériens ont sensiblement des tailles similaires (< 0,5 µm).



Figures 83 et 84 : Photographies MEB, BZ2011-15 ; Gauche (200 µm) et droite (zoom 20 µm) : porosité très importante.



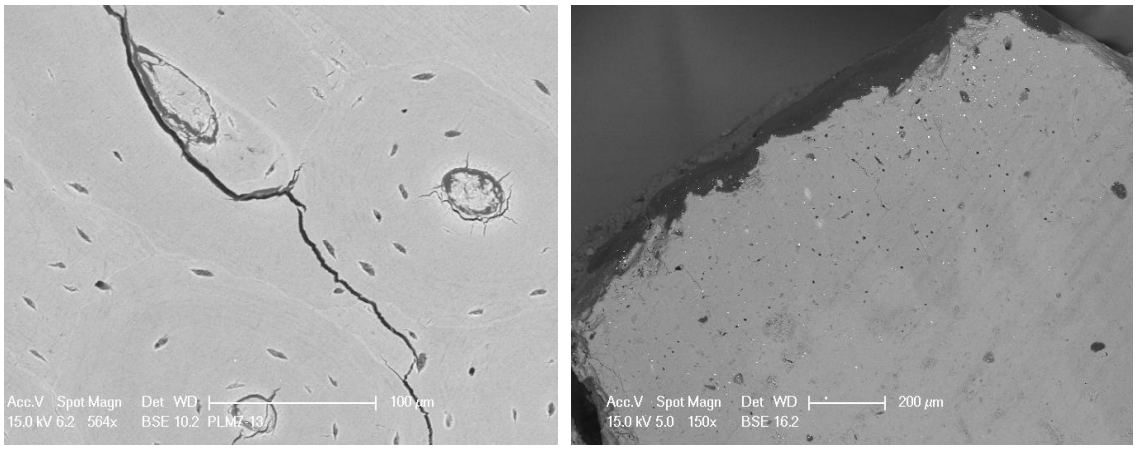
Figures 85 et 86 : Photographies MEB, BZ2011-15 ; Gauche : zone moins altérée avec des petits foci ordonnés autour des ostéons (200 µm). Droite : ostéon entouré de foci hyperminéralisés et à contenu recristallisé (100 µm).

Couche indéterminée *:* Les échantillons BZ2011-21 et 23 ont une structure histologique bien préservée (HI=5) tandis que les BZ2011-22, 24 et 25 sont fortement altérés (HI=0) (cf. ANNEXE F).

Les deux premiers présentent des imprégnations de calcite au niveau des canaux de Havers et des lacunes (cf. Fig. 87). De plus, un effacement diffus de la structure histologique (BZ2011-23 : cf. Fig. 88), constatée au niveau des surfaces extérieures, pourrait correspondre à un lessivage par les phénomènes de circulation des fluides et d'humidité dans le sol (Piepenbrick, 1986).

Des inclusions de manganèse sont également perçues dans des fissures et porosités de BZ2011-23 (cf. Fig. 89).

Enfin, les microfissures sont rares et indiquent la bonne conservation de la structure osseuse.



Figures 87 et 88 : Photographies MEB ; Gauche (BZ2011-21) : ostéons comblés par la calcite (100 µm). Droite (BZ2011-23) : effacement de la structure histologique (200 µm).

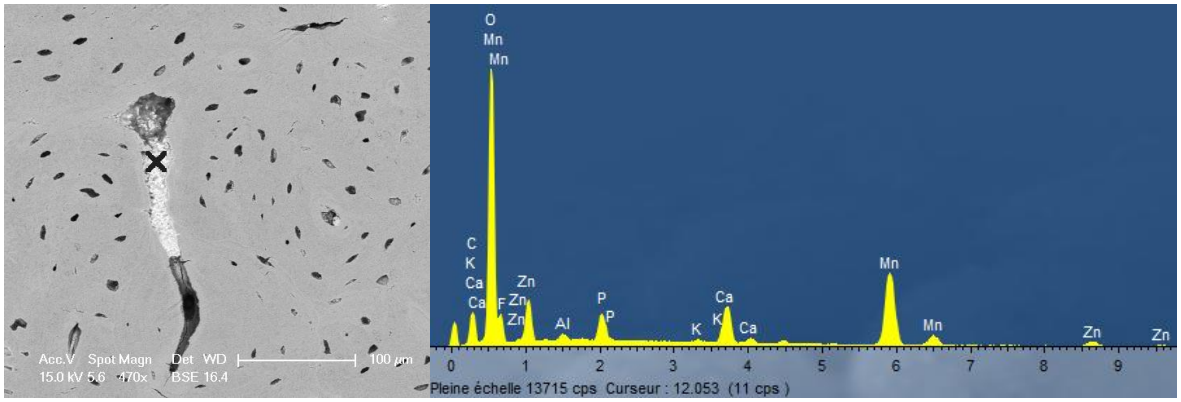


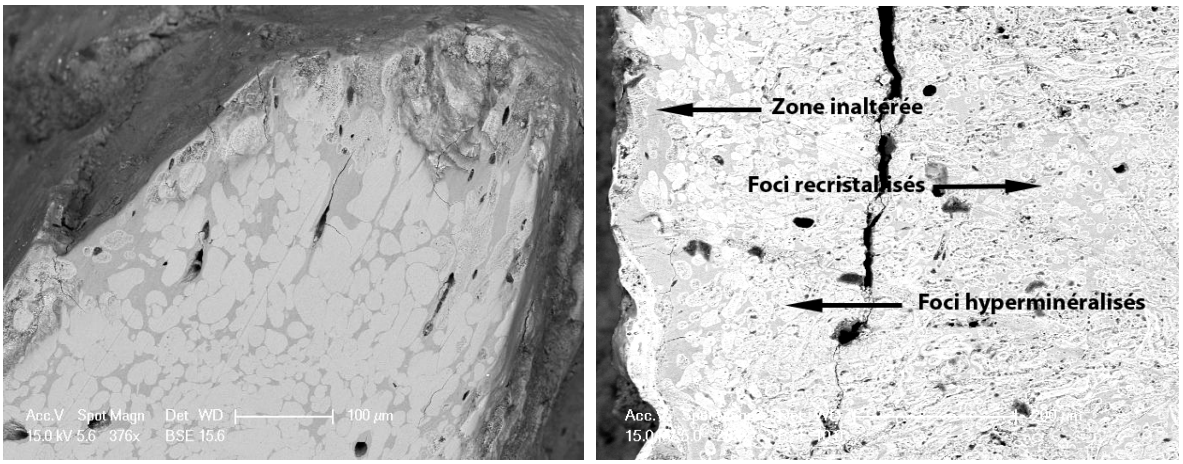
Figure 89 : Photographie MEB (100µm) et spectre associé (abscisse en keV), BZ2011-23 ; inclusion de manganèse.

Les trois autres ossements sont altérés d'une façon similaire (BZ2011-22, 24 et 25). Tandis que l'ensemble des bords externes est souligné par des bandes de nappes hyperminéralisées (cf. Fig. 90)

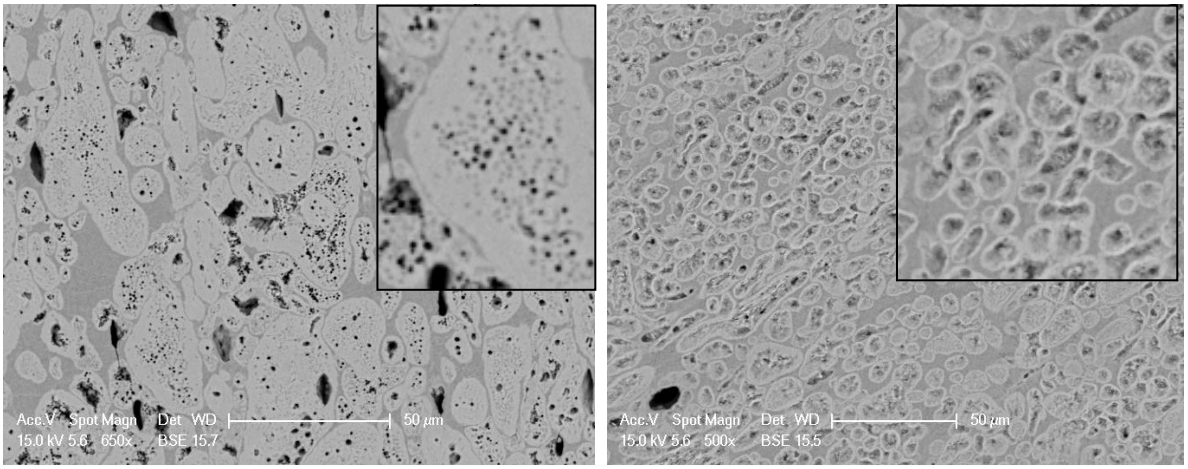
parfois intercalées par une bande d'os inaltéré, la zone intra-corticale est parcourue dans sa totalité par des foci plus petits (de quelques microns à 25 microns en moyenne à contenu recristallisé (cf. Fig. 91 et 93).

La porosité n'est importante que dans certaines zones où les foci ont, semble-t-il, été détachés lors des préparations.

Les trous constitutifs des canaux (ou cavités) ont sensiblement le même diamètre (inférieur à 0,5 µm) (cf. Fig. 92).



Figures 90 et 91 : Photographies MEB ; Gauche (BZ2011-24) : larges nappes hyperminéralisées (100 µm). Droite (BZ2011-25): bande d'os inaltéré, foci hyperminéralisés et foci recristallisés (200 µm).



Figures 92 et 93 : Photographies MEB, BZ2011-24, 50 µm ; Gauche : foci hyperminéralisés avec des canaux plus ou moins visibles (voir zoom). Droite : foci (voir zoom) recristallisés organisés en bandes parallèles suivant la structure osseuse.

C Conclusion :

Lors de cette étude, il a été constaté que les ossements analysés provenant du niveau G semblent présenter une structure histologique bien préservée au contraire de ceux du niveau H qui sont

diversement conservés. En effet, ceux de la couche I montrent majoritairement une structure intacte (sauf un échantillon) tandis que la couche indéterminée expose deux échantillons non altérés et trois autres fortement attaqués par les bactéries.
De nombreux facteurs peuvent expliquer ces différences d'altération.

Les études taphonomiques ont montré de nombreuses traces de démembrement et de désarticulation sur les ossements provenant des couches magdaléniennes. Un démembrement rapide après la mort de l'animal empêche les bactéries endogènes de se répandent ce qui peut expliquer la bonne conservation. De plus, les ossements de la couche I, issus d'activités domestiques et correspondants au remplissage d'un puits, sont plus probablement amenés à être préservés des attaques bactériennes. L'échantillon de cette couche, très attaqué par les bactéries, a pu se situer en haut de la couche et être par conséquent plus sujet aux altérations.
Le niveau H se caractérise par un taux important d'os chauffés : 41,9 % de restes de grands ongulés et 63,3% de restes de petits et moyens ongulés présentent des traces de chauffage (Magniez, 2009). Le chauffage des os dénature les relations collagène/minéral et permet la prolifération des micro-organismes (Nicholson, 1996). Par la seule couleur des ossements il est souvent difficile de distinguer ceux qui ont subi un chauffage et notamment ceux qui ont été bouilli ; par conséquent on ne peut exclure que les ossements qui présentent de fortes altérations auraient pu subir ce genre de traitement.

Il ne doit pas être exclu que les ossement ont pu faire l'objet de déplacements verticaux et/ ou horizontaux au sein des couches. En effet, l'échantillon BZ2011-23 présente une forte concentration de manganèse sur sa surface alors qu'il n'a pas été retrouvé de dépôts de manganèse dans ces niveaux, au contraire des niveaux moustériens.

II Analyses élémentaires :

La composition élémentaire de plusieurs échantillons (BZ2011-01, 03, 14, 16, 19, 21, 23 et 24) a été précisée à l'aide d'analyses PIXE (cf. Coupes ANNEXE C). Le tableau suivant (cf. Tableau 8) présente les différentes concentrations, moyennes, maximales et minimales pour chacun des échantillons analysés.

Ech.	Niveau G Couche PJI		Niveau H Couche I			Niveau H Couche Ind.			Mod.
	BZ01	**BZ03**	**BZ14**	**BZ16**	**BZ19**	**BZ21**	**BZ23**	**BZ24**	
Ca	**422417** 425946 408805	**425184** 426786 423158	**425761** 427796 423710	**425773** 427708 423780	**439213** 443026 427954	**431898** 562937 403802	**390534** 407938 222408	**411254** 418229 367115	382000- 386000
P	170440 171673 167318	171116 172265 166082	169722 170866 168553	166509 168566 165357	157923 160586 154646	157592 173698 26705	168477 176782 19650	176251 179922 173695	178000- 180000
Na	5795 9974 4198	4148 6730 3322	4275 5330 3413	7120 8531 5665	5950 7500 5005	4872 7581 1548	**9221** 16374 7095	4045 7794 3094	5000- 8000
Mg	1610 2889 1103	1201 1891 561	1862 2347 1400	2066 2597 1610	2645 3038 2263	1906 6464 954	2298 4379 1596	2718 5094 1628	3000- 8000
Al	**884** 1586 518	**914** 1359 523	**1339** 2784 754	**832** 1504 416	**1429** 2725 1045	**2750** 30132 458	**2789** 21751 595	**1630** 12392 745	-
S	1659 2024 1280	1086 1998 690	1296 1690 999	**2109** 2474 1748	**1908** 2609 1396	1026 1445 201	826 1329 444	767 1076 349	1600
Cl	1047 2750 600	340 1222 139	215 405 111	**1806** 2254 1519	**1669** 2210 1099	257 474 114	505 2042 113	272 836 107	700- 1000
Mn	**24** 54 13	**75** 148 20	**78** 332 12	**287** 810 105	**100** 506 10	**57** 339 9	**2879** 31223 258	**82** 500 12	-
Fe	**25** 55 7	**245** 957 121	**63** 266 18	**135** 434 38	**309** 2014 33	**936** 13129 12	**336** 3152 47	**103** 825 20	-
Cu	**15** 23 9	**27** 57 17	**36** 63 14	**80** 116 16	**72** 128 30	**103** 2737 10	**115** 262 42	**38** 62 22	-
Zn	**150** 216 118	**190** 338 122	**312** 801 144	100 118 86	**147** 274 124	**144** 473 79	**11043** 14696 9291	**2568** 5293 1517	130
Sr	172 216 130	185 242 136	24 306 198	**798** 911 715	**1236** 1320 1141	198 436 88	223 264 169	301 348 267	200-500
Pb	**19** 31 10	**18** 44 11	-	**22** 38 9	**20** 46 10	**15** 23 10	**22** 70 12	**20** 66 9	-
U	-	**26** 44 0	**29** 45 12	**33** 64 17	**47** 81 15	**17** 28 10	**21** 38 14	**20** 30 11	-
Ca/P	**2,48**	**2,48**	**2,51**	**2,56**	**2,78**	**3,35**	**2,31**	**2,33**	2,1-2,2

Tableau 8 : Concentration en éléments pour les échantillons de Bize-Tournal en comparaison avec celles d'un os moderne (Reiche *et al.*, 1999). Les concentrations inférieures à l'échantillon moderne sont soulignées et celles qui sont supérieures sont en gras ; les cases vides témoignent d'une très faible concentration ou d'une absence de donnée.

A Concentration en éléments :

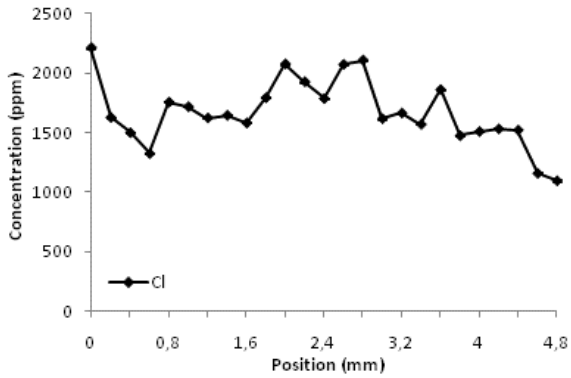
Différents types de profil de concentration (U et U inversé, irréguliers et plats) comme pour le site de Song Terus, sont observés.

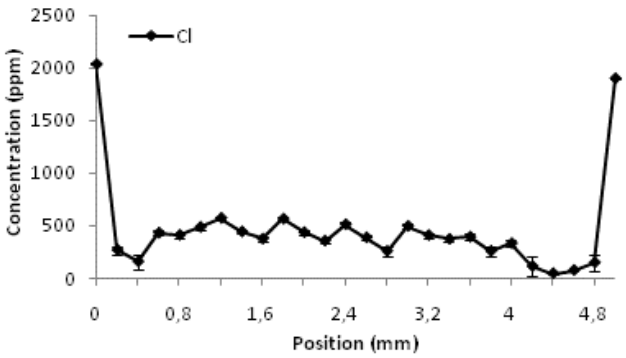
Deux types d'éléments sont distingués : les éléments déjà présents in vivo dans les ossements et les éléments exogènes.

Eléments présents dans l'os in vivo : Les profils Ca/P sont globalement irréguliers pour l'ensemble des échantillons.

Les valeurs correspondantes au rapport Ca/P, similaires pour les échantillons d'une même couche, sont supérieures à celle de l'échantillon moderne et du rapport théorique de 2,15 (White & Hannus, 1983). Ces valeurs élevées pour les ossements archéologiques, de 2,31 à 3,35, peuvent s'expliquer par les nombreux dépôts de calcite observés au MEB dans les canaux de Havers et les fissures.

Les éléments Na, Mg, S et Cl présents dans l'os in vivo et qui se retrouvent dans les os archéologiques, présentent généralement des profils irréguliers (cf. Fig. 94). Cependant les Na, Mg et Cl, au sein des échantillons BZ2011-23 et 24, exhibent des profils en U (cf. Fig. 95) témoignant d'une concentration importante au niveau des surfaces externes.





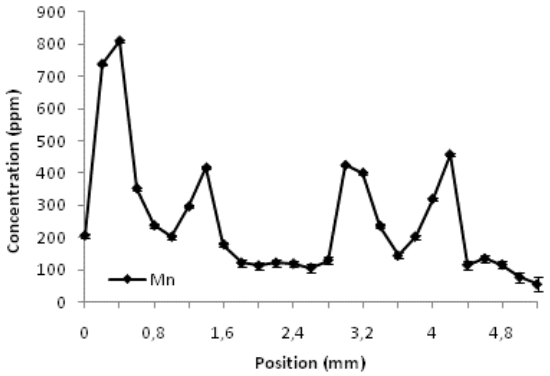
Figures 94 et 95 : Profils de concentration en Cl ; Gauche (BZ2010-23) en U. Droite (BZ2010-19) : profil irrégulier.

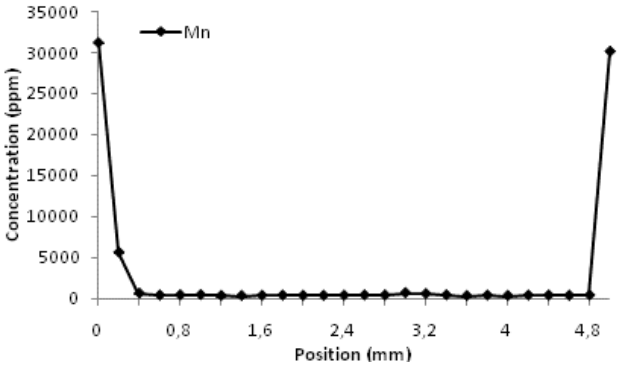
La teneur de certains éléments est largement augmentée (Sr et Zn) ou diminuée (S, Na, Mg et Cl) dans les échantillons archéologiques par rapport aux ossements modernes.

Au contraire du site de Song Terus où les concentrations en éléments étaient homogènes entre les échantillons, ceux du site de Bize présentent d'importantes différences. Ainsi, les échantillons BZ2011-16 et 19 dévoilent des concentrations en S et en Cl très supérieures aux autres échantillons. L'échantillon BZ2011-19 présente également de fortes concentrations en Sr. De plus, l'échantillon BZ2011-24 montre une augmentation en Zn. On remarque qu'au sein de l'échantillon BZ2011-23 les

éléments Na et Zn sont en quantité beaucoup plus importante que dans les autres échantillons. Les microanalyses réalisées au MEB avait déjà permis de constater de nombreux cristaux à base de sodium sur la surface.
L'échantillon BZ2011-24, au contraire, a une concentration diminuée en S par rapport aux autres ossements.

Eléments exogènes : Des éléments chimiques exogènes incorporés au cours de l'enfouissement sont retrouvés (Al, Mn, Fe, Cu, Pb, U) en concentration plus ou moins importante au sein des ossements.
Le Fe et le Mn se déposent préférentiellement en surface des ossements. Des profils en forme de U, indiquant que les concentrations les plus fortes sont retrouvées au niveau du périoste et de l'endoste, sont systématiquement retrouvés pour le Fe. Le Mn, en teneur faible, a des profils irréguliers sauf pour l'échantillon BZ2011-23 pour lequel cet élément est en concentration importante (cf. Fig. 96 et 97). Ces données, pour ce dernier échantillon, corroborent les observations MEB où de nombreuses inclusions de manganèse sont retrouvées sur la structure.





Figures 96 et 97 : Profils de concentration en Mn ; Gauche (BZ2011-23) : profil en U. Droite (BZ2011-16) : profil irrégulier.

Les autres éléments (S, Pb, U), intégrés lors de la diagenèse ont des profils irréguliers pour l'ensemble des échantillons. Seul l'Al, comme pour Song Terus peut pénétrer profondément l'os ou être limité à la surface comme cela est constaté pour la moitié des échantillons (BZ2011-14, 21, 23 et 24).

B Comparaisons MEB/PIXE :

Ces analyses PIXE sont à approfondir. Elles ont néanmoins permis d'apprendre que les échantillons, malgré une bonne structure histologique observée, comportent des altérations au niveau chimique.

Chapitre 4 : Synthèse sur les modifications des ossements lors de la diagenèse

Tout d'abord, les altérations observées sur le référentiel moderne sont difficilement comparables avec celles des échantillons archéologiques. En effet, les types d'altération sont différents ce qui permet de conclure que ce type de milieu artificiel correspond peu à ceux dans l'environnement. Des enfouissements en pleine terre dans différentes milieux sédimentaires seraient plus adaptés.

Ensuite, les échantillons provenant des deux sites archéologiques sont généralement soit très altérés, soit très bien conservés. Il semble qu'une fois que les conditions favorables au développement des micro-organismes sont atteintes, les os sont hautement altérés et très rapidement. Ce type de résultat est régulièrement constaté (Hedges *et al.*, 1995 ; Nielsen-Marsh *et al.*, 2000 ; Smith *et al.*, 2002 ; Jans *et al*., 2004).
Les sites de Bize-Tournal et Song Terus présentent des ossements avec des altérations d'évolutions similaires bien qu'il s'agisse probablement de bactéries différentes au vue des tailles différentes de canaux.

L'ensemble des données MEB permet d'établir un schéma d'altération. La différence de taille des foci ne semble pas être la conséquence de phases d'altération mais plutôt une différence de taille des colonies sachant qu'il n'est pas exclu que les foci croissent ou fusionnent. En effet, les zones proches de la surface externe des ossements, ou proches des canaux médullaires, sont atteints plus précocement et par un plus grand nombre de micro-organismes. Les zones internes ou intra-corticales sont atteintes par des colonies moindres et les foci formés sont de taille plus restreinte. Dans ces derniers, des formes de recristallisations minérales apparaissent au contraires des zones situées près des périostes et endostes dans lesquelles seules des nappes déminéralisées et hyperminéralisées s'observent. Cela peut s'expliquer par le fait que les foci des zones externes sont plus aisément renouvelés par les apports extérieurs.
Cette hypothèse est également étayée par les zones inaltérées qui subsistent entre les foci. Elles sont en effet plus larges dans les zones plus externes et au contraire plus petites entre les foci de la zone intra-corticale.

Les données PIXE renseignent sur la concentration des éléments présents au sein des échantillons mais aussi sur le niveau d'altération de la phase minérale, ce qui n'est pas forcément perçu avec les données MEB. Les résultats, obtenus par la méthode PIXE, seront à approfondir dans des études ultérieures.

Il est difficile de reconstituer l'histoire taphonomiques des ossements puisque des différences notables d'altération entre les ossements provenant de même environnement sédimentaire sont remarquées. Un certain nombre de facteurs engendrent de telles variations. Il peut s'agir des facteurs intrinsèques des ossements tels que le type, la taille, l'état de porosité, mais aussi l'âge des individus à la mort, qui induisent des états initiaux plus fragilisés et ainsi plus sujets aux altérations. De plus, les facteurs extrinsèques comme le microenvironnement dépositionnel (végétation, pH, etc.), les activités humaines (démembrement, décarnisation, etc.) agissent directement sur leur état de conservation.

Un choix d'échantillons mieux répartis spatialement sur les sites pourrait permettre de faire davantage de comparaison et de répondre plus précisément aux questions.

Conclusion et perspectives

Dans le cadre de ce travail de Master, nous avons étudié les différents types de faciès d'altération d'origine microbienne (bactériennes et fongiques) rencontrés sur des ossements archéologiques provenant des grottes de Song Terus (Java, Indonésie) et Bize-Tournal (France) par microscopie électronique à balayage (MEB) et par spectroscopie d'émission de rayons X induits par un microfaisceau de particules chargées (microPIXE).

Ces analyses ont permis, tout d'abord, de constater d'évidentes similarités entre les échantillons localisés dans les mêmes zones ou niveaux dans chacun de ces sites. Cependant, quelques faciès d'altération différents ont pu être observés.

Les ossements provenant du site de Song Terus témoignent d'altérations qui peuvent être reliées aux conditions d'enfouissement de leur zone précise de localisation sur le site. Les échantillons provenant de la zone proche de l'entrée de la grotte sont très altérés par les bactéries, tandis que ceux de la zone située plus au fond de la grotte sont essentiellement dégradés par les champignons. Ces altérations différentielles évoquent ainsi essentiellement des conditions sédimentaires distinctes.
Les échantillons analysés du site de Bize-Tournal proviennent de niveaux différents et présentent des altérations plus ou moins différentielles. Au sein du niveau H, les ossements de la couche I exposent une structure histologique bien préservés corroborant l'existence d'une zone de rejet (puits). Dans de telles zones, les ossements, souvent décharnés et enfouis rapidement, sont en effet moins sujets aux attaques microbiennes (Jans et al., 2004 ; Nielsen-Marsh et al., 2007, etc.).
Dans ce même niveau, des ossements provenant d'une couche indéterminée, sont diversement altérés. Les nombreuses traces relatives aux activités de boucherie ainsi que le taux important d'os chauffés, observées lors de précédentes études (Magniez, 2009), peuvent expliquer respectivement l'absence de détérioration d'origine microbienne et au contraire la forte altération.
Les ossements du niveau G ne présentent pas d'attaques bactériennes ce qui témoigne de conditions sédimentaires et de mode de dépôts favorables à leur préservation.

Les analyses microPIXE, qui n'ont pu être analysées que de façon succincte dans ce travail, ont néanmoins permis de mettre en évidence des enrichissements ou des appauvrissements en éléments chimiques au sein des structures osseuses et de constater une altération globale des échantillons y compris ceux dont l'observation au MEB laissait à penser qu'ils étaient bien préservés. Ces derniers ont ainsi fait l'objet de phénomènes d'altération principalement guidés par les processus physico-chimiques plus ou moins importants plutôt que par des phénomènes microbiens.

Il doit cependant être pris en compte qu'un nombre limité d'échantillon fossile a été étudié au cours de ce travail. Il serait ainsi intéressant d'élargir le corpus d'étude afin de s'assurer de la représentativité des échantillons au sein des zones ou niveaux.

Le matériel moderne expérimental, quant à lui, témoigne de nombreux types d'altérations d'origine microbiennes. Des altérations différentielles entre échantillons au sein de même milieu artificiel, qui peuvent être la conséquence de conditions micro-locales, ont été mises en évidence.
Certaines altérations qui ne semblent pas être d'origine microbienne, ont été observées uniquement sur le matériel moderne et sont absentes du matériel archéologique Ces altérations, qui semblent pouvoir être attribuées à des attaques chimiques, n'ont pas été retrouvées dans la littérature.
Il serait ainsi nécessaire, d'une part de prolonger les expérimentations sur des durées plus importantes et d'autre part, d'en réaliser d'autres dans des conditions plus proches des conditions naturelles. D'autres informations pourraient également être apportées par l'essai de corrélation entre l'état de préservation des structures histologiques et les faciès d'altération de la surface externe des échantillons. Il pourrait ainsi être possible de mieux identifier les zones altérées ou préservées au sein des gisements archéologiques.

Au cours de cette étude, il est apparu tout l'intérêt d'une étude des structures histologiques de l'os, à la fois pour comprendre les processus d'altération impliqués dans les gisements archéologiques, mais également pour définir l'état d'altération des échantillons osseux. Cependant, à elle seule, une telle étude histologique ne permet pas d'identifier certains processus pouvant modifier la composition des ossements sans pour autant altérer leur structure.
Des analyses complémentaires, à l'aide des techniques telles que les PIXE (analyse élémentaire), ou en spectrométrie Raman ou infrarouge, pourraient permettre l'obtention d'indications sur les modifications structurelles et chimiques.
Des essais de cartographie Raman ont été réalisés sur plusieurs échantillons provenant du site de Song Terus. Leur exploitation postérieure pourrait révéler d'autres informations et être complémentaires aux autres techniques d'analyses employées durant ce travail.

Liste des illustrations

Figure 1 : L'os et ses différentes composantes (Sasso, 2008). *9*

Figure 2 : L'os cortical et sa structure (BZ2011-05). *10*

Figure 3 : Représentation de la structure d'un os long (Baronne, 1986). *11*

Figure 4 : Photographie MEB (échantillon moderne témoin, 200 µm) ; figuration des canaux de Havers, lamelles osseuses, lacunes ostéocytaires et ligne de cément ; ostéons interstitiels entre les ostéons. *11*

Figure 5 : Figuration de la structuration des molécules de collagène au sein des fibres (Fratzl, 2008), où (a) représente les différents niveaux d'insertion de la molécule de collagène et où (b) et (c) illustrent les interactions entre fibrille et molécules. *12*

Figure 6 : Illustration de l'organisation du système de Havers à différentes échelles (Katz et al., 2006). *13*

Figure 7 : Illustration de l'organisation des fibrilles de collagène et leur minéralisation progressive (Olszta et al., 2007). Chaque tube représente une molécule de tropocollagène, les mesures associées sont les distances inter-moléculaires. *14*

Figure 8 : Photographies MEB : Altération avancée d'un ostéon. Gauche : zones déminéralisées et hyperminéralisées. Droite : image topographique, les zones claires sont basses et donc déminéralisées contrairement aux zones foncées qui sont hyperminéralisées (Bell, 1990). *24*

Figure 9 : Photographie MEB : Illustration des quatre types d'altération décrites par Hackett (1981). 1 : Canaux de type Wedl ; 2 : Canaux « linear longitudinal » ; 3 : Canaux de type « budded » ; 4 : Canaux lamellaires (Jans et al., 2004). *25*

Figure 10 : Représentation des canaux de type Wedl, sections transversales (partie gauche de l'os) et longitudinales (partie droite de l'os) (D'après Hackett, 1981). *25*

Figure 11 : Photographie MEB ; Bordure extérieure de l'os cortical perforée de canaux de type Wedl (Turner-Walker & Jans, 2008). *26*

Figure 12 : Représentation des canaux linéaires longitudinaux, sections transversales (partie gauche de l'os) et longitudinales (partie droite de l'os) (D'après Hackett, 1981). *27*

Figure 13 : Représentation des canaux en forme de bourgeon, sections transversales (partie gauche de l'os) et longitudinales (partie droite de l'os) (d'après Hackett, 1981). *27*

Figure 14 : Représentation des canaux de type lamellaire, sections transversales (partie gauche de l'os) et longitudinales (partie droite de l'os) (D'après Hackett, 1981). *28*

Figure 15 : Photographie MEB ; Ostéons envahis par des foci de type lamellaire (Piepenbrick, 1986). 28

Figure 16 : Plan et section de la grotte de Song Terus, emplacement des deux puits (KI et KII) (Sémah et al., 2004). 37

Figure 17 : Relevé des niveaux archéologiques de la grotte de Song Terus (Sémah et al., 2004). 38

Figure 18 : Echantillons sélectionnés du site de Song Terus provenant des zones M8 et M10.....39

Figure 19 : Localisation des zones fouillées (Tavoso, 1987). 40

Figure 20 : Coupes synthétiques longitudinales des remplissages des demi-galeries Nord (a) et Sud (b) (Tavoso, 1987). 41

Figure 21 : Echantillons sélectionnés du site de Bize-Tournal provenant du niveau G.....43

Figure 22 : Echantillons sélectionnés du site de Bize-Tournal provenant du niveau H.....44

Figures 26 et 27 : Photographie MEB, SiB1 ; Gauche : histologie bien préservée contre la cavité médullaire (échelle 200 µm). Droite : Augmentation de la porosité et corrosion de surface, partie périostéale (échelle 500 µm). 49

Figures 28 et 29 : Photographies MEB CaV5, gauche : lamelles interstitielles corrodées et plus minéralisées (200 µm). Droite : Grossissement zone altérée (100 µm).....50

Figures 30 et 31 : Photographies MEB. Gauche : Altérations au niveau des limites externes de l'ostéon (BM1, 100 µm). Droite : Altérations qui suivent la structure lamellaire concentrique de l'ostéon (ForB1).....51

Figures 32 et 33 : Photographies MEB, gauche : Altérations qui se transforment en fissures (SIB5, 200 µm). Droite : Zone hyperminéralisée associée à des phénomènes de corrosion (CaB3). 51

Figures 34 et 35 : Photographies MEB, CAB1, Petites zones circulaires altérées (50 µm). 51

Figures 36 et 37 : Photographies MEB, Gauche : augmentation de la porosité au niveau du périoste (KOHB3). Droite : Accroissement de la taille des lacunes interstitielles (ForB5). 52

Figure 38 : Photographie MEB, Rétractation de la porosité (KOHB5). 52

Figures 39 et 40 : Photographies MEB, Gauche : Microfissurations à l'intérieur de l'ostéon (CultB2). Droite : Fissure qui suit le contour de l'ostéon (KOHB3).....53

Figure 41 : Photographie MEB, CAV5, Foci hyperminéralisé avec trous et canaux qui partent dans toutes les directions à partir du point d'implantation contre la surface externe du périoste (50 µm). .54

Figures 42 et 43 : Photographies MEB, CaB3 ; Gauche ; Foci encadré. Droite : Agrandissement de la zone centrale encadrée (gauche), limite hyperminéralisée et perforations de petits trous. 54

Figures 44 et 45 : Photographies MEB ; Gauche :(CultB3). Droite : zone externe du périoste complètement rongée (ForV5).....55

Figure 46 : Photographie MEB, BM, altération linéaire en zig-zag. 55

Figures 47 et 48 : Photographies MEB, Gauche (CaB5, 50 µm). Droite (CultB7, 100 µm). 56
Figure 98 : Photographie MEB, BG + 3 mois ; foci serti d'un anneau hyperminéralisé au centre de l'image (grossissement à gauche) et zone piquetée. 58

Figures 99 et 100 : Photographies MEB, échantillon BG – 3 mois ; altérations piquetées et sous forme de microfissures. 58

Figures 49 et 50 : Photographies MEB ; Gauche (STTA14) ; droite (ST06), zones d'altérations plus concentrées sur les limites externes de l'os (500 µm).....59

Figure 51 : Photographie MEB, STO6 ; visualisation des différents types d'altération, zones hyperminéralisées, déminéralisées et inaltérées, zones de chevauchements (haut gauche, bas droite et gauche) (50 µm).....60

Figure 52 : Photographie MEB, STTA02 ; surface recouverte de zones hyperminéralisées et déminéralisées qui s'ordonnent autour du canal de Havers (20 µm). 60

Figures 53 et 54 : Photographies MEB ; Gauche (STTA02) : Foci recristallisés (50 µm) Droite (ST06) : bimodalité des diamètres des trous dans les zones déminéralisées et hyperminéralisées (20 µm). 61

Figures 55 et 56 : Photographies MEB, STTA13; Gauche : fissure centrale remplie de calcite (200 µm). Droite : surface très altérée par les micro-organismes, porosité très importante (50 µm). 62

Figure 57 : Photographie MEB et spectre (abscisse en keV) associés, ST06 ; présence de manganèse dans la zone déminéralisée (50 µm).....62

Figure 58 : Photographie MEB et cartographie associées, STTA14 ; pour le Mn, Fe, F et Si. 63

Figure 59 : Photographie MEB (20 µm) et cartographie associées, STTA02 ; canaux de Havers remplie de Mn, Fe, Si et Al.....63

Figure 60 : Photographie MEB (100 µm) et spectres associés (abscisse en keV), STTA02 ; Imprégnations de calcite sur tout le surface osseuse.....64

Figure 61 : Photographie MEB, STTA08 ; structure histologique très bien préservée (100 µm).....64
Figures 62 et 63 : Photographies MEB ; Gauche (STTA20) : altérations de type fongique (200 µm). Droite (STTA17) : altérations sous forme de microfissures type mousse ou lichen. 65

Figures 64 et 65 : Photographies MEB ; Gauche (STTA17) : état différentiel d'altération de la structure osseuse. Droite (STTA18) : zones déminéralisées et hyperminéralisées (100 µm). 65

Figure 66 : Photographie MEB, STTA20 ; larges fissures longitudinales couvrant toute la zone intra-corticale (500 µm). 66

Figure 67 : Photographie MEB, STTA18 ; fissures perpendiculaires vides (flèches), parallèles remplies de calcite (encadré haut) et altérations bactériennes (encadré bas). 66

Figure 68 : Photographie MEB et spectres associés (abscisse en keV), STTA18 ; surface osseuse très fracturée et imprégnée de calcite (200 µm). 67

Figures 69 et 70 : Profils de concentration (STTA22) en calcium (gauche) et phosphate (droite). 70

Figures 71, 72 et 73 : Coupe transversale et profils de concentration (STTA20) en manganèse (gauche) et fer (droite). 71

Figures 74, 75 et 76 : Photographie MEB, STTA20, 500 µm, Imprégnations de calcite dans la zone intra-corticale. Profils de concentration (STTA20) en calcium et phosphate. 72

Figures 77 et 78 : Photographies MEB ; Gauche (BZ2011-01) : macrofissures (500 µm). Droite (BZ2011-03): microfissures (100 µm). 73

Figures 79 et 80 : Photographies MEB, BZ2011-01 ; Gauche : calcite comblant canaux de Havers (100 µm). Droite : bandeau hyperminéralisé (200 µm). 74

Figures 81 et 82 : Photographies MEB ; Gauche (BZ2011-19) et droite (BZ2011-14) : structure histologique très bien conservée parcourue de larges fissures. 74

Figures 83 et 84 : Photographies MEB, BZ2011-15 ; Gauche (200 µm) et droite (zoom 20 µm) : porosité très importante. 75

Figures 85 et 86 : Photographies MEB, BZ2011-15 ; Gauche : zone moins altérée avec des petits foci ordonnés autour des ostéons (200 µm). Droite : ostéon entouré de foci hyperminéralisés et à contenu recristallisé (100 µm). 75

Figures 87 et 88 : Photographies MEB ; Gauche (BZ2011-21) : ostéons comblés par la calcite (100 µm). Droite (BZ2011-23) : effacement de la structure histologique (200 µm). 76

Figure 89 : Photographie MEB (100µm) et spectre associé (abscisse en keV), BZ2011-23 ; inclusion de manganèse. 76

Figures 90 et 91 : Photographies MEB ; Gauche (BZ2011-24) : larges nappes hyperminéralisées (100 µm). Droite (BZ2011-25): bande d'os inaltéré, foci hyperminéralisés et foci recristallisés (200 µm). 77

Figures 92 et 93 : Photographies MEB, BZ2011-24, 50 µm ; Gauche : foci hyperminéralisés avec des canaux plus ou moins visibles (voir zoom). Droite : foci (voir zoom) recristallisés organisés en bandes parallèles suivant la structure osseuse. 77

Figures 94 et 95 : Profils de concentration en Cl ; Gauche (BZ2010-23) en U. Droite (BZ2010-19) : profil irrégulier. 80

Figures 96 et 97 : Profils de concentration en Mn ; Gauche (BZ2011-23) : profil en U. Droite (BZ2011-16) : profil irrégulier. 81

Liste des tableaux

Tableau 1 : Dénomination des différents échantillons, du type de milieu et de la durée à laquelle ils ont été prélevés.....33

Tableau 2 : Dénomination des différents échantillons et de la durée à laquelle ils ont été prélevés. ...34

Tableau 3 : Echantillons sélectionnés au sein des zones M8 et M10.....39

Tableau 4 : Echantillons sélectionnés au sein du niveau G.....43

Tableau 5 : Echantillons sélectionnés au sein du niveau H.....43

Tableau 6 : Dénombrement des ossements (d'après comm. pers. Orial, 2011).....57

Tableau 7 : Concentration en éléments (moyennes, maximales et minimales) pour les échantillons de Bize-Tournal en comparaison avec celles d'un os moderne (Reiche et al., 1999), les valeurs en gras et soulignées sont respectivement supérieures ou inférieures à celle de l'échantillon moderne de référence. 69

Tableau 8 : Concentration en éléments pour les échantillons de Bize-Tournal en comparaison avec celles d'un os moderne (Reiche et al., 1999). Les concentrations inférieures à l'échantillon moderne sont soulignées et celles qui sont supérieures sont en gras ; les cases vides témoignent d'une très faible concentration ou d'une absence de donnée. 79

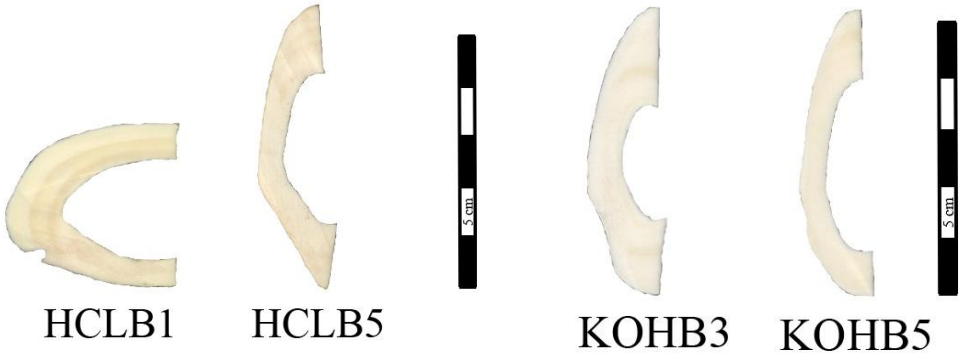
Annexes

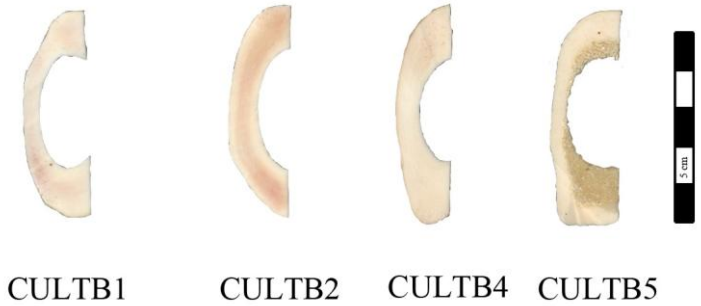
A Coupes échantillons modernes:

CAB1 CAB3 CAB5 CAV4

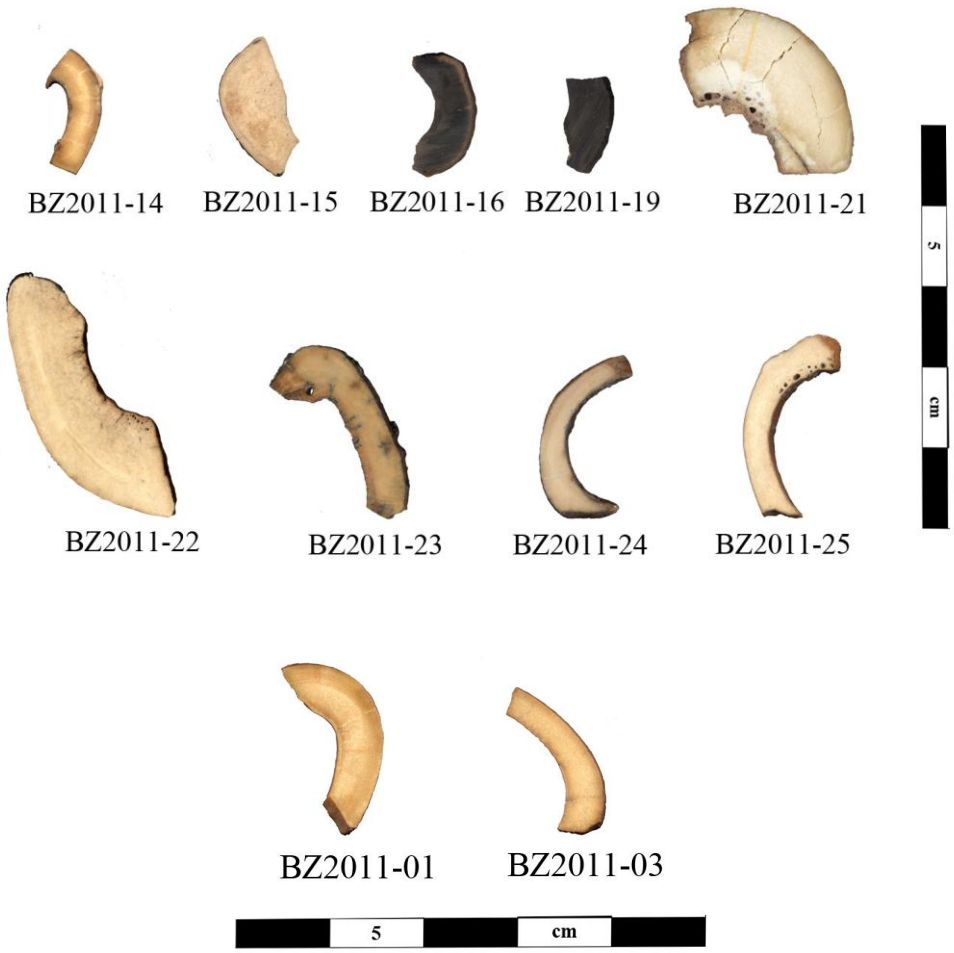
FORB1 FORB5 FORV4

SIB1 SIB5 Ch

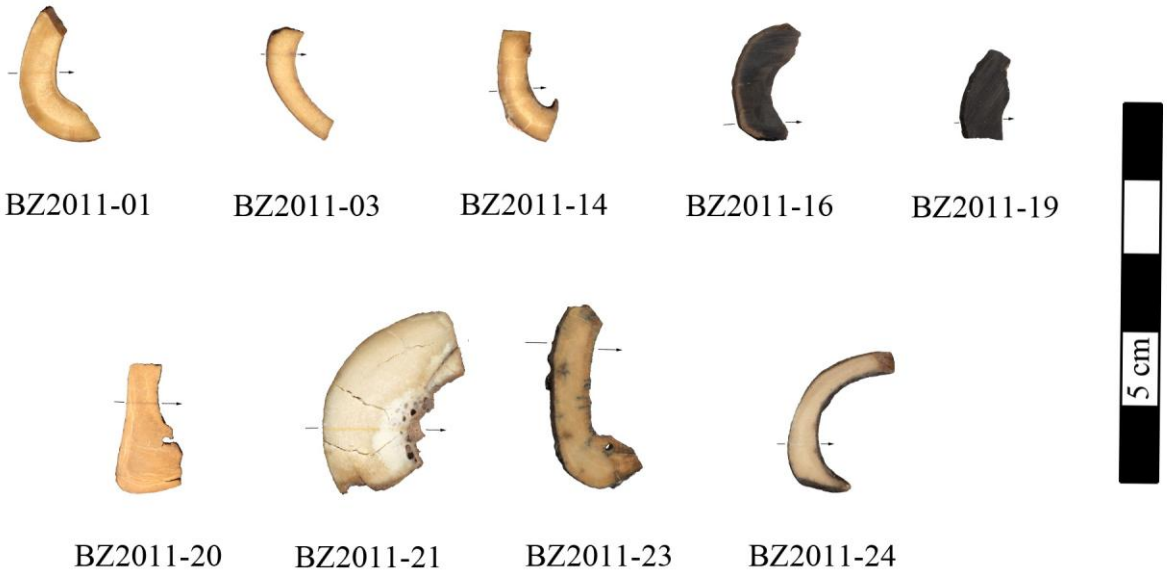




B Coupes échantillons archéologiques :

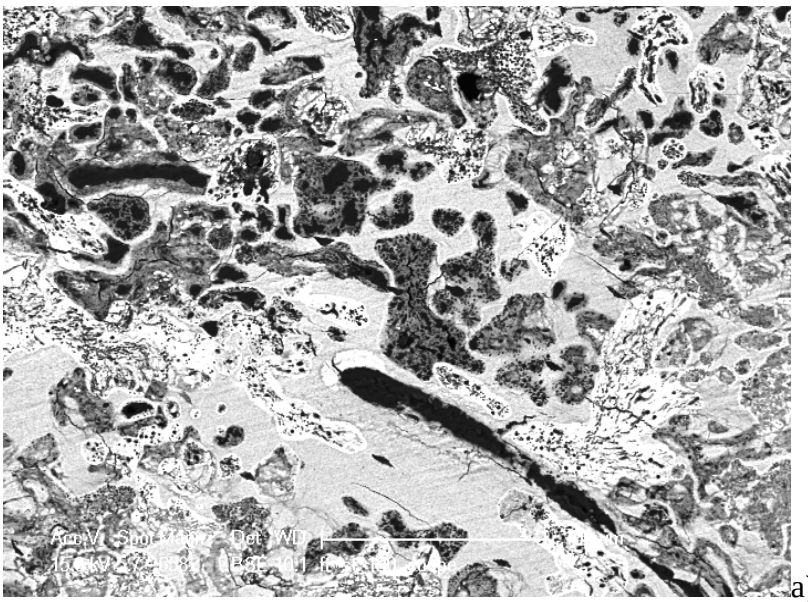


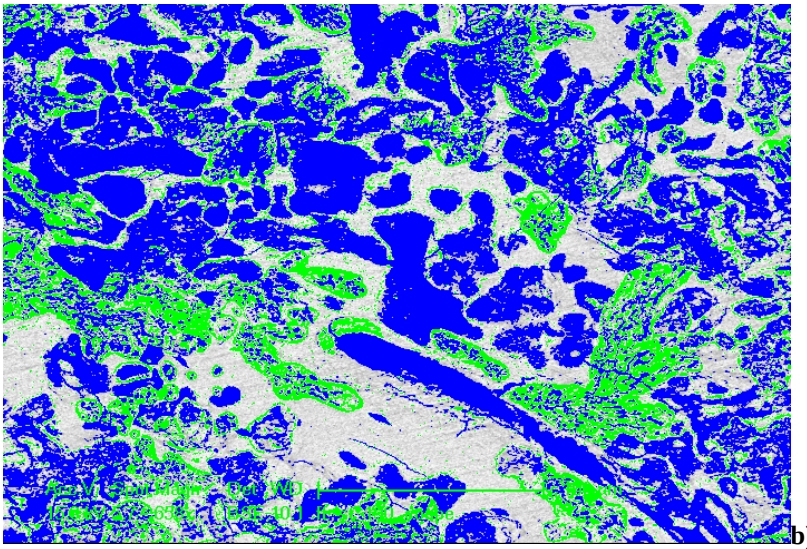
C : Coupes échantillons archéologiques passés au PIXE :



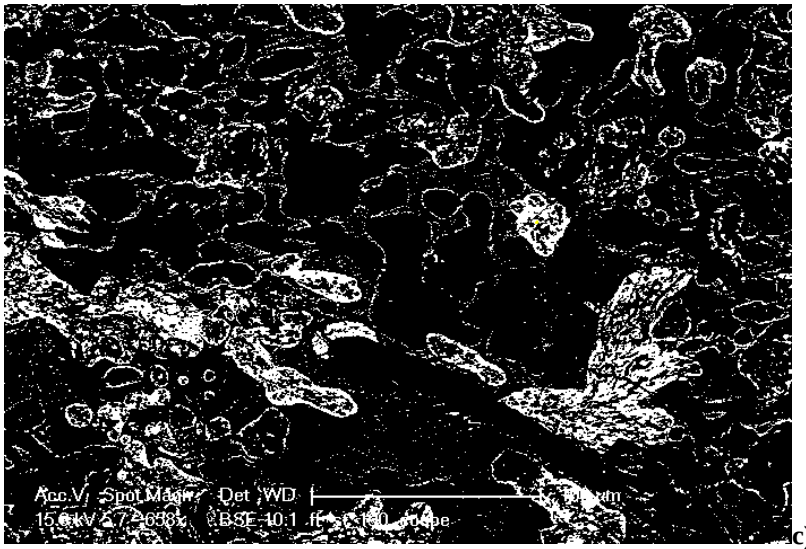
<u>D Traitement image J :</u>

ST06 (50 µm), évaluation de l'étendue des zones d'altération :

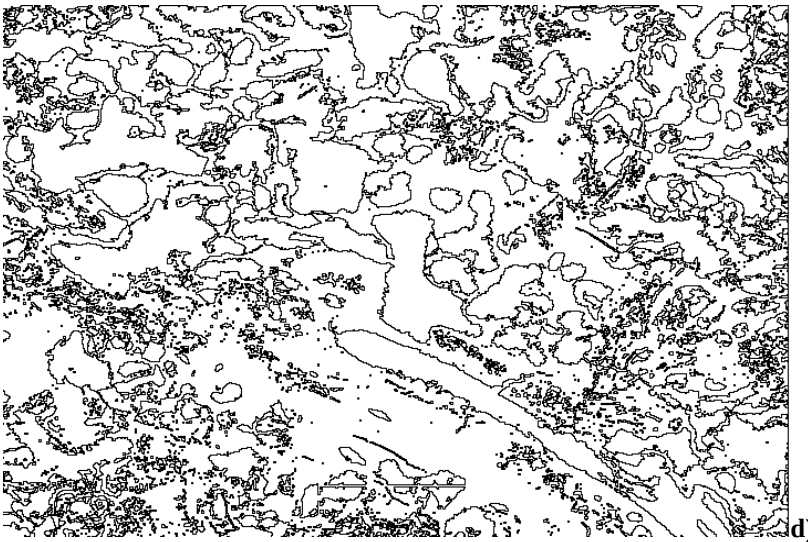

a)



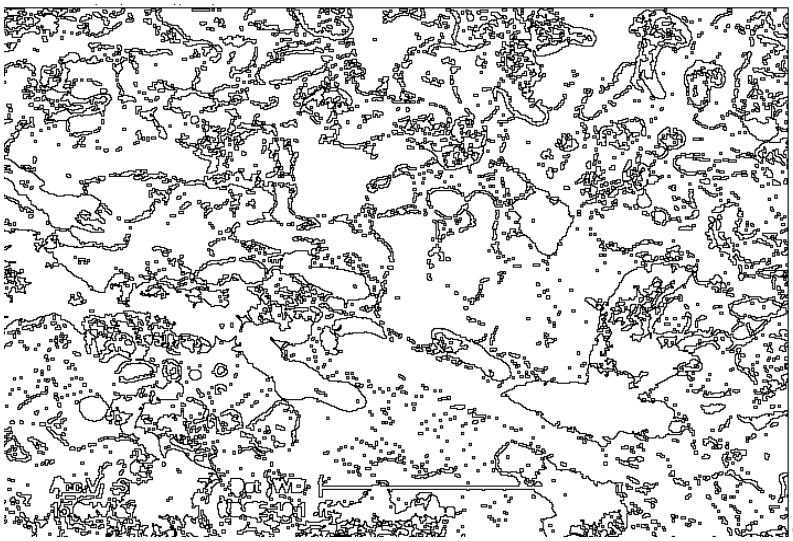
b)



c)

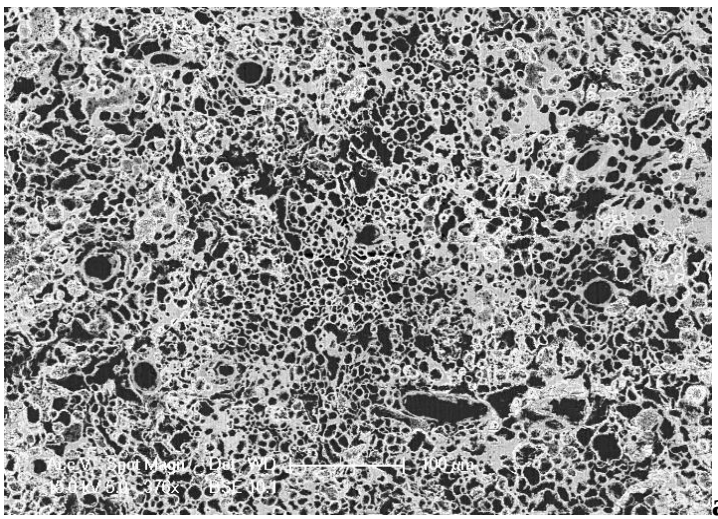


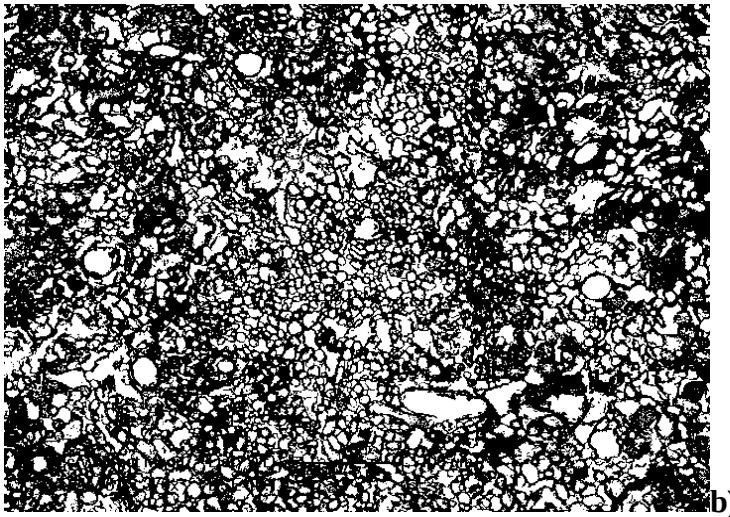
d)


e)

La photographie MEB de ST06 (a : 50 µm) a subit plusieurs traitements à l'aide du logiciel Image J : différenciation des zones hyperminéralisées, déminéralisées et non altérées par couleur (b : vert = zones hyperminéralisées, bleu = zones déminéralisées), noir et blanc (c) ; sélection des zones déminéralisées (d) et hyperminéralisées (e) pour le calcul d'aire.

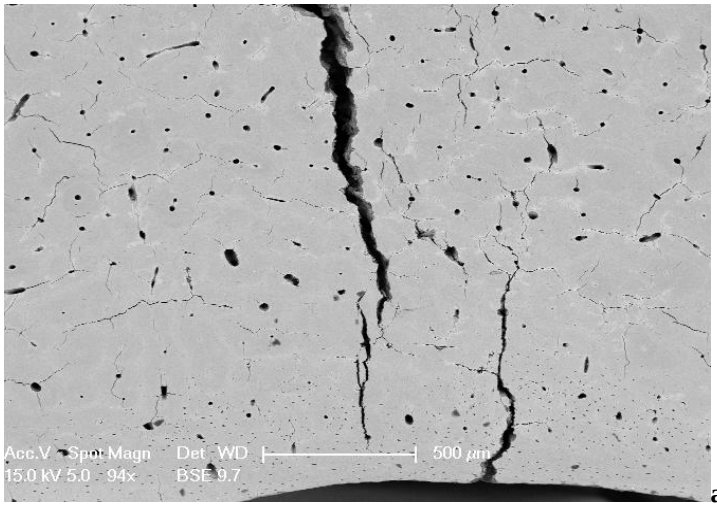
<u>STTA13 (50 µm), mesure de la porosité :</u>


a)

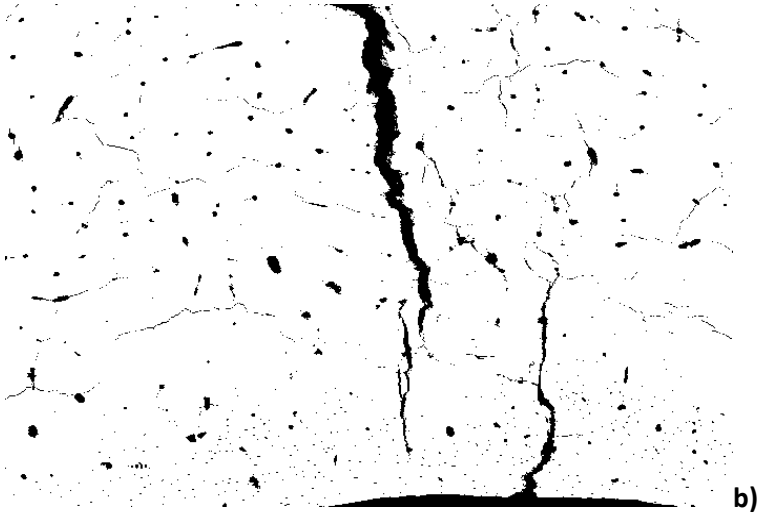

b)

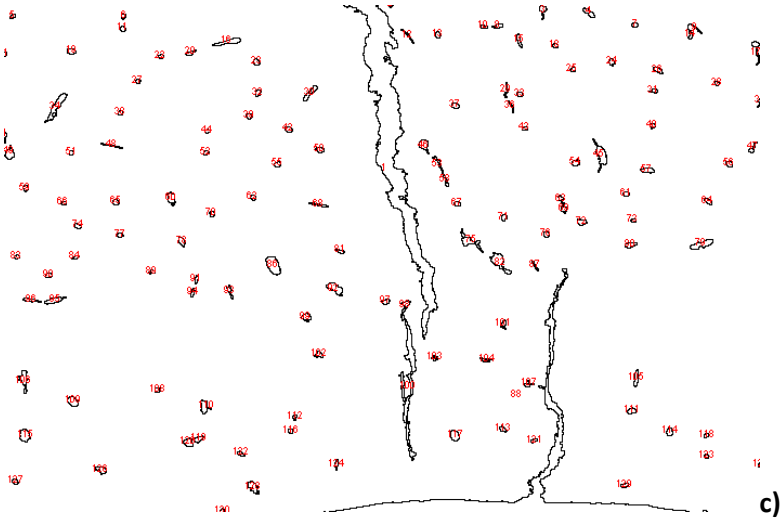
D’après une photographie MEB (a : STTA13), inversion des couleurs (Logiciel Image J) pour calculer l'aire de toutes les zones blanches (b).

<u>BZ2011-01 (500 µm), mesure de la porosité :</u>



a)





D'après une photographie MEB (a : BZ2011-01), inversion des couleurs (Logiciel Image J) pour calculer l'aire de toutes les zones noires (b) ou blanches (c).

E Echantillons modernes et index histologique (HI):

Echantillons	HI
CaB1	4
CaB3	5
CaB5	5
CaV5	2
ForB1	4
ForB5	4

ForV5	5
SiB1	4
SiB5	4
HClB1	5
HClB5	5
KOHB3	4
KOHB5	5
Ch	5
CultB2	4
CultB3	3
CultB7	3
CultB12	2
Echantillons LRMH	5

F Echantillons archéologiques et index histologique (HI) :

Echantillons Song Terus	HI
ST06	0
STTA13	0
STTA14	1
STTA02	0
STTA08	5
STTA17	2
STTA18	4
STTA20	5
STTA22	5

Echantillons Bize-Tournal	HI
BZ2011-01	5
BZ2011-03	5
BZ030-18	5
BZ2011-14	5
BZ2011-15	0

BZ2011-16	5
BZ2011-19	5
BZ2010-21	5
BZ2011-22	0
BZ2011-23	5
BZ2011-24	0
BZ2011-25	0

Références bibliographiques

An, Y. H. & Martin, K. L. (2003), Handbook of histology methods for bone and cartilage, Humana Press, Totowa, New Jersey, 589 p.

Andrews, P. (1995), Experiments in taphonomy, *Journal of Archaeological Science*, 22: 147-153).

Andrews, P. & Armour-Chelu, M. (1998), Taphonomic observations on a surface bone assemblage in a temperate environment, *Bulletin de la Société Géologique de France*, 169 : 433–42.

Andrews, P., Cook, J. (1985), Natural modifications to bones in a temperate setting, Man, New Series, 20 (4): 675-691.

Baronne, R. (1986), Anatomie comparée des mammifères domestiques, Tome 1 : Ostéologie, Paris : Vigot.

Baud, C.-A. (1986), Altérations osseuses *post-mortem* d'origine fongique ou bactérienne, *Anthropologie physique et Archéologie*, 135- 146.

Bell, L. S. (1990), Palaeopathology and diagenesis : an SEM evaluation of structural changes using backscattered electron imaging, *Journal of Achaeological Science*, 17: 85-102.

Bell, L. S., Skinner, M. F., et Jones, S. J. (1996), The speed of post mortem change to the human skeleton and its taphonomic significance, *Forensic Science International*, 82: 129-140

Berna, F., Matthews, A. and Weiner, S. (2004), Solubilities of bone mineral from archaeological sites: the recrystallization window, *Journal of Archaeological Science*, 21: 867-882.

Brady, A. L., White, C. D., Longstaffe, F. J., Southam, G. (2008), Investigating intra-bone isotopic variations in bioapatite using IR-laser ablation and micromilling: implications for identifying diagenesis?, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 266: 190-199.

Calligaro, T., Dran, J.C., Salomon, J. & Walter, P. (2004), Review of accelerator gadgets for art and archaeology, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 226: p. 9-37.

Chacornac-Rault, M. (2004), Etudes palynologique et paléoenvironnementale de sondages holocènes dans les Gunung Sewu (Java, Indonésie). Reconstitution de l'environnement, impacts climatiques et anthropiques. Mise en évidence de la néolithisation. Thèse de Doctorat du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris. 425 p.

Child, A.M., Gillard, R. D.., Pollard, A. M. (1993), Microbially-induced promotion of amino acid racemization in bone: R.D.isolation of the microorganisms and the detection of their enzymes, *Journal of Archaeological Science*, 20: 159–168.

Child, A. M. (1995a), Towards an understanding of the microbial decomposition of archaeological bone in burial environment, *Journal of Archaeological Science*, 22: 165-174.

Child, A. M. (1995b), Microbial taphonomie of archaeological bone, *Studies in Conservation*, 40: 19-30.

Collins, M. J., Riley, M. S., Child, A., et Turner-Walker, G. (1995), A basic mathematical simulation of the chemical degradation of ancient collagen, *Journal of Archaeological Science*, 22: 175-183.

Collins, M. J., Nielsen-Marsh, C. M., Hiller, J., Smith, C. I., Roberts, J. P. (2002), The survival of organic matter in bone: a review, *Archaeometry*, 44: 383–394.

Davet, P. (1996), Vie microbienne du sol et production végétale, Editions Quae, 380 p.

Denys, C. (2002), Taphonomy and experimentation, *Archaeometry* 44 (3): 469-484.

Détroit, F. (2002), Origine et évolution des Homo Sapiens en Asie du Sud-est: Descriptions et analyses morphométriques de nouveaux fossiles, Thèse de doctorat: Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 444 p.

Dobberstein R. C., Collins, M. J., Craig, O. E., Taylor, G., Penkman, K. E. H., Ritz-Timme, S. (2009), Archaeological collagen: why worry about collagen diagenesis?, *Archaeol. Anthropol. Science*, 1: 31-42.

Fernandez-Jalvo, Y., Sanchez-Chillon, B., Andrews, P., Fernandez-Lopez, S., Alcala Martinez, L. (2002), Morphological taphonomic transformations of fossil bones in continental environments, and repercussions on their chemical composition, *Archaeometry* 44: 353-362.

Fratzl, P. (2008), Collagen : Structure and mechanics, an introduction, Springer Science + Business Media, 506 p.

Gallet, X. (2004), Dynamique de la sédimentation dans les grottes du karst de Punung (Pacitan, Java). Relation avec les occupations paléolithiques. Thèse de doctorat du Muséum National d'Histoire Naturelle. Paris. 388p.

Guay, M. (2005), Anatomie fonctionnelle de l'appareil locomoteur: os, articulations, muscles, Les Presses de l'Université de Montréal, 356 p.

Gutierrez, M. A. (2001), Bone diagenesis and taphonomic history of the Paso Otero 1 Bone Bed, Pampas of Argentinas, *Journal of Archaeological Science*, 28: 1277-1290.

Hackett, C. J. (1981), Microscopical focal destruction (tunnels) in exhumed human bones, Medicine, *Science and the Law*, 21 (4): 243-265.

Hameau, S. (2004), Datation des sites paléolithiques du Pléistocène moyen et supérieur de Punung (Pacitan, Java). Application des méthodes ESR et U-Th aux grottes de Song Terus et Goa Tahuhan. Thèse de doctorat du Muséum national d'Histoire naturelle. 300 p.

Hanson, D.B., Buikstra, J.E. (1987), Histomorphological alteration in buried human bone from the lower Illinois Valley: implications for paleodietary research, *Journal of Archaeological Science*, 14: 549–563.

Harbeck, M., Grupe, G. (2009), Experimental chemical degradation compared to natural diagenetic alteration of collagen : implications for collagen quality indicators for stable isotope analysis, *Archaeol. Anthropol. Sci*, 1: 43-57.

Hedges, R. E. M., Millard, A. R., and Pike A. W. G. (1995), Measurements and relationships of diagenetic alteration of bone from three archaeological sites, *Journal of Archaeological Science*, 22: 201-209.

Hedges, R.E.M., and Millard, A.R. (1995), Bones and ground water: towards the modelling of diagenetic processes, *Journal of Archaeological Science*, 22: 155–164.

Hedges, R.E.M. (2002), Bone diagenesis: an overview of processes, *Archaeometry*, 44: 319–328.

Hillier, M. L., Bell, M. Sc. And L. S. (2007), Differentiating Human Bone from animal bone: A review of histological methods, *Journal Forensic Science*, 52(2): 249-263.

Jackes, M., Sherburne, R., Lubell, D., Barker, C., Wayman, M. (2001), Destruction of the microstructure in archaeological bone: a case study from Portugal, *International Journal of Osteoarchaeology*, 11 (6): 387–399.

Janaway, R. C. (1990), Experimental investigations of the burial environment of inhumation graves, in *Experimentation and reconstruction in environmental archaeology* (ed. D. E. Robinson), 147–9.

Jans, M. M. E., Kars, H., Nielsen-Marsh, C. M., Smith, C. I., Nord, A. G., Arthur, P., and Earl, N. (2002), *In situ* preservation of archaeological bone. A histological study within a multidisciplinary approach, *Archaeometry*, 44: 342-352.

Jans, M. M. E., Nielsen-Marsh, C. M., Smith, C. I., Collins, M. J., Kars, H. (2004), Characterisation of microbial attack on archaeological bone, *Journal of Archaeological Science*, 31 (1): 87-95.

Katz, J. L., Misra, A., Spencer, P., Wang, Y., Bumrerraj, S., Nomura, T., Eppell, S. J., Tabib-Azar, M. (2006), Multiscale mechanics of hierarchical structure/property relationships in calcified tissues and tissue/materiel interfaces, Materiel Science & Engineering C, 1-19.

Lebon M., Reiche I., Fröhlich F., Bahain J.J., Falguères C. (2008), Archaeological burnt bones characterization: contribution of a new analytical protocol based on derivative FTIR Spectroscopy and curve fitting of the ν1ν3PO4 domain, *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 392 : 1479-1488.

Lebon, M., (2008), Caractérisation par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier des ossements chauffés en contexte archéologique e Comparaison entre référentiel moderne et matériel archéologique, Implication diagénétique.*Thèse du Muséum national d'Histoire naturelle*, Paris, 339 p.

Lebon, M., Reiche, I., Bahain, J. J., Chadefaux, C., Moigne, A. M., Fröhlich, F., Sémah, F., Schwarcz, H. P., Falguères, C. (2010), New parameters for the characterization of diagenetic alterations and heat-induced changes of fossil bone mineral using Fourier transform infrared spectrometry, *Journal of Archaeological Science*, 37: 2265-2276.

Lebon, M., Müller, K., Bahain, J. J., Fröhlich, F., Falguères, C., Bertrand, L., Sandt, C., Reiche, I. (2011), Imaging fossil bone alterations at the microscale by SR-FTIR microspectroscopy, J. Anal. At. Spectrom, 26: 922-929.

Lopez-Gonzalez, F., Grandal-d'Anglade, A. & Vidal-Roman, J.R. (2005), Deciphering bone depositional sequences in caves thought the study of manganhse coatings. *Journal of Archaeological Science.*

Lyman, R. L. (1994), *Vertebrate taphonomy. Cambridge manuals in archaeology*, Cambridge University Press, Cambridge. 527 p.

Marchiafava, V., Bonucci, E., Ascenzi, A. (1974). Fungal osteoclasia: a model of dead bone Resorption, *Calcified Tissue Research*, 14: 195–210.

Magniez, P. (2009), Taphonomic study of the middle and upper Palaeolithic large mammal assemblage from Tournal Cave (Bize-Minervois, France), *Journal of Taphonomy*, 7 (3-4): 203-233.

Molleson, T. (1990), The accumulation of trace metals in bone during fossilization, in *Trace metals and fluoride in bone and teeth* (eds. N. D. Priest and F. L. Van der Vyver), 341–65, CRC Press, Boca Raton, Florida.

Muller, K., Chadefaux, C., Thomas, N., Reiche, I. (2011), Microbial attack of archaeological bones versus high concentrations of heavy metals in the burial environment. A case study of animal bones from a mediaeval copper workshop in Paris, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*.

Nehlich, O., Richards, M. P. (2009), Establishing collagen quality criteria for sulphur isotope analysis of archaeological bone collagen

Nicholson, R.A. (1996). Bone degradation, burial medium and species representation: debunking the myths, an experiment based approach. *Journal of Archaeological Science*, 23 (4), 513–533.

Nielsen-Marsh, C. M., and Hedges, R. E. M. (1997), Dissolution experiments on modern and diagenetically altered bone and the effect on the infrared splitting factor, Bulletin *de la Société Géologique de France*, 168: 485-490.

Nielsen-Marsh, C. N., Gernaey, A. M., Turner-Walker, G., Hedges, R. E. M., Pike, A. W. G., and Collins, M. J. (2000), The chemical degradation of bone, in *Human osteology in archaeology and forensic science* (eds. M. Cox and S. Mays), 439-454, Greenwich Medical Media, London.

Nielsen-Marsh, C.M., Hedges, R.E.M. (2000a). Patterns of diagenesis in bone 1: the effects of site environments. *Journal of Archaeological Science* , 27: 1139–1151.

Nielsen-Marsh, C., and Hedges, R. E. M. (2000b), Patterns of diagenesis in bone II: effects of acetic acid treatment and removal of diagenetic CO3 2−, *Journal of Archaeological Science*, 27: 1151–9.

Nielsen-Marsh, C. M., Smith, C. I., Jans, M. M. E., Nord, A., Kars, H., Collins, M. J. (2007), Bone diagenesis in the European Holocene II: taphonomic and environmental considerations, Journal of Archaeological Science, 34:1523-1531.

Olszta, M. J., Cheng, X., Jee S. S., Kumar, R., Kim Y-Y, Kaufman, M. J., Douglas, E. P., Gower, L. B. (2007), Bone structure and formation: a new perspective, Matérials Science and Engineering, 58 (3-5): 77-116.

Pate, F. D., (1998), Bone collagen preservation at the Roonka Flat Aboriginal burial ground: a natural laboratory, *Journal of Field Archaeology,* 25, 203–217.

Patou-Mathis, M. (1994), Archéozoologie des niveaux moustériens et aurignaciens de la grotte Tournal à Bize (Aude). *Gallia Préhistoire.* 36: p. 1-64.

Patou-Mathis, M., Bayle, G. & Paletta, C. (1999), Etude archéozoologique du niveau magdalénien ancien de la grotte Tournal à Bize (Aude). *Préhistoire Européenne.* 14: p. 115-133.

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

Piepenbrink, H., 1986. Two examples of biogenous dead bone decomposition and their consequences for taphonomic interpretation. *Journal of Archaeological Science,* 13, 417–430.

Plate, D., 1994, Bone chemistry and paleodiet, *Journal of Archaeological Method and Theory*, 1(2), 161-209.

Price, T. D., Blitz, J., Burton, J., Ezzo, J. A., 1992, Diagenesis in prehistoric Bone: problems and solutions, Journal of Archaeological Science, 19, 513-529.

Reiche, I. (2000), Processus physico-chimiques d'altération d'ossements et d'ivoires anciens. *Thèse de doctorat de l'Université Paris 6.* p. 275.

Reiche, I., Favre-Quattropani, L., Calligaro, T., J, S., Bocherens, H., Charlet, L. & Menu, M. (1999), Trace Element Composition of Archaeological Bones and Postmortem Alteration in the Burial Environment. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B.* 150: p. 656-662.

Reiche, I., Favre-Quattropani, L., Vignaud, C., Bocherens, H., Charlet, L. & Menu, M. (2003), A multi-analytical study of bone diagenesis : the Neolithic site of Bercy (Paris, France). *Meas. Sci. Technol.* 14: p. 1608-1619.

Reiche, I., Vignaud, C. & Menu, M. (2002), The Crisrallinity of Ancient Bone and Dentine: New Insights by Transmission Electron Microscopy. *Archaeometry.* 44: p. 447-459.

Reiche, I., Vignaud, C. and Menu, M., (2002), The crystallinity of ancient bone and dentine: new insights by transmission electron microscopy. Archaeometry 44, 447-459.

Salomon, C. D., Haas, N., (1967), Histological and histochemical observation on undecalcified sections of ancient bones from excavations in Israel, *Israel Journal of Medical Science*, 3, 747–754.

Sasso, M. C., (2008), Traitement et Analyse du sognal Ultrasonore pour la caractérisation de l’os cortical, these de doctorat, Université de Paris 12, 215 p.

Sémah, F., Sémah, A.M., Falguères, C., Détroit, F., Gallet, X., Hameau, S., Moigne, A.M. & Simanjuntak, H.T. (2004), The significance of the Punung karstic area (Eastern Java) for the chronology of the Javanese Palaeolithic, whit special reference to the Song Terus cave. *Modern Quaternary Research in Southeast Asia.* 17.

Smith, C.I., Nielsen-Marsh, C.M., Jans, M.M.E., Arthur, P., Nord, A.G., Collins, M.J., (2002),The strange case of Apigliano: early fossilization of medieval bone in Southern Italy, *Archaeometry*, 44: 405–416.

Thomas, N. (2006), « Paris 75003 – Hôtel de Mongelas- Un atelier métallurgique du XIVe siècle : artisan ou industriel ? », in Actes des journées archéologiques d'Île-de-France, 29 nov. 2003, Saint-Denis, p. 3-11.

Tortora, G. J & Derrickson, B. (2007), Principes d'anatomie et de physiologie, Ed : De Boeck, 1300 p.

Tavoso, A. (1987), Le remplissage de la grotte Tournal à Bize-Minervois (Aude). *Cypsela, VI, Girona,* 23-25.

Trueman, C.N., Martill, D.M. (2002), The long term preservation of bone: the role of bioerosion. *Archaeometry*, 44: 371–382.

Turner-Walker, G., Syversen, U. (2002), Quantifying histological changes in archaeological bones using BSE-SEM image analysis. *Archaeometry,* 44 (3): 161–168.

Turner-Walker, G., Jans, M. (2008), Reconstructing taphonomic histories using histological analysis, Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeiecology, 266: 227-235.

White, E. M. and Hannus, L. A. (1983), Chemical weathering of bone in archaeological soils. American Antiquity, 48: 316-322.

Résumé

Ce travail de recherche a principalement porté sur un aspect de l'histoire taphonomique et plus spécialement de la diagenèse : les altérations microbiennes sur os.

Ce travail a été réalisé par l'étude d'ossements archéologiques provenant des sites en grotte de Song Terus (Java, Indonésie) et de Bize-Tournal (France) et par la réalisation d'un référentiel moderne expérimental. Les analyses par microscopie électronique à balayage (MEB) et par spectroscopie PIXE ont permis d'observer des corrélations entre faciès d'altération et conditions environnementales ou modes de déposition des vestiges archéologiques. Les résultats sont encore à approfondir et les méthodes à diversifier.

Afin d'obtenir davantage de résultats et de permettre des comparaisons avec le mobilier archéologique, il serait plus adéquat de réaliser un référentiel moderne expérimental dans des conditions plus réalistes et sur des périodes de temps plus longues.