



HAL
open science

Les isotopes des métaux de transition (Cu, Fe, Zn) au service de l'anthropologie

Klervia Jaouen

► **To cite this version:**

Klervia Jaouen. Les isotopes des métaux de transition (Cu, Fe, Zn) au service de l'anthropologie. Sciences agricoles. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2012. Français. NNT : 2012ENSL0751 . tel-00781645

HAL Id: tel-00781645

<https://theses.hal.science/tel-00781645>

Submitted on 28 Jan 2013

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

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

THÈSE

présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR de l'École Normale Supérieure de Lyon-Université de Lyon
Discipline : Sciences de la Terre

LES ISOTOPES STABLES DES MÉTAUX DE TRANSITION (Cu, Fe, Zn) AU SERVICE DE L'ANTHROPOLOGIE

Klervia JAOUËN

présentée et soutenue publiquement le 19/10/12 devant un jury composé de :

<i>Rapporteurs</i>	Jaroslav BRUZEK	Université Bordeaux I
	Jeroen SONKE	Université Toulouse III
<i>Examineurs</i>	Eric CRUBÉZY	Université Toulouse III
	Estelle HERRSCHER	Aix-Marseille Université
	Christophe LÉCUYER	Université Lyon I
	Thomas TÜTKEN	Université de Bonn
<i>Directeur de thèse</i>	Vincent BALTER	Ecole Normale Supérieure de Lyon

Résumé

L'outil isotopique est couramment utilisé en anthropologie car il apporte des informations métaboliques complémentaires à l'étude ostéologique, notamment sur la mobilité et l'alimentation des populations passées. Cependant, sur la trentaine d'éléments présente dans le corps humain, seuls six d'entre eux sont classiquement étudiés dans les ossements. Récemment, des différences isotopiques entre le sang des hommes et celui des femmes ont été découvertes pour le cuivre et le fer. Dès lors, les isotopes stables des métaux de transition représentent une source d'informations inexploitée.

Le but de ce travail de thèse est de comprendre l'origine de la variabilité isotopique du cuivre, du zinc et du fer dans le corps humain, et ainsi, d'évaluer l'apport potentiel de ces métaux à l'anthropologie. Pour cela, les éléments ont été séparés par chromatographie sur résine échangeuse d'ions. Puis, les rapports isotopiques ont été mesurés par spectrométrie de masse à source plasma et à multicollection (MC-ICP-MS).

L'analyse du $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ d'ossements archéologiques, provenant de Saint-Laurent de Grenoble, a permis de mettre en évidence une différence isotopique entre hommes et femmes, reflet de celle observée dans le sang. Cette dissemblance isotopique est discutée à partir d'un modèle mathématique s'appuyant sur nos analyses du foie et de l'émail dentaire. Celui-ci nous a amenés à mettre en cause le rôle de la sollicitation hépatique dans la composition isotopique du sang plutôt que celui de l'absorption intestinale. L'étude du $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$ dans le sang d'une population française et d'une population yakoute a également contribué à dégager trois autres facteurs significatifs de variabilité isotopique : la ménopause, l'âge et le stress thermique.

Nos résultats sont donc en faveur du développement de l'analyse des isotopes stables du Fe, Cu et Zn des restes humains en tant que vecteur potentiel d'informations cruciales pour l'anthropologie : âge au décès, âge à la ménopause, sexe et adaptation métabolique au froid.

Using metal stable isotopes for anthropological purposes

Abstract

First developed in geochemistry, isotopic analyses have progressively become a classical tool in anthropology over the past 40 years. They provide supplementary metabolic information to osteology, such as mobility or diet of past populations. However, isotopic studies have relied so far only on six of the thirty elements found in the human body. Recently, sex isotopic differences have been found in blood for copper and iron. Therefore, metal stable isotopes could supply new type of information for crucial issues of anthropology, such as sex, age-at-death or fecundity.

The aim of this thesis is to understand the origin of copper, iron and zinc isotopic variability in the human body, and to assess the contribution of these elements for anthropology. In order to do this, metals were purified from sample matrix by liquid chromatography on ion exchange resin and the isotope compositions were measured by multiple-collector inductively-coupled plasma mass spectrometry (MC-ICP-MS).

$\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{65}\text{Cu}$ analyses performed on phalanx of skeletons coming from a French cemetery (Saint-Laurent de Grenoble) revealed an isotopic sex difference which mirrors the one found in blood. Concerning its origin, calculations and data obtained on dental enamel support the hypothesis that the isotopic sex difference is due to a higher metal hepatic solicitation for women rather than differential intestinal absorption between men and women. Blood isotopic data from French and Yakut population also highlighted three other significant factors of variability: menopause, age, and cold stress.

Our results argue for the development of Fe, Cu, and Zn stable isotope analyses in human remains as a potential vehicle for information on age-at-death, age at menopause, sex and metabolic adaptation to cold stress of past populations.

Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier Vincent Balter pour m'avoir proposé ce sujet novateur et accepté d'en assumer la direction. Je lui sais gré de m'avoir formée à la fois aux techniques de laboratoire, à la rédaction d'articles et pour son encadrement scientifique exceptionnel.

Je suis également très honorée que Christophe Lécuyer, Jaroslav Bruzek, Eric Crubézy, Estelle Herrscher, Thomas Tütken et Jeroen Sonke, aient accepté de faire partie de ce jury de thèse. Je suis ravie de l'internationalité de ce jury, à défaut de pouvoir en apprécier la parité! Je remercie chaleureusement Jaroslav Bruzek et Jeroen Sonke pour leurs précieuses remarques qui ont permis d'améliorer le manuscrit (děkuji & dank u). Mes vifs remerciements à Estelle Herrscher pour ses conseils, ses corrections et son aide précieuse sur les données de Saint-Laurent de Grenoble mais aussi pour son enthousiasme et sa disponibilité. J'adresse également ma reconnaissance à Eric Crubézy pour son aide sur les données de la population de Viliouisk. Vielen Dank an Thomas Tütken für sein Kommen und sein Interesse an dieser Arbeit. Enfin je souhaite remercier Christophe Lécuyer d'avoir accepté de faire partie de ce jury, de l'avoir présidé et pour m'avoir formée en master sur l'isotopie des éléments légers.

Je souhaite à tout prix exprimer ma reconnaissance à

Francis Albarède pour son aide précieuse tout au long de la thèse, en particulier pour les discussions enrichissantes qui ont contribué à améliorer la qualité de ce travail.

- Philippe Telouk qui m'a formée et épaulée sur les spectromètres de masse à multi-collection. J'ai véritablement apprécié sa confiance, sa compétence et sa hotline Nu1700 7jr/7.

- Emmanuelle Albalat et Aline Lamboux pour m'avoir formée et conseillée sur les techniques de chromatographie. Merci également pour leur amitié.

- Florent Arnaud pour supporter ma consommation d'acides (surtout chlorhydrique) et pour son aide. Chantal Douchet, pour son aide en salle blanche lors du master. Je lui souhaite le meilleur à Montpellier.

- François Fourel et François Martineau pour leurs explications, leurs encouragements, leur aide et leur disponibilité.

- Laurent Pouilloux pour son aide incroyable sur la programmation et, bien sûr, pour

son amitié. Je lui souhaite un bel avenir pour ses travaux sur les mondes parallèles et les transferts de machine virtuelle :).

- Janne Blichert-Toft. Tak for jeres mange rettelser af engelsk og for dit råd.
- Jean-Michel Brazier et Axelle Zacaï pour leur aide, leur bonne humeur et leur motivation lors de leur stage en laboratoire de M1.

Thanks to Michael Richards and Jean-Jacques Hublin for helpful comments and of course for the postdoctoral position. I look forward to working with you at the Max Planck Institute!

J'adresse mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont fourni des échantillons et que je n'ai pas encore mentionnées : Didier Berthet du Centre de Conservation et d'Étude des Collections, JC Neidhardt du musée Testut Latarjet d'Anatomie de Lyon, Francis Camoin de l'Établissement Français du Sang de Lyon, Michelle Gigou et Christian Bréchet du centre hépatobiliaire (U785 INSERM) de l'Hôpital Paul Brousse. Un grand merci à Daniel Besse pour les dents de sagesse.

Merci à Matthieu Perreira Da Silva pour son template de thèse Lyx! Il est unique en son genre et extrêmement pratique à utiliser.

Toute ma sympathie va également à l'ensemble des membres du Laboratoire de Géologie de Lyon pour son superbe accueil. Je remercie en particulier les membres de l'équipe des géochimistes avec lesquels j'ai eu des discussions très enrichissantes : Ghylaine Quitté, Sylvain Pichat, Zuzana Fekiacova, Anne-Marie Aucour et Hervé Bertrand. Je remercie également Pierre Thomas, Sylvie Roberjot, Brigitte Martin-Sempore, Marie-Emmanuelle Ambre, Frédérique Rosset, Naïma Khrouz, Stéphane Labrosse, Frédéric Chambat, Gilles Montagnac, Bertrand Van der Moortele, Gilles Dromart et Hervé Cardon pour leur aide et leurs conseils.

Merci à la folle équipée du Bureau, ses membres passés, actuels et assimilés. Merci aux colons bretons, Cécile Feuillie, la coloc/cobureau de toujours, Ange Le Boudec le Jedi du Molybdène, Marine Lasbleis la chasseuse de Loups (special thanx pour ta patience lors de mes harcèlements bibliographiques), Margaux Mesle et Anaïs Cario, prêtes des Bernardes L'hermite. Merci à l'hercynien et archéen Martin Guitreau, le Seigneur des Anneaux. Par la même occasion, je salue Emilie Vignier-Guitreau (bisou) et le roi Arthur Guitreau. Merci aussi à Romain Bouchet Bert Manoz même s'il a réduit l'équilibre géologique du Bureau à néant. Un grand merci scientifique et loutresque à Marie-Laure Pons et sa manucure daliesque ainsi qu'à sa cyber-épouse Anne-Marie Desaulty et son incroyable garde-robe. Mille mercis à Maïa Kuga, qui me manque depuis Nancy! Je n'oublie pas la toute nouvelle Docteur Stéphanie Durand, félicitations & merci pour ton gaspacho et toutes ces années d'amitié à l'ENS! Obrigado à Baptiste Journaux pour son cadeau de mariage et son tzatziki. Merci encore à Tristan Ferroir, éternel chef de feu

le goûter, Germain Lesoeur et Elise Poupart pour leur humour et leurs chorés, Camille Thomas, Abel Guilloux, Léa Bello, Thomas Breton, Hugo Delile, Valérie Migeon, Xue Ying Wang, Aurélien Royer et Bertrand Trey pour leur sympathie et leur bonne humeur. Gracias a Alejandra Vargas Calderon. Děkuji Martina Ulrovna. Merci aussi à tous les conjoints, conjouines et équivalents : Cédric, Hélène, Isaac, Janyce, Justine.

Pas de thèse sans moral et pas de moral sans copains : Merci donc à celles et ceux qui n'ont pas encore été cité-e-s : Séverine Aubert et Virginie Knittel, les meilleures copines de toujours (vous viendrez manger des Bretzels ?), Jessica Flahaut et Aurore Movellan, les BFF depuis l'ENS (avec Cécile Feuillie ! N'oubliez pas nos events starbucks via google +), Amandine Erktan et Grégory Fanjat, les colocs à jamais. Ravie d'avoir retrouvé à Lyon Morgane Ollivier et Grégory Ruz, cette fois-ci on ne se perd pas de vue ! Thanks to Janette Wilson and Katie Palumbo for their warm welcome in Providence ! Un grand merci aussi aux formidables Pierre Augier, Marco Delgado, Mélodie Faury, Marianne Métois, Gildas Le Goff, Louis Letertre, Anne Pélissier ainsi que la belle équipée du L : Julie, Myriam, Morgane & Pauline.

Toute ma reconnaissance va également à Daniel Cuche pour m'avoir encouragée et pour ses excellents cours !

Merci aussi à ma famille, au sens large, pour son incroyable soutien : mon père, mon coach physique & chimie pendant des années ; ma mère, qui m'a appris à lire et travailler ma mémoire : sans vous, je n'en serais pas là ! Ma soeur Elena, pour me faire rire depuis toujours et pour le modèle de réussite qu'elle représente (Congrats) ; mon frère Ewan, pour son soutien et nos discussions : tu as aussi un brillant avenir devant toi ! également mes grands mères, mes meilleures supporters. Je n'oublie pas mes grands-pères qui m'ont toujours encouragée. Mes oncles, tantes, cousins et cousines d'exception : merci d'avoir fait le déplacement (ou d'en avoir eu l'intention). Je pense aussi à Maëlys, Elouan et Victorine. Je remercie encore une fois mon oncle Daniel Besse, meilleur dentiste au monde, pour son aide ! Merci aussi à la famille Le Fèvre pour son accueil et son soutien lors des concours. Je tiens également à remercier Laurence, best belle-mère ever, Ronan, mon frère d'adoption, Aurélie et Cyrielle, mes formidables belles-soeurs, Sarah que je ne demande qu'à mieux connaître. Une pensée chaleureuse pour Alice, Jérémy et Michel. Je suis également très reconnaissante envers M et Mme Guinot pour leur gentillesse et leur accueil. Bisous à Dali, le meilleur des réveils matins. Merci enfin à la plus belle, Jennifer. Merci d'avoir relu 400 pages, et d'être là au quotidien, quelque soit le pays.

Maintenant direction Leipzig !

Table des matières

Résumé	i
Abstract	v
Remerciements	vii
Table des matières	xi
Abréviations	xxi
De la géochimie à l'anthropologie	7
1 Quels sont les apports pré-existants de la géochimie à l'anthropologie ?	11
1.1 Isotopes stables classiquement utilisés en bioarchéologie	11
1.1.1 $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ et régime alimentaire	11
1.1.2 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ et traçage des migrations	12
1.1.3 $\delta^{18}\text{O}$, paléoclimats et mobilité.	14
1.2 L'émergence de nouveaux outils isotopiques	16
1.2.1 $\delta^{34}\text{S}$ et habitat côtier	16
1.2.2 $\delta^{44}\text{Ca}$ et consommation de produits laitiers	16
1.2.3 Isotopes stables du strontium et régime alimentaire	18
1.3 Conclusion	19
2 Quelle est la demande de nouveaux outils géochimiques en anthropologie ?	21
2.1 Diagnose sexuelle	22
2.2 Détermination de l'âge au décès	24
2.3 Indice de fécondité	26
2.3.1 Une nécessité pour la paléodémographie	26
2.3.2 Implication pour l'hypothèse de la grand-mère	27

TABLE DES MATIÈRES

2.4	Perturbations et adaptations métaboliques	27
2.4.1	Pathologies	27
2.4.2	Adaptation au stress thermique	28
3	Potentiel des métaux de transition comme nouveaux outils anthropologiques	31
3.1	Généralités sur le fer, cuivre et zinc	31
3.2	Métabolisme des métaux de transition	32
3.2.1	Besoins alimentaires de fer, cuivre et zinc	32
3.2.2	Cycles métabolique des métaux de transition	32
3.2.2.1	Cycle métabolique du fer.	32
3.2.2.2	Cycle métabolique du cuivre	35
3.2.2.3	Cycle métabolique du zinc	36
3.2.3	Interactions entre les cycles métaboliques	38
3.2.3.1	Cuivre et fer	38
3.2.3.2	Cuivre et zinc	41
3.3	Processus engendrant des fractionnements isotopiques dans le vivant . . .	41
3.4	Historique des mesures du $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$	42
	Matériel et Méthodes	47
4	Description des matériaux analysés	51
4.1	Tissus minéralisés	51
4.1.1	Os	51
4.1.1.1	Structure de l'os	51
4.1.1.2	Croissance et remaniement de l'os	53
4.1.1.3	Le fer, le cuivre et le zinc dans l'os	53
4.1.2	Email dentaire	55
4.1.2.1	Structure de l'émail dentaire	55
4.1.2.2	Formation de l'émail prismatique	55
4.1.2.3	Le fer, le cuivre et le zinc dans l'émail dentaire	56
4.2	Sang	57
4.2.1	Composition	57
4.2.1.1	Éléments figurés	57
4.2.1.2	Plasma sanguin	58
4.2.2	Formation et renouvellement	58
4.2.2.1	Hématopoïèse	58
4.2.2.2	Régulation du plasma sanguin	58
4.2.3	Le fer, le cuivre et le zinc dans le sang	58
4.3	Organes	59
4.3.1	Endomètre	59
4.3.2	Foie	59

5	Provenance des échantillons	63
5.1	Echantillons osseux et dentaires	63
5.1.1	Saint-Laurent de Grenoble	63
5.1.1.1	Contexte archéologique	63
5.1.1.2	Données bioanthropologiques	66
5.1.2	Collections de crânes du Centre de conservation et d'Étude des Collections.	66
5.1.3	Collections du Musée d'Anatomie de Lyon	67
5.1.4	Échantillons actuels	67
5.2	Echantillons de sang	68
5.2.1	Volontaires de Viliouïsk	68
5.2.2	Volontaires français de moins de 50 ans.	68
5.2.3	Volontaires de l'Établissement français du sang	68
5.2.4	Grands singes de Parcs Zoologiques	69
5.3	Échantillons de foies	69
5.4	Échantillons de sol	70
6	Protocole de prélèvement et préparation des échantillons	71
6.1	Echantillons minéralisés	71
6.1.1	Cas des ossements	71
6.1.2	Cas de l'émail dentaire	73
6.2	Echantillons sanguins	73
6.2.1	Prélèvements sanguins	73
6.2.2	Mise en solution des échantillons de sang	73
6.2.2.1	Dissolution du sang total et des hématies	73
6.2.2.2	Leaching des parois des tubes conservés depuis plus de trois ans	74
6.3	Endomètre	75
6.3.1	Prélèvement de sang menstruel	75
6.3.2	Isolation des débris d'endomètre	75
6.4	Sol	75
6.4.1	Echantillon TSL1	76
6.4.2	Echantillon TSL2	76
7	Protocole de séparation et purification	77
7.1	Protocole de séparation et purification des métaux de transition	77
7.1.1	Principe de la chromatographie sur résine échangeuse d'ions en phase liquide.	77
7.1.1.1	Résines échangeuses d'ions	78
7.1.1.2	Coefficient de distribution et volume d'élution	78
7.1.1.3	Évaluation de la charge limite de la résine.	79

TABLE DES MATIÈRES

7.1.2	Extraction et purification des métaux de transition	81
7.1.2.1	Séparation Fe, Cu, Zn	81
7.1.2.2	Purification des métaux	81
7.1.2.3	Mesure des rendements de chimie	84
7.2	Protocole de séparation et purification des éléments légers	84
8	Analyses spectrométriques	87
8.1	Principe des analyses spectrométriques	87
8.1.1	Système d'introduction de l'échantillon	88
8.1.2	Source d'ionisation	88
8.1.2.1	Par torche à plasma	88
8.1.2.2	Electronique	88
8.1.3	Accélération et focalisation des ions en spectrométrie de masse	89
8.1.4	Analyseurs	90
8.1.4.1	Analyseur optique	90
8.1.4.2	Analyseur à quadripôle	90
8.1.4.3	Analyseur à secteur électromagnétique	90
8.1.5	Détecteurs	92
8.2	Mesures élémentaires	92
8.2.1	Intérêt des mesures élémentaires	92
8.2.2	Majeurs	93
8.2.3	Éléments traces	93
8.3	Mesures isotopiques	94
8.3.1	Analyse isotopique des éléments légers	94
8.3.2	Analyse isotopique des métaux de transition	94
8.3.2.1	Cuivre et Zinc	94
8.3.2.2	Fer	97
9	Précision et reproductibilité des mesures	99
9.1	Dispersion statistique liée à la machine	100
9.2	Dispersion statistique totale	100
9.2.1	Reproductibilité externe des mesures de zinc	102
9.2.2	Reproductibilité externe des mesures de cuivre	102
9.2.3	Reproductibilité externe des mesures de fer	104
	Isotopie du sexe	109
10	L'enregistrement isotopique du sexe dans les ossements humains	115
10.1	Introduction	115
10.2	Article « <i>Fe and Cu stable isotopes in archaeological bones and their relationship to sex</i> »	115

10.3	Composition isotopique des os crâniens et l'enregistrement de la différence homme/femme.	133
10.3.1	Résultats	133
10.3.2	Discussion	134
10.3.2.1	Différences isotopiques entre os cortical et os spongieux .	134
10.3.2.2	Différences isotopiques entre les os crâniens des hommes et des femmes	137
10.3.3	Conclusion	137
11	Potentiel de l'émail dentaire pour l'enregistrement du « sexe isotopique ».	141
11.1	Introduction	141
11.1.1	Développement dentaire	141
11.1.2	Age de la puberté et de la ménarche	143
11.1.3	Origine de la différence isotopique en cuivre/fer chez les adultes .	146
11.1.3.1	Absorption intestinale comme origine de la différence isotopique homme/femme	146
11.1.3.2	Répartition différentielle des réserves de fer et cuivre entre organes comme origine de la différence isotopique homme/femme	147
11.1.4	But de l'étude et hypothèses de travail	148
11.1.5	Analyse de l'émail dentaire des trois populations	148
11.1.6	Résultats	149
11.1.6.1	Diagénèse	149
11.1.6.2	Sexe isotopique	152
11.1.6.3	Incertitude sur les données de cuivre et de fer	152
11.1.6.4	Impact du prélèvement au niveau du collet	152
11.1.7	Discussion	154
11.1.7.1	Absence de diagénèse	154
11.1.7.2	Variabilité isotopique entre les populations	154
11.1.7.3	Absence de sexe isotopique dans l'émail dentaire	155
11.1.7.4	Origine de la différence isotopique en cuivre/fer chez les adultes	155
11.1.7.5	Vers un traceur de l'âge de ménarche ?	156
12	Impact de la ménopause sur le $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ des érythrocytes	157
12.1	Introduction	157
12.2	Article « <i>Iron and copper isotope budgets at menopause</i> »	158

Métaux de transition : facteurs de variabilité isotopique	175
13 Influence de l'âge et de la BMR sur les compositions isotopiques du sang	181
13.1 Exemple de la population yakoute	182
13.1.1 Article « <i>Basal metabolic rate, aging, and the Cu and Zn stable isotope compositions in blood of a remote Yakut population.</i> »	183
13.2 Comparaison avec la population française.	201
13.2.1 Résultats	202
13.2.2 Discussion	203
13.2.2.1 Age et BMR	203
13.2.2.2 Effet de la ménopause	204
13.3 Conclusion	206
14 Enregistrement de l'âge isotopique dans les restes humains	207
14.1 Introduction	207
14.2 Enregistrement de la dérive isotopique au cours du temps	208
14.2.1 Relation entre $\delta^{65}\text{Cu}$, $\delta^{66}\text{Zn}$ de l'os, et âge au décès	208
14.2.1.1 Cas des ossements de la population de Saint-Laurent de Grenoble	208
14.2.1.2 Cas des crânes du CCEC	208
14.2.1.3 Conclusion	209
14.2.2 Décalage isotopique entre l'émail et les os : un effet du vieillissement ?	209
14.2.2.1 Résultats	210
14.2.2.2 Discussion	210
14.2.2.3 Conclusion	214
14.3 Bilan de l'enregistrement fossile de la variabilité isotopique pour les métaux de transitions.	215
15 Variations interspécifiques et métabolisme de base : données préliminaires	217
15.1 Résultats préliminaires	218
15.1.1 Estimation de la BMR.	218
15.1.2 Données isotopiques	218
15.1.3 Corrélation avec les paramètres biologiques	220
15.2 Discussion	220
15.2.1 Impact du régime alimentaire	220
15.2.2 Impact de la gestation	220
15.2.3 BMR et métaux de transitions	222
15.3 Premières conclusions	222
16 Isotopie et alimentation	225
16.1 Influence du niveau trophique sur les $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$ corporels.	225
16.1.1 Introduction	225

16.2	Isotopie et lieu de vie	229
16.2.1	Apport de l'étude des réseaux trophiques d'Afrique du sud	229
16.2.2	Sang humain et lieu de vie	229
16.2.2.1	Géologie et composition isotopique du sang humain	229
16.2.2.2	Pédogénèse et composition isotopique du sang humain	230
16.2.3	Bilan de l'influence du lieu de vie sur les isotopes des métaux de transition du sang	231
16.3	Influence du régime alimentaire au niveau intrapopulationnel	232
16.3.1	Alimentation et composition isotopique du sang	232
16.3.2	Alimentation et composition isotopique des ossements.	234
16.3.2.1	Tendances dans le régime alimentaire de la population de Saint-Laurent de Grenoble à l'Epoque Moderne	234
16.3.3	Relation entre régime alimentaire et composition isotopique en métaux des restes humains	235
Origine du dimorphisme sexuel isotopique		241
17	Discussion autour des trois hypothèses	247
17.1	Une différence isotopique liée à des pertes endométriales?	247
17.1.1	Étude isotopique de l'endomètre et du sang menstruel	248
17.1.1.1	Résultats	248
17.2	Une différence isotopique liée à une absorption intestinale différentielle?	250
17.3	Une différence isotopique liée à une sollicitation hépatique différentielle?	253
18	Absorption intestinale ou sollicitation hépatique? Réponse de la modélisation mathématique	257
18.1	Rappel sur le cycle du fer	257
18.2	Paramétrage du modèle	258
18.2.1	Hypothèses de départ	258
18.2.2	Choix des modélisations	258
18.2.2.1	Perturbation du système par l'alimentation	258
18.2.2.2	Perturbation du système par les menstruations.	259
18.2.2.3	Temps de remise à l'équilibre après la ménopause	259
18.2.3	Définition des valeurs numériques du modèle de base	259
18.2.4	Mise en équation	262
18.3	Résultats des modélisations numériques	263
18.3.1	Modélisation pour un homme de 70 kg : influence du régime alimentaire	263
18.3.2	Modélisation pour une femme menstruée de 70 kg	263
18.3.2.1	Modèle de « l'absorption intestinale »	263
18.3.2.2	Modèle de « la sollicitation hépatique »	263

TABLE DES MATIÈRES

18.3.3	Évolution du rapport isotopique du sang après la ménopause . . .	266
18.4	Discussion	267
18.4.1	Sollicitation hépatique ou absorption intestinale?	267
18.4.2	Evolution isotopique après la ménopause	267
18.4.3	Influence de la composition isotopique de l'alimentation	268
18.4.4	Conclusion	269
Conclusion et perspectives		271
Glossaire		273
Annexes		275
A Articles annexes :		277
A.1	Article : « <i>Isotopic evidence of unaccounted for Fe and Cu erythropoietic pathways</i> »	277
A.2	Article « <i>Iron, copper and zinc isotopic fractionation up mammal trophic chains</i> »	286
B Données complémentaires des articles		303
B.1	Article « <i>Fe and Cu stable isotopes in archeological human bones and their relationship to sex</i> »	303
B.2	Article « <i>Iron and copper isotope budgets at menopause</i> »	303
B.3	Article « <i>Basal metabolic rate, aging, and the Cu and Zn stable isotope compositions in blood of a remote Yakut population</i> »	303
C Tableaux des données non publiées		317
D Informations et discussions complémentaires		319
D.1	Partie III : Diagenèse et ossements de Saint-Laurent	319
D.1.1	Absence de corrélations entre rapports isotopiques et concentrations	320
D.1.2	Test de corrélation entre concentrations en fer et en manganèse .	322
D.1.3	Filtre statistique permettant l'élimination d'échantillons suspects.	322
D.1.4	Comparaisons avec des ossements n'ayant pas été enterrés	323
D.2	Partie VI : Modélisation mathématique du lien entre menstruations et $\delta^{56}\text{Fe}$ au cours du temps.	324
D.2.1	Bulk description	324
D.2.2	For a non-menstruating subject.	325
D.2.3	For a menstruating woman	325
D.2.4	Model calculation	326

D.3 Tableau récapitulatif des échantillons analysés. 327

Bibliographie **335**

Abréviations

Les abréviations utilisées au cours de cette thèse sont les suivantes :

ADN : Acide désoxyribonucléique

BMR : Basal metabolic rate (métabolisme de base)

CCEC : Centre de conservation et d'étude des collections

DSN : Desolvating nebulizer system (système de désolvatation)

ICP-AES : Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry

M2 : Deuxième molaire

M3 : Troisième molaire

MC-ICP-MS : Multicollection inductively coupled plasma mass spectrometry

RBC : Red blood cells (érythrocytes)

RMR : Resting metabolic rate (métabolisme au repos)

PPM : parties par million

SD : Standard deviation (écart-type)

Q-ICP-MS : Quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry

Dénomination du matériel

La nature et la provenance des matériaux analysés au cours de cette thèse sont très variées. Je donne ici la dénomination qui sera utilisée pour les désigner dans la suite du texte.

Bioapatites

- OSSEMENTS DE SAINT-LAURENT : Os archéologiques du cloître de Saint-Laurent de Grenoble datant du XVII-XVIII^{ème} siècle. Seule la partie corticale des phalanges a été prélevée.

- EMAIL DENTAIRE DE SAINT-LAURENT : Email dentaire prélevé sur les troisièmes molaires (sauf précision) des individus sur lesquels les phalanges avaient été échantillonnées.

- OSSEMENTS DU CCEC : Condyles occipitaux prélevés sur les crânes d'une collection d'individus décédés à la fin du XIX^{ème} dans les Hospices Civils de Lyon et conservés au Centre de conservation et d'étude des collections de Lyon.

- EMAIL DENTAIRE DU CCEC : Email dentaire prélevé sur les troisièmes molaires (sauf précision) des individus sur lesquels les condyles occipitaux avaient été échantillonnés.

- PHALANGES DU MUSÉE D'ANATOMIE : Phalanges provenant du Musée Testut Larjet d'Anatomie de Lyon pour lesquelles la partie cortical a été prélevée.

- EMAIL DENTAIRE ACTUEL : Email dentaire prélevé sur les troisièmes molaires après extraction sur des patients de cabinet dentaire.

Tissus et organes humains :

- ERYTHROCYTES DE FRANÇAIS DE PLUS DE 50 ANS : Erythrocytes isolés à partir du sang de volontaires âgés de plus de 50 ans et prélevé à l'Etablissement Français du Sang.

- ERYTHROCYTES DE FRANÇAIS DE MOINS DE 50 ANS : Erythrocytes isolés à partir du sang de volontaires âgés de moins de 50 ans et prélevé à l'Etablissement Français du Sang et analysés par Albarède *et al.* (2011).

- SANG DE YAKOUTES : Echantillons de sang prélevés sur 39 volontaires de Viliouïsk

- SANG DE FRANÇAIS DU RÉSEAU D'ENTOURAGE : Echantillons de sang total (sauf précision) prélevés sur 12 volontaires ayant répondu à un questionnaire alimentaire et physiologique détaillé.

- ENDOMÈTRES : Débris d'endomètres isolés à partir du sang menstruel de 5 françaises du réseau d'entourage.

- FOIES : Echantillons de foies sains prélevés lors de biopsies réalisées dans les Hôpitaux de Lyon.

Autres types d'échantillons :

- SANG DE GRANDS SINGES : Sang total de Grands Singes de parcs zoologiques prélevés par des vétérinaires lors d'actes médicaux.

- TERRE DU CLOÎTRE/SOL : Terre du cloître de Saint-Laurent de Grenoble.

Introduction générale

Contexte anthropologique et géochimique

L'anthropologie peut être définie comme l'étude de l'être humain sous tous ses aspects : elle cherche simplement à répondre à la question : « *Qu'est-ce qui fait l'humain ?* ». Le terme regroupe plusieurs disciplines : les aspects culturels s'inscrivent dans la sphère de l'archéologie pour les populations passées et de l'éthnologie pour les populations actuelles¹. Les aspects biologiques, quant à eux, concernent l'anthropologie biologique ou bioanthropologie². Mais c'est le domaine de la bioarchéologie, à l'interface de la bioanthropologie et de l'archéologie, qui utilise classiquement les outils isotopiques, objets de ce travail de thèse. La bioarchéologie est une discipline récente, héritière du courant *New Archeology* des années soixante-dix. Elle se distingue de l'archéologie classique en proposant une approche biologique plutôt que socio-culturelle à l'étude des populations passées. Dans ce cadre, l'analyse isotopique appliquée aux restes humains est employée afin d'obtenir des informations métaboliques complémentaires à l'étude ostéologique.

Les techniques isotopiques constituent depuis leur mise au point une source importante d'informations pour l'étude des populations passées, ne serait-ce que par les datations radiocarbones³. Au cours de ces dernières années, le développement instrumental a rendu les analyses isotopiques moins coûteuses et les a démocratisées. Cependant, les éléments dont les isotopes sont mesurés dans le corps humain sont peu nombreux. Sur la trentaine d'éléments chimiques présents dans les organismes vivants, seuls six d'entre eux ont fait l'objet de publications traitant de leurs abondances isotopiques. De ce fait, les informations apportées par ces éléments restent limitées. Elles concernent essentiellement deux domaines : la mobilité des populations et le régime alimentaire. Pourtant, les anthropologues se heurtent à bien d'autres questions. On pensera en particulier à la détermination du sexe des jeunes individus, de l'âge au décès des adultes et de l'histoire de vie des individus (âge à la ménarche, âge à la ménopause, fécondité).

Grâce aux progrès de la spectrométrie de masse, les isotopes d'éléments tels que les métaux de transition sont désormais mesurables. En 2002, il a été montré que les abondances naturelles des isotopes du fer différaient, en moyenne, entre le sang des hommes et des femmes⁴. Cette étude est d'une importance majeure : d'une part, elle offre la perspective d'un outil isotopique de détermination du sexe et d'autre part, elle questionne le potentiel des isotopes du fer, mais aussi d'autres métaux de transition comme vecteurs

1. Parmi les aspects culturels, on pensera également à la linguistique, qui porte sur l'étude de l'évolution des langages

2. Initialement, le terme d'anthropologie désignait uniquement, en particulier en France, l'anthropologie physique. L'anthropologie physique correspond à l'étude des groupes humains d'un point de vue physiologique et en particulier ostéologique. Les développements de techniques génétiques ont apporté de nombreuses nouvelles données à cette discipline et accentué son aspect évolutif. Cela a contribué à la rebaptiser « anthropologie biologique » ou « bioanthropologie » afin de tenir compte de l'importance croissante des données biochimiques. On inclura également la paléanthropologie dans cette appellation.

3. Les premières datations radiocarbones réalisées par Willard Libby portaient justement sur des morceaux de bois de tombes égyptiennes.

4. Walczyk & von Blanckenburg (2002), voir la bibliographie

d'informations métaboliques. En effet, si le fer (Fe), le cuivre (Cu) et le zinc (Zn) constituent une part mineure de la composition du corps humain, ils n'en sont pas moins des éléments indispensables pour le bon fonctionnement d'un organisme qui interagissent au niveau de nombreux carrefours métaboliques. Ils jouent un rôle primordial dans la respiration cellulaire (Fe, Cu), l'expression génétique (Zn), la réponse immunitaire (Cu, Zn) ou la croissance et la maintenance des os (Cu). Par conséquent, des dérégulations du cycle de ces métaux provoquent des pathologies possiblement morbides telles que l'hémochromatose ou la maladie de Wilson.

Objectifs

Le constat d'un dimorphisme sexuel isotopique amène un certain nombre de questions à portée anthropologique :

- 1) *La différence isotopique entre les sexes est-elle enregistrée par les biominéraux ?*
- 2) *Existe-t-elle pour d'autres éléments que le fer ?*
- 3) *Quelle est son origine ?*
- 4) *Apparaît-elle avant la ménarche et disparaît-elle après la ménopause ?*
- 5) *Comment expliquer la variabilité isotopique interindividuelle qui engendre un recouvrement des gammes de valeurs propres à chaque sexe ? Est-ce là l'influence de l'alimentation, du lieu de vie ou de facteurs métaboliques ?*

Le but de cette thèse est de répondre à ces questions et, de cette manière, d'évaluer si l'étude de nouveaux systèmes isotopiques sur des matériaux humains pourrait séduire la communauté des anthropologues. Pour ce faire, il convient d'identifier le potentiel des isotopes des métaux de transition comme outil de sexage, en s'intéressant en particulier à l'enregistrement de la différence entre les sexes par les restes humains. De plus, l'identification de facteurs de variabilité isotopique supplémentaires peut être à la source de perspectives pour d'autres thématiques liées à l'anthropologie. Dans cette optique, le cuivre et le zinc sont particulièrement intéressants car une étude récente démontre une dérive isotopique au cours du temps de ces éléments chez le mouton, ce qui peut se révéler utile pour la détermination de l'âge au décès⁵.

Organisation de la thèse

Ce travail de thèse s'articule autour des facteurs de variabilité isotopique du cuivre, fer et zinc dans le corps humain et leur enregistrement dans les os et l'émail dentaire. Il porte à la fois sur des populations actuelles et passées. Ainsi, les analyses ont été réalisées sur du matériel biomédical, c'est à dire des organes et tissus humains, tels que le sang, le foie et l'endomètre, et sur du matériel dentaire et osseux provenant de collections archéologiques ou anatomiques. Les métaux seront séparés par chromatographie sur colonne avec résine

5. Balter et al. (2010), voir la bibliographie

échangeuse d'ions et les rapports isotopiques mesurés par spectrométrie de masse à source plasma et multicollection (ICP-MS).

- La première partie de ce manuscrit dresse un bilan des applications actuelles de la géochimie à l'anthropologie. Elle met en évidence les questions primodiales des bioarchéologues qui gagneraient à voir se développer de nouveaux outils isotopiques. Enfin, la pertinence du choix des métaux de transition comme vecteur d'informations bioanthropologiques est discutée.
- La seconde partie décrit brièvement les matériaux analysés au cours de cette thèse. Elle comprend aussi la provenance et la préparation des échantillons, le détail des protocoles chimiques et des méthodes spectrométriques. La fiabilité des analyses y est également argumentée.
- La troisième partie concerne le potentiel des isotopes du fer et du cuivre comme outil de détermination du sexe des restes humains, que ce soit à partir d'ossements ou d'émail dentaire. L'influence des événements tels que la ménarche et la ménopause sur la composition isotopique du sang et des biominéraux est discutée, ainsi que son impact sur le sexage des individus.
- La quatrième partie est consacrée à l'identification des facteurs de variabilité des isotopes du fer, cuivre et zinc dans le corps humain. On s'intéressera à l'impact du métabolisme de base sur la composition isotopique du sang et des restes humains. Nous aborderons également la notion de vieillissement isotopique, confirmant ainsi une tendance observée chez le mouton et présente des données préliminaires concernant les Grands Singes. Enfin, la question de l'impact isotopique de l'alimentation sera traitée.
- Dans la cinquième partie, nous chercherons à élucider l'origine de la différence isotopique homme/femme sur la base de l'ensemble des données obtenues au cours de cette thèse et d'une modélisation mathématique.

En se basant sur l'analyse isotopique des tissus et organes humains dans une perspective d'étude des populations passées, ce travail de thèse s'inscrit dans le domaine de l'anthropologie biologique, de la bioarchéologie et de la biogéochimie isotopique. Au cours de cette dissertation, l'utilisation du terme anthropologie désignera souvent celui de bioanthropologie. De même, toujours dans une volonté d'alléger la lecture, le mot géochimie correspondra à la biogéochimie isotopique.

De la géochimie à l'anthropologie

Introduction

Les isotopes d'un élément sont des atomes qui contiennent le même nombre de protons mais un nombre différent de neutrons. Au cours des processus nucléosynthétiques, tous les noyaux atomiques, et par conséquent tous les isotopes, sont formés. Certains noyaux sont instables et se décomposent, plus ou moins rapidement. Il s'agit des isotopes radioactifs. D'autres éléments présentent au contraire des isotopes dont le noyau ne se décompose pas au cours du temps : il s'agit des isotopes stables. L'ensemble de ces isotopes sont représentés figure 0.0.1 dans la charte des nucléides, où chaque ligne correspond à un élément de la classification périodique. Un extrait de cette charte est également proposé sur cette figure et concerne les métaux de transition.

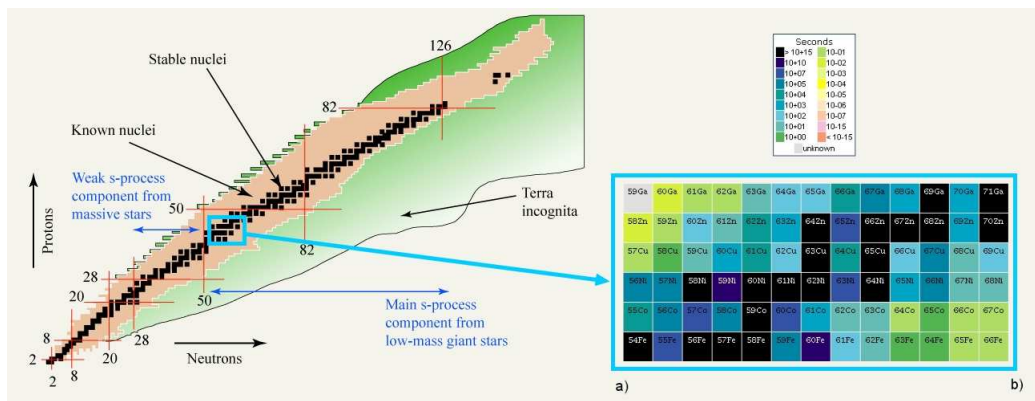


FIGURE 0.0.1: a) Charte des nucléides (Image : cococubed.asu.edu) b) Extrait de la charte des nucléides pour les isotopes de métaux de transition de la masse 54 à 71.

Les propriétés physico-chimiques des isotopes d'un même élément sont très proches étant donné qu'ils contiennent le même nombre de protons et d'électrons. Cependant, leurs masses diffèrent en raison du nombre variable de neutrons. Cette différence de masse modifie légèrement leurs propriétés cinétiques et thermodynamiques. Par conséquent, au cours d'une réaction chimique, l'abondance naturelle des isotopes d'un élément peut être modifiée entre les réactifs et les produits de la réaction. Ainsi, pour tous les éléments possédant plus de deux isotopes stables, c'est à dire la majorité de la classi-

fication périodique (Figure 0.0.1.b), on peut mesurer un rapport isotopique susceptible d'apporter une information métabolique .

Afin de mesurer un potentiel enrichissement ou appauvrissement isotopique, on utilise la notation δ . Par cette notation, on compare un rapport d'abondance entre deux isotopes de masse différente dans un échantillon à ce même rapport dans un standard international. L'écart entre les deux rapports est normalisé et multiplié par 1000 pour être plus aisément manipulable. On exprime donc les « delta » isotopiques avec l'unité pour mille (‰) suivant l'expression présentée ci-dessous pour le cas du fer :

$$\delta^{56}Fe = \frac{\left(\frac{^{56}Fe}{^{54}Fe}\right)_{ech} - \left(\frac{^{56}Fe}{^{54}Fe}\right)_{std}}{\left(\frac{^{56}Fe}{^{54}Fe}\right)_{std}} * 1000$$

Le premier spectromètre de masse moderne permettant la mesure de rapport isotopique a été réalisé par Alfred O.C. Nier dans les années quarante dans le cadre du projet Manhattan. La quantification de ces rapports a intéressé la communauté des géologues dès les débuts de la technique. Les géochimistes se sont d'abord focalisés sur les isotopes radiogéniques, permettant la datation des roches [Patterson *et al.*, 1955, Patterson, 1956]. Puis, les questions paléoclimatiques ont poussé au développement de la géochimie des isotopes stables [Dansgaard, 1964]. Ces nouveaux outils ont par la suite été appliqués, entre autres, à l'anthropologie. Seuls quelques éléments, tel que l'hydrogène, l'oxygène, le carbone, le strontium, l'azote et le soufre ont été étudiés dans cette perspective. Pourtant, comme nous l'avons souligné à l'aide de la charte des nucléides, beaucoup d'autres éléments, présents dans le vivant, peuvent permettre la mesure d'un rapport isotopique et sont donc susceptibles de fournir de nouvelles informations métaboliques. Le but de ce travail de thèse est justement de déterminer l'apport des isotopes stables du fer, du cuivre et du zinc à la connaissance des populations passées.

Par conséquent, il nous faut évaluer, dans une première partie, la contribution actuelle des systèmes isotopiques à l'anthropologie. Nous évoquerons ensuite les thématiques de l'anthropologie ne présentant pas de contribution isotopique. Enfin, nous nous interrogerons sur le choix du fer, du cuivre et du zinc comme vecteurs de nouvelles informations au sein du vivant et des restes humains.

Chapitre 1

Quels sont les apports pré-existants de la géochimie à l'anthropologie ?

1.1 Isotopes stables classiquement utilisés en bioarchéologie

Dans cette section, nous nous attacherons à présenter les outils isotopiques classiques utilisés par les bioanthropologues et bioarchéologues. Le but est d'obtenir un aperçu des questions anthropologiques ne nécessitant pas de nouveaux développements isotopiques. Par conséquent, les références de ce chapitre ne constituent pas une liste exhaustive de tous les travaux réalisés, bien trop nombreux pour pouvoir être évoqués ici.

1.1.1 $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ et régime alimentaire

Comme en géologie, les premières mesures de rapports isotopiques ayant intéressé les archéologues concernent les isotopes radiogéniques. La datation radiocarbone mise au point par Willard Libby a été appliquée dès 1949 à des échantillons de bois venant d'une tombe égyptienne. Ce n'est que vingt ans plus tard que Hall (1967) découvre que quelques plantes, dont le maïs, possèdent des valeurs plus élevées du $\delta^{13}\text{C}$ que celles des végétaux des régions tempérées, ce qui provoque un rajeunissement de leur âge ^{14}C . L'explication est donnée en 1971 par Smith et Epstein avec la mise en évidence des deux types, de photosynthèse C3 et C4. Les plantes C3 sont en effet caractérisées par des $\delta^{13}\text{C}$ allant de -22‰ à -30‰ et les plantes C4 par des $\delta^{13}\text{C}$ de -10‰ à -15‰ (Figure 1.1.2). DeNiro et Epstein (1978, 1981) étudient par la suite les rapports isotopiques du carbone ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) et de l'azote ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) des tissus animaux et établissent leur lien avec l'alimentation. Ces études et celle de Schoeninger et de Niro (1984) ont permis de mettre en évidence l'influence du niveau trophique et de l'origine marine des aliments (Figure 1.1.1). Ces travaux majeurs signent les débuts de l'application des isotopes stables à l'anthropologie.

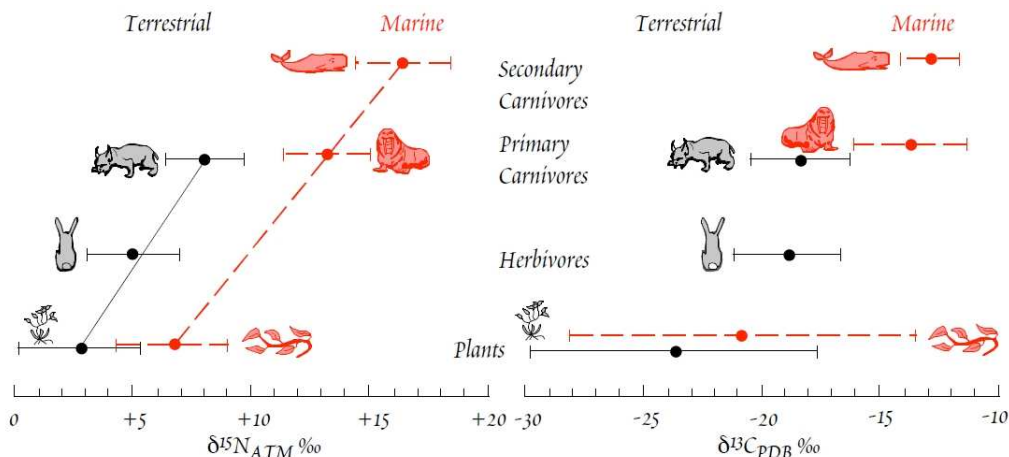


FIGURE 1.1.1: $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ dans divers organismes marins et terrestres. D'après Schoeninger et DeNiro (1984)

Il existe un fractionnement de 4‰ entre le carbone du collagène des os celui des tissus organiques. La connaissance de ce fractionnement permet d'utiliser le $\delta^{13}C$ et le $\delta^{15}N$ des os ou des dents comme outils de reconstitution du régime alimentaire des populations passées (Figure 1.1.2 e.g. Ambrose et deNiro, 1986, Bocherens et al, 1991, Richards et al, 2005). Depuis les travaux de Fogel et al (1989) , le $\delta^{15}N$ est également utilisé comme outil de détermination des modalités de sevrage (e.g. Katzenberg et Pfeiffer, 1995, Richard *et al.*, 2002, Herrscher, 2003). L'étude de la fraction minérale des restes humains apporte des informations complémentaires : le $\delta^{13}C$ et le $\delta^{15}N$ du collagène n'est en effet influencé que par les protéines ingérées, alors que la partie minérale intègre également le carbone et l'azote des lipides et glucides [Ambrose et Norr, 1993, Tieszen et Fagre, 1993].

1.1.2 $^{87}Sr/^{86}Sr$ et traçage des migrations

Les isotopes du strontium traditionnellement étudiés en anthropologie sont le ^{86}Sr , un isotope stable représentant 9.86% des atomes de strontium, et le ^{87}Sr , un isotope radiogénique provenant de la décroissance radioactive du rubidium 87 (7%). Cette décroissance est très lente ($\tau_{1/2}=4.88 \cdot 10^{10}$ ans) si bien que la quantité de ^{87}Sr peut être considérée comme stable à l'échelle du temps de vie d'un organisme. Le strontium, de numéro atomique $A=38$, est un élément plus lourd que le carbone ($A=12$), l'azote ($A=14$) ou encore l'oxygène ($A=16$). De ce fait, l'écart de masse entre deux isotopes du strontium, tels que le ^{86}Sr et le ^{87}Sr , est plus faible qu'entre le ^{18}O et le ^{16}O ($\frac{\Delta m}{m}_{Sr}=0.02$; $\frac{\Delta m}{m}_O=0.12$). En d'autres termes, les propriétés cinétiques et thermodynamiques sont davantage similaires entre deux isotopes d'éléments lourds qu'entre deux isotopes d'éléments légers. Par conséquent, les organismes distinguent plus difficilement la différence entre deux isotopes du strontium qu'entre deux isotopes de l'oxygène. Ainsi, au sein d'un réseau trophique,

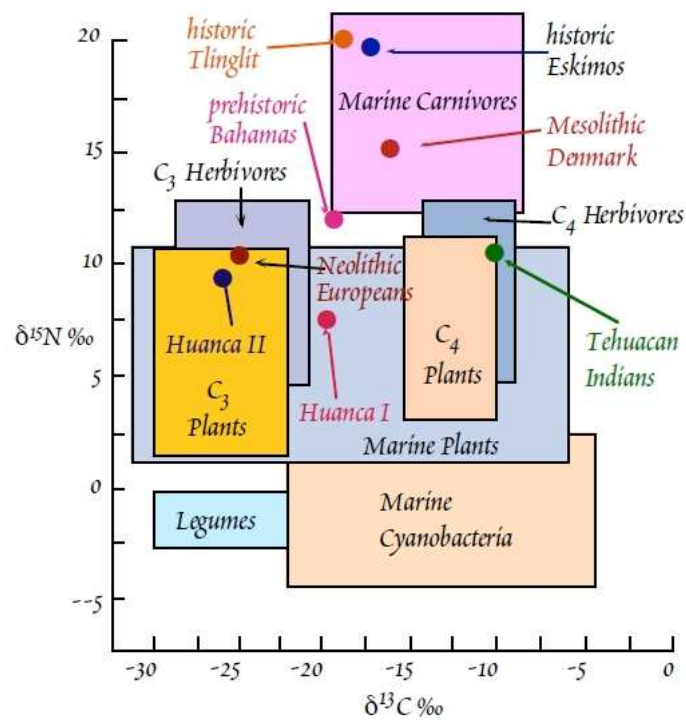


FIGURE 1.1.2: $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ de différents aliments et régimes alimentaires déduits du collagène des os et des végétaux présents dans des poteries par de Niro et collaborateurs. Les Huanca viennent de la vallée du Haut-Mantaro au Pérou. Période I : 1000-1200 AD, Période 2 : 1200-1470 AD. (Figure de W.M. White à partir de DeNiro (1987) et Hasdorf et DeNiro (1985)).

le $\delta^{87}\text{Sr}$ est identique du sol au sommet de la chaîne alimentaire [Bentley, 2006]. Les processus magmatiques, quant à eux, font varier le rapport $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$. Chaque roche ignée aura sa propre signature de $\delta^{87}\text{Sr}$, qui, par altération, s'étend au sol. Dès lors, on comprend l'intérêt des isotopes du strontium comme traceur de la migration, notamment à partir de l'émail dentaire et les ossements humains car le strontium se substitue facilement au calcium des bioapatites¹. Si la composition isotopique du strontium varie entre deux dents d'un individu, on pourra en déduire qu'il s'est alimenté dans deux différentes régions au cours de la formation de ces dents (e.g. Evans *et al.*, 2006, figure 1.1.3) Si elle varie entre l'émail dentaire et les os (ou la dentine), la migration aura eu lieu entre l'enfance et l'âge adulte (e.g. Müller *et al.*, 2003 sur la momie d'Ötzi). De la même manière, l'ablation laser permet de tracer des migrations sur des échelles de temps courtes en analysant le $\delta^{87}\text{Sr}$ le long de structure de croissance des dents (e.g. Balter *et al.*, 2008, Richards *et al.*, 2008).

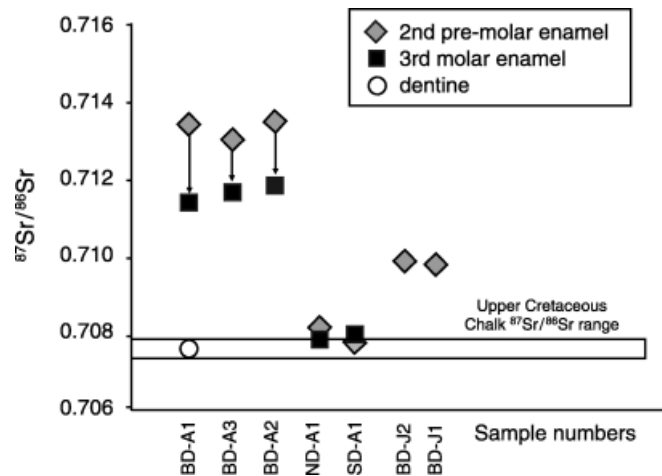


FIGURE 1.1.3: $\delta^{87}\text{Sr}$ dans plusieurs dents d'individus de l'âge de bronze. Le décalage entre les valeurs obtenues dans les prémolaires et les molaires indiquent une migration pendant l'enfance. Les valeurs obtenues dans la dentine correspondent à celles de la craie du crétacé supérieur ayant pollué ce tissu plus sensible à la diagenèse que l'émail dentaire. (Evans *et al.*, 2006)

1.1.3 $\delta^{18}\text{O}$, paléoclimats et mobilité.

Les isotopes de l'oxygène fractionnent au cours des processus d'évaporation/précipitation [Dansgaard, 1964]. La vapeur d'eau est plus pauvre en ^{18}O que l'eau dont elle est issue. A l'inverse, les précipitations seront enrichies en ^{18}O (Figure 1.1.4). En raison de la circulation atmosphérique, la vapeur d'eau évaporée à l'équateur est

1. voir le glossaire

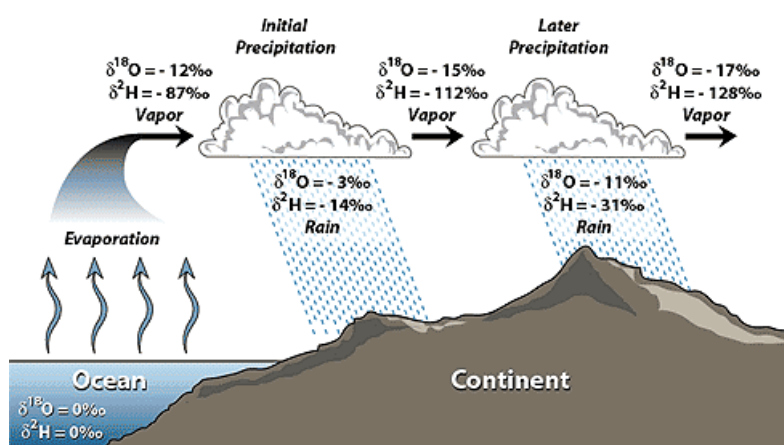


FIGURE 1.1.4: Evolution du $\delta^{18}\text{O}$ en fonction de la latitude lors des processus d'évaporation/précipitation. Figure : <http://web.sahra.arizona.edu>

globalement transportée aux pôles. De ce fait, il existe un gradient latitudinal dans la composition isotopique du $\delta^{18}\text{O}$ des précipitations. Ce gradient connaît des variations locales liées, par exemple, aux effets de relief. Il est aussi influencé par les refroidissements et les réchauffements climatiques. En effet, lors d'un refroidissement climatique global, l'écart de température entre les pôles et l'équateur est fortement accru, ce qui provoque l'augmentation de l'appauvrissement des nuages en ^{18}O . À une latitude donnée, le $\delta^{18}\text{O}$ décroît quand la température diminue [Dansgaard, 1964].

Lors de l'absorption de l'eau par les mammifères, il existe un fractionnement isotopique entre le $\delta^{18}\text{O}$ de l'eau bue et celui des phosphates des os et des dents [Longinelli, 1984, Daux *et al.*, 2008]. Les phosphates précipitent en équilibre avec l'eau du corps des mammifères, à température constante (autour de 37°C). Le fractionnement entre l'eau bue et les phosphates dépend alors du métabolisme de base de chaque espèce de mammifère même si la variation reste relativement faible [Amiot *et al.*, 2006]. Des équations ont été développées pour l'être humain [Longinelli, 1984, Luz *et al.*, 1984, Daux *et al.*, 2008] : on peut donc, par l'analyse du $\delta^{18}\text{O}$ des phosphates, reconstituer les températures du passé [Daux *et al.*, 2005]. Grâce à la dépendance du $\delta^{18}\text{O}$ de l'eau à la latitude, il est également possible de détecter au sein d'une population des individus originaires d'autres régions, souvent en combinant ces analyses à celles du $\delta^{88}\text{Sr}$ (e.g. Dupras et Schwarcz, 2001, Evans *et al.*, 2006, Mitchell et Millard, 2009). Enfin, en raison du fractionnement métabolique du corps humain, le lait maternel est enrichi en ^{18}O . Dès lors, on peut estimer la durée de l'allaitement par le $\delta^{18}\text{O}$ [Wright et Schwarcz, 1999].

1.2 L'émergence de nouveaux outils isotopiques

Le développement des techniques de spectrométrie de masse a progressivement ouvert la voie à l'étude de nouveaux systèmes isotopiques, principalement par la résolution en masse des interférences. Les isotopes nouvellement étudiés sont regroupés sous le terme d'isotopes « non-traditionnels ». Depuis le milieu des années 90, trois rapports isotopiques se sont révélés porteurs d'informations sur les populations passées : le $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$, le $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$ et le $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$.

1.2.1 $\delta^{34}\text{S}$ et habitat côtier

Le $\delta^{34}\text{S}$ dans les tissus humains et animaux est régulé par la composition isotopique en soufre de l'alimentation [Richards *et al.*, 2003]. La majorité du soufre des plantes est absorbé par les racines. Cependant, les plantes incorporent également le soufre de l'atmosphère. Celui-ci peut provenir des gouttes d'eau de mer, des pluies acides (H_2SO_4) ou de gaz de pollution (SO_2). La composition isotopique des oxydes de soufre avoisine les 0 ‰ alors que le SO_4^{2-} océanique possède une signature isotopique autour de 20 ‰. Dès lors, les populations côtières possèdent une signature isotopique clairement enrichie en ^{34}S par rapport à celles vivant dans les terres [Macko *et al.*, 1999, Richards *et al.*, 2001] (Figure 1.2.1). Cela ne signifie pas que les aliments consommés par les populations côtières soient nécessairement d'origine marine : les plantes terrestres sont en effet contaminées par les embruns. En cela, le soufre apporte une source d'information complémentaire aux isotopes de l'azote [Richards *et al.*, 2003]. Il permet aussi de détecter les individus ayant migré hors ou vers les zones côtières [Leach *et al.*, 1996].

Enfin, Nehlich *et al.* (2011) ont récemment montré que les isotopes du soufre pourraient être utilisés comme marqueur de sevrage. Dans la population étudiée, une forte proportion des enfants de moins de 5 ans présente une signature très appauvrie en ^{34}S du collagène de leurs os par rapport à celle des enfants plus âgés.

1.2.2 $\delta^{44}\text{Ca}$ et consommation de produits laitiers

En 2006, Chu *et al.* mesurent les rapports $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$ de produits laitiers, de végétaux et de lait maternel humain. Ils démontrent indirectement un appauvrissement en calcium lourd au sein de la chaîne trophique. Ce fractionnement est de l'ordre de 0.6 ‰ entre les plantes et le lait d'herbivores ainsi qu'entre le lait d'herbivores et le lait humain (Figure 1.2.2). La composition isotopique des os d'herbivores ne semblent pas être influencée par leur origine géographique. Par conséquent, les auteurs identifient le régime alimentaire comme le facteur de variation isotopique le plus pertinent. Ils prédisent ainsi une détection possible de la composante de produits laitiers dans l'alimentation humaine à partir de l'analyse du $\delta^{44}\text{Ca}$ de leur os.

S'inspirant des travaux de Chu *et al.* (2006), Reynard *et al.* s'intéressent en 2011 à la

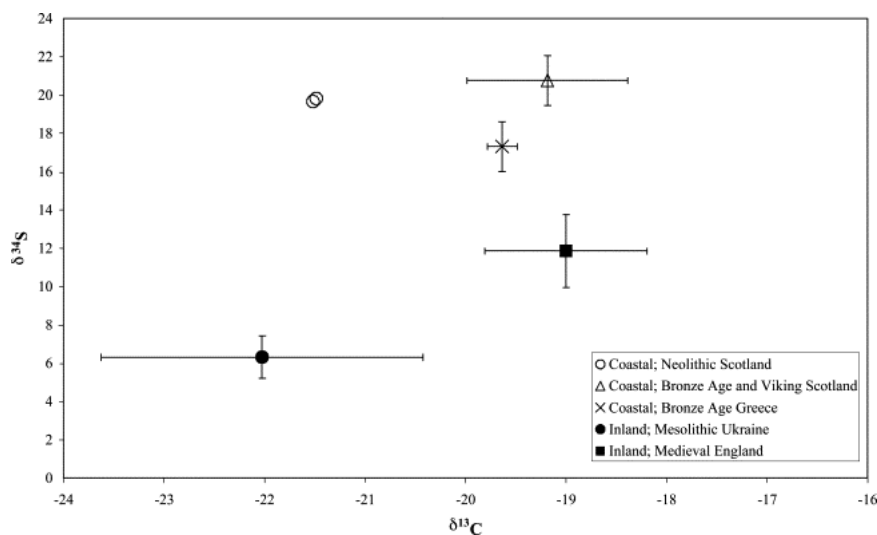


FIGURE 1.2.1: Valeurs moyenne et écartypes de $\delta^{13}\text{C}$ et de $\delta^{34}\text{S}$ du collagène de populations provenant de sites regroupés selon leur localisation géographique et leur chronologies. Figure : Richards et al, 2001

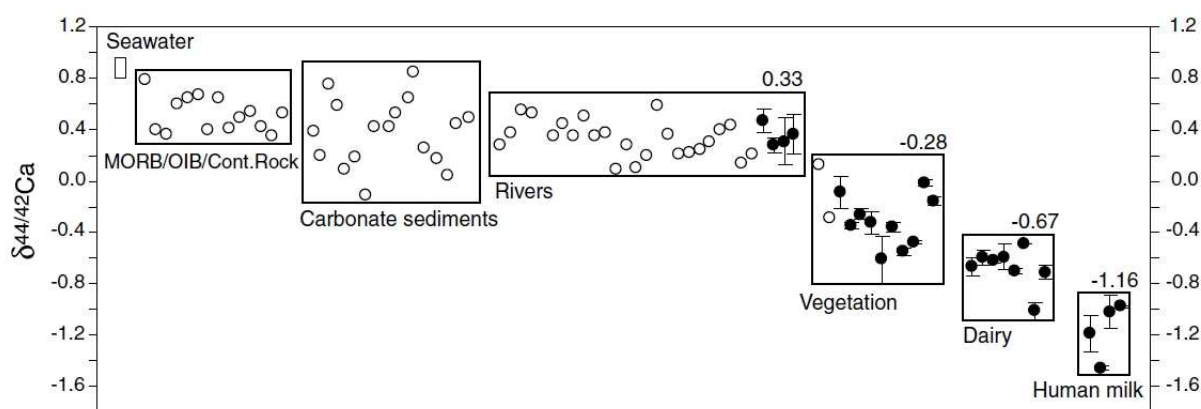


FIGURE 1.2.2: Compilation des données de isotopes du Ca pour la géosphère et la biosphère par Chu *et al.*, 2006.

mesure de $\delta^{44}\text{Ca}$ dans les os d'individus provenant de trois sites archéologiques : un site épipaléolithique (Taforalt) où la consommation de produits laitiers est improbable étant donné que l'élevage n'était pas pratiqué à cette époque, un site méso-néolithique (Abu Hureyra), et enfin un site médiéval (Danebury) où les individus consommaient très probablement des produits laitiers. Cette étude révèle que quelque soit le site et la consommation de produits laitiers supposée, le fractionnement isotopique est identique entre humain et herbivores (Figure 1.2.3). Les auteurs suggèrent alors que le fractionnement isotopique dans le corps humain est liée à d'autres facteurs métaboliques que l'alimentation.

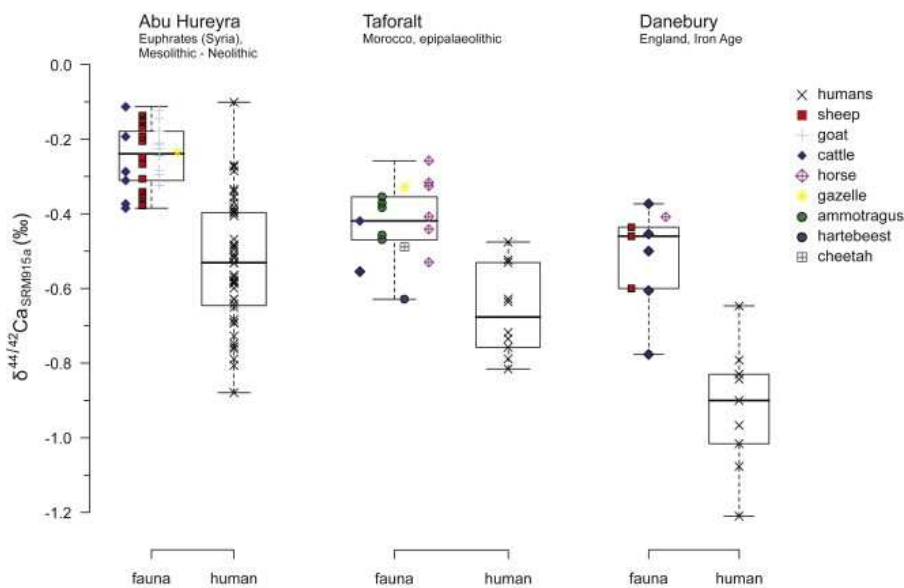


FIGURE 1.2.3: $\delta^{44}\text{Ca}$ des ossements d'herbivores et d'humains dans trois sites archéologiques Figure : Reynard *et al.*, 2011

1.2.3 Isotopes stables du strontium et régime alimentaire

Le rapport isotopique du strontium utilisé en archéologie et en anthropologie contient un isotope radiogénique, le ^{87}Sr . En 2010, Knudson *et al.* suggèrent de s'intéresser à un rapport d'abondances d'isotopes stables et non radiogéniques, le $^{88}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$. L'écart de masse entre le 88 et le 86 étant plus fort qu'entre le 87 et le 86, le vivant semble distinguer les deux isotopes stables et absorber préférentiellement le ^{86}Sr [Böhm *et al.*, 2012]. Par conséquent, on observe un fractionnement au sein de la chaîne trophique comme cela a pu être observé pour les isotopes d'éléments légers tels que le carbone et l'azote (Figure 1.2.4). De la même manière que le $\delta^{15}\text{N}$, le $\delta^{88}\text{Sr}$ semble un indicateur de la consommation de produits marins et/ou terrestres. L'intérêt de la mesure du $\delta^{88}\text{Sr}$ est qu'il peut être

analysé à partir du même prélèvement d'os ou d'émail dentaire que celui réalisé pour les études de mobilité à partir du $\delta^{87}\text{Sr}$.

Cette étude est pour le moment unique en son genre. Elle requiert donc des travaux ultérieurs afin d'être confirmée et d'affiner le potentiel de ce nouvel outil isotopique de reconstitution des paléorégimes alimentaires.

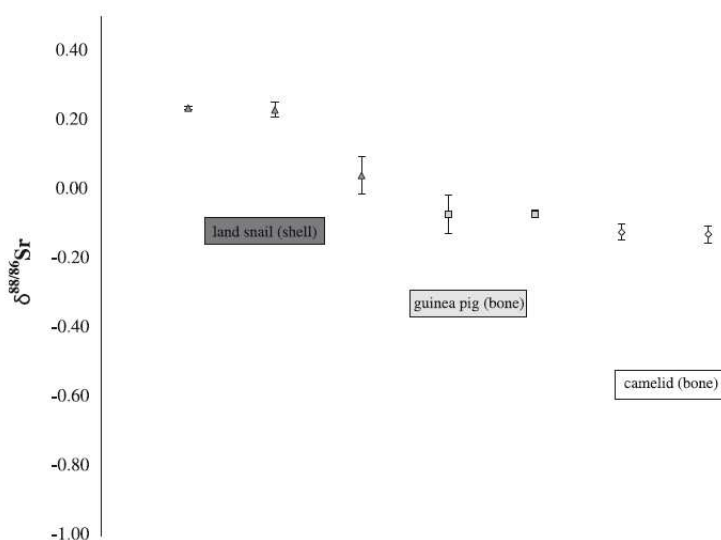


FIGURE 1.2.4: Valeurs de $\delta^{88/86}\text{Sr}$ de la coquille et d'os de trois espèces du même réseau trophique. Figure : Knudson *et al.*, 2010

1.3 Conclusion

La géochimie isotopique est devenue un outil couramment utilisé en anthropologie. Il permet de détecter la contribution des protéines animales marines et terrestres ainsi que celles des plantes de métabolisme C3 ou C4 dans l'alimentation. Le $\delta^{18}\text{O}$, le $\delta^{15}\text{N}$ et, dans une moindre mesure, le $\delta^{87}\text{Sr}$ permettent de déterminer la durée de l'allaitement. L'ensemble de ces paramètres apportent des informations sur les conditions de nutrition voire socio-économique des individus. Enfin, les isotopes stables de l'oxygène et radiogéniques du strontium peuvent être utilisés pour déterminer la mobilité des populations passées. Si ces techniques sont devenues courantes en bioarchéologie, les informations qu'elles apportent restent limitées. Il y a donc une volonté de développement de nouveaux outils illustrée par les travaux récents sur le $\delta^{34}\text{S}$, $\delta^{88}\text{Sr}$ et le $\delta^{44}\text{Ca}$. À l'heure actuelle, l'ensemble de ces systèmes isotopiques sont néanmoins cantonnés à deux thématiques : la mobilité et la paléoalimentation.

Chapitre 2

Quelle est la demande de nouveaux outils géochimiques en anthropologie ?

Nous venons de voir que les outils géochimiques permettent de retracer la nutrition et la mobilité des populations. Cependant, les questions essentielles que doit résoudre un anthropologue face à un squelette ne consiste pas uniquement en ces aspects.

Dans ce qui constitue la première publication d'anthropologie judiciaire, Thomas Dwright (1878) définit l'ordre des interrogations à suivre face à des restes osseux dans l'ordre suivant :

1. *Ces os sont-ils humains ?*
2. *Appartiennent-ils à un ou plusieurs individus ?*
3. *Quel est le sexe ?*
4. *Quel est l'âge ?*
5. *Combien de temps s'est écoulé depuis la mort ?*
6. *Quelle était la taille de l'individu ?*
7. *Si certaines parties sont manquantes, peut-on estimer leur taille ? Si oui, comment ?*

On pourrait actuellement ajouter à cette liste la cause du décès. Ces questions vont être similaires pour le bioarchéologue ou le paléoanthropologue, même si l'ordre d'importance n'est pas nécessairement identique. En ce qui concerne le temps écoulé après la mort, les nombreuses méthodes de datation de radiochronologie, la chronologie relative et les indices archéologiques autorisent, la plupart du temps, une estimation satisfaisante. L'explosion des connaissances en anthropologie physique à partir du XIX^{ème} siècle permettent également de répondre avec précision à la question de la taille de l'individu, à son appartenance à l'espèce humaine et à l'identification des os appartenant à un même individu [White et Folkens, 2005]. Les anthropologues s'intéresseront également à l'ascendance des populations et trouvent la plupart des réponses à l'aide de l'ADN, qu'il soit mitochondrial ou nucléaire, et de la morphométrie pour les hominidés anciens. Par

conséquent, les points cruciaux subsistant sont les questions du sexe et de l'âge au décès.

La liste des interrogations des anthropologues présenté ici n'est bien sûr pas exhaustive. Les anthropologues cherchent à évaluer l'ensemble ses conditions de vie des populations passées : alimentation, santé, adaptation au contexte climatique, migrations. Les études paléodémographiques nécessiteront également des données sur les indices de fécondité des populations. Le but de cette section est d'évaluer les outils préexistants pour répondre à l'ensemble de ce questionnement et mettre en lumière les manquements. La problématique des migrations et du régime alimentaire, traitée plus haut, ne sera pas évoquée ici.

2.1 Diagnose sexuelle

L'identification du sexe des squelettes (diagnose sexuelle) est une préoccupation majeure depuis les débuts de l'anthropologie. À l'origine, l'étude des différences morphométriques entre les sexes s'inscrivait dans un contexte de déterminisme biologique. Cette doctrine stipule que les normes de comportement des groupes humains et les différences économiques et sociales entre eux découlent de paramètres biologiques innés et hérités, et que, par conséquent, la société est le reflet de la biologie. Les scientifiques cherchent alors à établir les gammes de variabilité morphométrique leur permettant de classer les races et dresser un schéma évolutif, notamment par la craniométrie. Non seulement raciste, la société de l'époque est également imprégnée d'une idéologie sexiste. Pour preuve, Paul Broca affirme en 1861 que « *la petitesse relative du cerveau de la femme dépend à la fois de son infériorité physique et de son infériorité intellectuelle* ». On étudie alors intensément le crâne des femmes pour pouvoir le comparer à celui du groupe « supérieur », celui des hommes blancs [Gould, 1997].

Cependant dès la fin du XIX^{ème} siècle, avec la publication de Thomas Dwight, les perspectives de la détermination du sexe pour l'anthropologie judiciaire sont entrevues. Rapidement, l'archéologie va également utiliser les acquis de l'anthropométrie. Aujourd'hui c'est une donnée essentielle pour les reconstitutions paléodémographiques [Bello *et al.*, 2006] ainsi que pour la pertinence des interprétations paléoethnologiques et paléobiologiques [Murail *et al.*, 2005]. En paléoanthropologie, c'est une étape cruciale qui permet de distinguer le dimorphisme sexuel des variations intraspécifiques.

Il existe une multitude de critères pour déterminer le sexe des individus [White et Folken, 2005, Katzenberg et Saunders, 2011]. Le critère le plus fiable est celui de la morphologie de l'os coxal en raison de l'important dimorphisme sexuel engendré par les contraintes liées à la grossesse et à l'accouchement [Murail *et al.*, 2005] et indépendant de la population étudiée [Buikstra et Ubelaker, 1994, Bruzek *et al.*, 2005] (Figure 2.1.1).

Les méthodes de détermination du sexe reposant sur l'os coxal obtiennent des taux de détermination correcte proches des 100% [Bruzek, 2002, Murail *et al.*, 2005]. Lorsque cet os n'est pas conservé, la probabilité de succès de l'estimation du sexe de l'individu dimi-

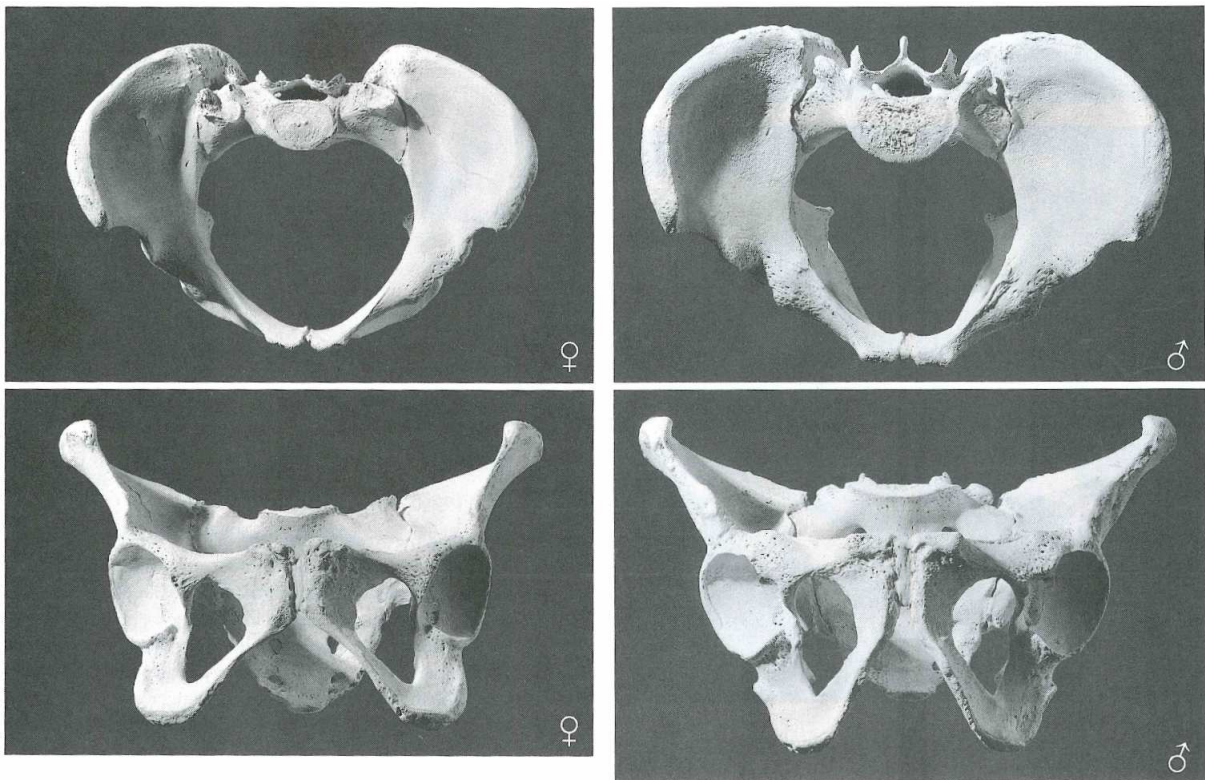


FIGURE 2.1.1: Dimorphisme sexuel de l'os coxal. Photographie : White et Folkens, 2005

nue fortement. Elle est de 80 % pour les restes crâniens [Masset, 1987] et de 70% à 80% sur des restes isolés tels que des phalanges [Scheuer et Elkington, 1993, Falsetti, 1995, Stojanowski, 1999, Case et Ross, 2007]. Chez les espèces éteintes, ce sujet fait parfois débat même en présence de l'os coxal. L'australopithèque AL-288-1, surnommée « Lucy », a par exemple fait l'objet de discussions remettant en cause son attribution au sexe féminin [Häusler et Schmid, 1995].

Ce score est encore plus faible chez les enfants et adolescents chez qui le dimorphisme sexuel est faible. Lewis [Lewis, 2007](2007) va même jusqu'à considérer la détermination du sexe des non-adultes comme étant le « Graal » de l'ostéologie. L'identification du sexe des foetus permettrait d'évaluer l'évolution des sex ratio selon les populations et périodes historiques, apportant notamment des informations sur l'investissement parental ou encore le traitement différentiel des foetus en fonction de leur sexe. De même, l'évaluation des pathologies et blessures selon le sexe des enfants associée aux conclusions de l'archéologie funéraire est susceptible d'apporter des informations sur leur traitement au sein de la population, leur sensibilité aux maladies, la division du travail ou encore l'âge auquel les garçons et les filles sont considérés comme adultes.

Les analyses ADN permettent généralement de résoudre ce problème [Faerman *et al.*, 1995, Faerman *et al.*, 1998, Mays et Faerman, 2001]. Cependant, elles sont encore très coûteuses et il existe des problèmes de faux positifs et négatifs, de préservation et de contamination [White et Folkens, 2005, Katzenberg et Saunders, 2011].

2.2 Détermination de l'âge au décès

L'âge au décès est également un paramètre indispensable à toute reconstitution paléodémographique ou identification. Il est bien plus difficile à quantifier que le sexe et est considéré comme une limite majeure de l'anthropologie [Schmitt, 2002]. Les méthodes actuelles ne permettent de l'estimer qu'avec une précision de plus ou moins dix ans, surtout après l'âge de 20 ans. Cette imprécision est à due à la fois à la variabilité de la sénescence intra et interpopulationnelle ainsi qu'aux écueils méthodologiques et à la subjectivité des observateurs [Schmitt, 2002].

Chez les non-adultes, cette détermination est plus aisée. Les phénomènes de maturation sont en effet plus constants que la sénescence [Crubézy *et al.*, 1993]. Le développement dentaire est un processus très contraint dans le temps, qui débute in utero pour se terminer au cours de l'adolescence. Ce point sera par ailleurs détaillé dans le chapitre 11. L'ostéologie fournit également d'autres indices sur l'âge des jeunes individus. Les os longs sont formés de plusieurs parties. Les extrémités sont appelées épiphyses et la partie centrale, diaphyse. Au cours de la formation des os, les épiphyses se développent indépendamment de la diaphyse et sont reliées par un cartilage. La fusion entre ces deux parties se réalise progressivement à partir de l'enfance jusqu'à l'âge adulte [White et Folkens, 2005]. Ces âges sont assez bien contraints, mais beaucoup plus sensibles aux conditions de vie des individus que le développement dentaire

[Cardoso, 2005, Katzenberg et Saunders, 2011].

Les modifications squelettiques intervenant par la suite sont de plus faible ampleur mais se poursuivent : les os fusionnent, se métamorphosent, dégénèrent [White et Folkens, 2005]. Les principales méthodes de détermination de l'âge des squelettes reposent sur :

- *La synostose des sutures crâniennes* : Le crâne est constitué de plusieurs os séparés par des sutures cartilagineuses. Au cours de la vie, ces sutures se ferment progressivement et les os se soudent : c'est la synostose. Le mécanisme de ce processus n'est pas connu mais un dysfonctionnement du métabolisme cellulaire pourrait en être l'origine [Pensler *et al.*, 1994]. Ce phénomène est très variable selon les individus : il arrive que les sutures restent ouvertes pour des âges très avancés [Schmitt, 2002].

- *Le remodelage osseux* : l'os se renouvelle continuellement tout au long de la vie. Cependant, sa constitution change au cours du temps. La proportion d'os spongieux diminue au sein de l'épiphyse des os longs [Acsádi et Nemeskéri, 1970, Bergot et Bocquet, 1976] et les structures corticales évoluent [Kerley, 1965, White et Folkens, 2005]. Néanmoins, le remodelage de l'os dépend en grande partie de la masse osseuse maximale initiale acquise à la fin de l'adolescence [Robling et Stout, 2000], ce qui rend impossible l'identification d'un âge précis selon cette technique.

- *La pathologie dégénérative* : Crubézy (1998, cité par Schmitt, 2002) regroupe deux types de lésions par ce terme : l'ostéoarthrose, qui correspond aux lésions de la surface articulaire et l'enthésiopathie qui prend place au niveau des zones d'insertion des ligaments et des tendons. La sénescence n'est pas à l'origine de ces pathologies mais constitue un facteur de risque. Les articulations les plus utilisées pour la détermination de l'âge au décès sont les articulations peu mobiles. Leur dépendance à l'activité physique est en effet plus faible et leur dégénérescence plus constante selon les individus. La symphyse pubienne et la surface auriculaire de l'ilium, des articulations cartilagineuses et l'extrémité sternale des côtes, une articulation fibreuses, sont les plus étudiées (Figure 2.2.1, Schmitt, 2002). Néanmoins, après l'âge de 40 ans, les changements de la symphyse pubienne deviennent aléatoires, surtout chez la femme [Meindl et Lovejoy, 1985].

- *Les indicateurs dentaires* : Les indicateurs dentaires de la sénescence sont l'usure de l'émail et le remodelage histologique du tissu dentaire. Entre les deux paramètres c'est l'usure dentaire qui est davantage utilisée pour quantifier l'âge au décès (e.g. Molnar *et al.*, 1971, Scott, 1979, Richards et Brown, 1981, Walker *et al.*, 1991). De plus en plus, des méthodes de détermination de l'âge au décès à partir du ciment des dents sont développées¹. Cependant, les indicateurs dentaires dépendent de paramètres culturels pour servir d'indicateur de l'âge sur des populations anciennes. Ils sont spécifiques à

1. Elles ont permis par exemple d'estimer l'âge au décès des restes humains attribués à Agnès Sorel, maîtresse de Charles VII. Les documents historiques attestent que son décès a eu lieu aux alentours de ses 28 ans. La faible usure de ses troisièmes molaires vont dans le sens d'un décès ayant lieu quelques années après l'éruption de ces dents, soit un âge effectivement compris entre 25 et 28 ans (Charlier, 2005).

chaque population selon les habitudes alimentaires [Schmitt, 2002].



FIGURE 2.2.1: Evolution de l'extrémité sternale des côtes. Les âges au décès progressent de gauche à droite. Figure : osteoware.si.edu

L'ensemble de ces méthodes ne permettent pas de fournir un âge fiable si elles sont prises séparément. Les études multifactorielles participent cependant à l'amélioration significative des estimations [Meindl et Lovejoy, 1985, Schmitt, 2005]. Il existe aussi d'autres méthodes, moins utilisées, telles que l'examen de radiographie [White et Folkens, 2005]. Malgré cela, la détermination de l'âge au décès des adultes reste souvent très imprécise. Par exemple, la première estimation pour Ötzi, cet homme de l'âge du cuivre momifié dans les glaciers alpins, donnait un âge au décès compris entre 25 et 40 ans à partir de la fermeture des sutures crâniennes et de l'usure dentaire [Seidler *et al.*, 1992]. Des examens ultérieurs révèlent la présence d'ostéons secondaires et d'un avancement finalement important des sutures crâniennes [Sjovold, 1996], reportant le décès aux alentours de 46 ans.

2.3 Indice de fécondité

2.3.1 Une nécessité pour la paléodémographie

Afin de pouvoir procéder à des reconstitutions paléodémographiques, il est essentiel de pouvoir estimer le nombre d'enfants par femme dans les populations passées. L'identification de « cicatrices d'accouchement » sur l'os du pelvis fait débat [Ashworth Jr *et al.*, 1976, Cox, 2000, Adams Holt, 1978]. De ce fait, les reconstructions paléodémographiques attribuent généralement un nombre d'enfant par femme, purement théorique et basé sur des comparaisons avec les populations actuelles. Cependant, l'âge de la ménarche est très sensible aux conditions environnementales [Thomas *et al.*, 2000, Thomas *et al.*, 2001] et l'âge à la ménopause semble également varier au cours du temps et selon les populations [Pavelka et Fedigan, 1991]. Ces âges sont impossibles à déterminer ostéologiquement ou biochimiquement. De plus, pour des espèces autres que celle de l'Homme, on ignore jusqu'à l'existence de la ménopause. C'est par exemple un point crucial pour quantifier la démographie des Néandertaliens dont on suppose la précocité de la maturité sexuelle [Virginie Fabre, communication personnelle].

2.3.2 Implication pour l'hypothèse de la grand-mère

L'hypothèse de la grand-mère (*grandmotherhood hypothesis*) cherche à expliquer pourquoi la ménopause est apparue au cours de l'évolution de l'Homme, alors qu'elle est très rare chez les autres animaux [Hawkes *et al.*, 1998]. L'idée directrice de cette théorie est que l'infertilité confère un avantage évolutif à l'espèce humaine. Les femmes n'ayant plus d'enfants en bas âge peuvent en effet aider à élever ceux des autres (amélioration du « temps d'investissement parental », Williams, 1957, Hawkes *et al.*, 1997). De plus, la grossesse et l'accouchement comportent un risque d'autant plus fort que l'âge de la femme est avancé. Cependant, cette hypothèse repose sur des estimations actuelles de l'âge de la ménopause et ne s'appuie pas sur des preuves archéologiques [Peccei, 2001]. D'autre part, on ne connaît pas l'apparition de la ménopause au sein de la lignée de l'Homme, alors que, pour les raisons précédemment évoquées, cet événement est porteur d'informations sur le fonctionnement des premières sociétés.

2.4 Perturbations et adaptations métaboliques

2.4.1 Pathologies

L'identification des pathologies des squelettes à plusieurs intérêts (Angel 1981) :

- L'identification de la cause du décès.
- L'évaluation de la relation entre santé et société.
- L'étude de l'impact des épidémies, des traumas et du vieillissement sur la démographie.
- L'étude de la croissance et des conditions de nutrition.

Les pathologies aujourd'hui identifiables sont très nombreuses : White et Folkens (2005) recensent les traumas (fractures, dislocations, amputations, trépanations), les maladies infectieuses (ostéomyélose, périostose, tuberculose osseuse, syphilis), pathologies circulatoires et hématopoïétiques, arthroses, pathologies dentaires, certaines tumeurs et maladies métaboliques (scorbut, rachitisme, ostéoporose).

Il existe d'autres procédures qui peuvent reposer sur des tissus organiques restants ou des analyses chimiques des os. Pour revenir sur l'exemple d'Agnès Sorel, l'analyse chimique de ses cheveux et biologique de son liquide de décomposition révèlent un empoisonnement au mercure et la présence d'oeufs d'*Ascaris* [Charlier, 2006]. On citera également l'exemple de l'examen au scanner des momies des pharaons Thoutmosis I, Thoutmosis II et Hatshepsout (respectivement père et enfants) qui a révélé l'existence d'une maladie de la peau, dont la nature n'a pas été identifiée. Ces analyses requièrent néanmoins des conditions de préservation exceptionnelles.

Aussi, les analyses d'ADN ancien peuvent permettre de détecter la présence de bactéries responsables de maladies infectieuses. Des études sur les momies égyptiennes ont par exemple révélé des cas de tuberculose, lèpre, malaria, bilharziose ou encore mala-

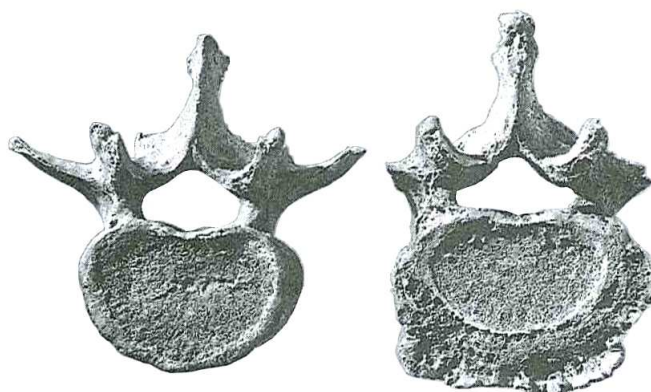


FIGURE 2.4.1: Arthrose : la vertèbre lombaire normale (à gauche) ne possède pas le développement osseux de la partie antérieure de la vertèbre touchée par l'arthropathie dégénérative. (White et Folkens, 2005)

die de Chagas [Nerlich *et al.*, 1997, Willcox, 2002]. Des maladies génétiques telles que la drépanocytose [Faerman *et al.*, 2000] ou les bêta thalassémies [Filon *et al.*, 1995] sont également identifiables. De manière similaire, il est possible de repérer l'insertion d'un virus dans le génome humain, tel que celui de l'hépatite B [Bar-Gal *et al.*, 2012]. Le problème des analyses de l'ADN ancien réside dans le fait que cet ADN est parfois trop dégradé pour être fiable et que les risques de contamination pendant ou après les excavations sont importants [White et Folkens, 2005].

Cette liste de pathologies, si elle est impressionnante, ne permet pas d'évaluer l'intégralité des pathologies ayant affecté les individus décédés, notamment la plupart des cancers, ni de déterminer la sévérité de l'affection.

2.4.2 Adaptation au stress thermique

La question de l'estimation de l'adaptation métabolique au stress thermique est un point crucial en anthropologie sachant que parmi les hypothèses sur la disparition des Néandertaliens, celle de l'influence du climat reste débattue [Fabre, 2011]. Il a été établi que des populations néandertaliennes avaient disparu des régions les plus septentrionales [Stewart, 2007, Hublin et Roebroeks, 2009] alors que certains travaux suggèrent qu'elles n'auraient pas pu survivre dans des zones méridionales [Jiménez-Espejo *et al.*, 2007, López-García *et al.*, 2011]. Pour d'autres auteurs, le climat est au contraire un facteur d'expansion des Néandertaliens [Sepulchre *et al.*, 2007].

L'adaptation au stress thermique est assez bien contrainte dans les populations humaines actuelles. On sait par exemple que le métabolisme de base diffère entre les populations circumpolaires et les populations des régions tempérées [Rode et Shephard, 1995, Leonard *et al.*, 2002, Snodgrass *et al.*, 2005]. Cependant, le

métabolisme des espèces disparues, telle que les Néandertaliens, n'est pas directement quantifiable. Il existe bien des équations permettant d'estimer le métabolisme de base² et qui semblent pertinentes pour la majeure partie des mammifères. Pour Néandertal, les équations généralement utilisées sont celles obtenues sur les populations humaines circumpolaires [Sorensen et Leonard, 2001, Steegmann Jr *et al.*, 2002, Snodgrass et Leonard, 2009] ou à partir d'équations reposant sur la surface totale de peau de mammifères [Churchill, 2006, Macdonald *et al.*, 2009]. Le problème est qu'il arrive que ces équations sur-estiment ou sous-estiment complètement le métabolisme de certaines espèces. L'orang-outan, par exemple, présente un métabolisme de base nettement plus faible que celui estimé à partir de sa stature (Pontzer et al, 2010, Figure 2.4.2). Il a été montré qu'un faible métabolisme de base pouvait être associé à une restriction de nourriture, notamment à partir de travaux réalisés sur des personnes souffrant d'anorexie [Casper *et al.*, 1991, Polito *et al.*, 2000]. Or, certains auteurs estiment que des populations néandertaliennes ont connu des restrictions de nourriture liées aux aléas de la chasse [Hockett et Haws, 2005].

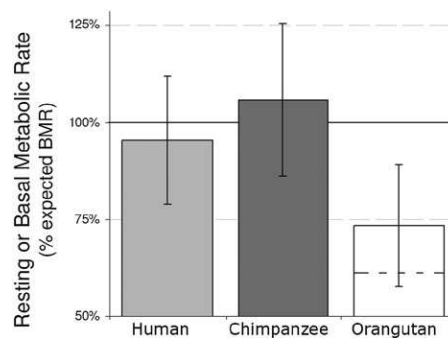


FIGURE 2.4.2: Estimation du métabolisme de base de grands singes. BMR moyenne pour les humains adultes et les chimpanzés et RMR pour les orang-outans adultes exprimés en pourcentage de la valeur de BMR estimée à partir de l'équation générale pour les mammifères. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type. La BMR des orang-outans est aussi figurée en pointillés. Les termes de BMR et RMR sont explicités dans le glossaire et les abréviations. Figure : Pontzer *et al.*, 2010

Bilan

La liste des sujets d'études de l'anthropologie ici présentée n'est pas complète. Elle recense cependant quelques points essentiels pour lesquels un apport géochimique serait appréciable. Il serait prétentieux de prétendre pouvoir répondre à l'ensemble de ces

2. voir le glossaire

Chapitre 2 Quelle est la demande de nouveaux outils géochimiques en anthropologie ?

questions. Cependant, nous pouvons chercher à évaluer quelles pistes pourraient être issues de l'étude des isotopes du fer, cuivre et zinc à partir de ce que nous connaissons sur leur métabolisme.

Chapitre 3

Potentiel des métaux de transition comme nouveaux outils anthropologiques

3.1 Généralités sur le fer, cuivre et zinc

1 H																	2 He																																						
3 Li	4 Be	<ul style="list-style-type: none"> ■ hydrogen ■ poor metals ■ alkali metals ■ nonmetals ■ alkali earth metals ■ noble gases ■ transition metals ■ rare earth metals 										5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne																																						
11 Na	12 Mg																	13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar																																
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr																																						
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe																																						
55 Cs	56 Ba	57 La	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn																																						
87 Fr	88 Ra	89 Ac	104 Unq	105 Unp	106 Unh	107 Uns	108 Uno	109 Une	110 Uun																																														
																		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center; font-size: small;"> <tr> <td>58 Ce</td><td>59 Pr</td><td>60 Nd</td><td>61 Pm</td><td>62 Sm</td><td>63 Eu</td><td>64 Gd</td><td>65 Tb</td><td>66 Dy</td><td>67 Ho</td><td>68 Er</td><td>69 Tm</td><td>70 Yb</td><td>71 Lu</td> </tr> <tr> <td>90 Th</td><td>91 Pa</td><td>92 U</td><td>93 Np</td><td>94 Pu</td><td>95 Am</td><td>96 Cm</td><td>97 Bk</td><td>98 Cf</td><td>99 Es</td><td>100 Fm</td><td>101 Md</td><td>102 No</td><td>103 Lr</td> </tr> </table>										58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr
58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu																																										
90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr																																										

FIGURE 3.1.1: Position du fer (Fe), du cuivre (Cu) et du zinc (Zn) au sein de la classification périodique. Figure modifiée d'après le modèle disponible sur www.elementsdatabase.com.

Le fer, le cuivre et le zinc sont trois éléments de transition (Figure 3.1.1). Leurs

numéros atomiques sont respectivement égaux à 26, 29 et 30. Ces éléments ne sont pas, ou quasiment pas, présents à l'état libre dans le corps humain [Vallee et Falchuk, 1993].

3.2 Métabolisme des métaux de transition

3.2.1 Besoins alimentaires de fer, cuivre et zinc

Les besoins par jour en fer, cuivre et zinc sont respectivement de 10, 8 et 12 mg par jour [Vallee et Falchuk, 1993]. Une faible proportion de ces métaux est absorbée au cours de la digestion (1 mg pour le fer, 1 mg pour le cuivre, 5 mg pour le zinc ; Figures 3.2.1 3.2.2 3.2.3, [Turnlund *et al.*, 1984, Cousins, 1985, Hallberg et Rossander-Hulten, 1991, Vallee et Falchuk, 1993, Linder et Hazegh-Azam, 1996, Turnlund, 1998]). Pour le zinc et le fer, les besoins sont plus importants pour les femmes menstruées (1.5 mg) et encore davantage pour la femme enceinte (4-5 mg, 20-25 mg). Par contre, pour le cuivre, l'absorption intestinale des femmes menstruées et des parturiantes est plus efficace en raison de l'effet des hormones féminines [Johnson *et al.*, 1992].

Le zinc et le fer de la viande sont plus facilement absorbés que ceux des végétaux. En effet, les phytates inhibent leur absorption intestinale. De plus, les végétaux contiennent le fer sous forme non-hémique¹. Lors de la digestion, il est libéré sous sa forme ionique, qui a tendance à précipiter en raison des sucs pancréatiques. Le fer hémique de la viande animale est protégé par l'hème et donc plus facilement assimilé [Panel on Micronutrients, 2001, Papanikolaou et Pantopoulos, 2005, Walczyk et von Blanckenburg, 2005]. Par contre, l'acide ascorbique des fruits possède un effet activateur sur l'absorption du fer [Allen *et al.*, 1997]. Enfin, le calcium inhibe l'absorption intestinale du fer et du zinc [Hallberg et Rossander-Hulten, 1991, Vallee et Falchuk, 1993]. Les principales sources alimentaires pour ces métaux sont les abats, les fruits de mer et les fruits secs [Panel on Micronutrients, 2001].

3.2.2 Cycles métabolique des métaux de transition

Les figures 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3 représentent les cycles métaboliques du fer, du cuivre et du zinc. Elles ont été réalisées à partir des données de la littérature [Turnlund *et al.*, 1984, Cousins, 1985, Vallee et Falchuk, 1993, Turnlund, 1998, Panel on Micronutrients, 2001, Papanikolaou et Pantopoulos, 2005, Walczyk et von Blanckenburg, 2005, Andrews, 2008, Collins *et al.*, 2010].

3.2.2.1 Cycle métabolique du fer.

Le fer possède quatre isotopes stables dont les masses et les abondances naturelles sont : ^{56}Fe (91,72 %), ^{54}Fe (5,84 %), ^{57}Fe (2,20 %) et ^{58}Fe (0,28 %).

1. voir le glossaire

Les états d'oxydation du fer vont de -2 à +6. Dans les systèmes biologiques, ces états d'oxydation se réduisent de +2 à +3 [Panel on Micronutrients, 2001, Wollenberg *et al.*, 1990]. Les ligands courants du fer dans le corps humain sont l'oxygène, l'azote et le soufre. Le fer tient un rôle crucial dans la respiration cellulaire et les transferts d'électrons au sein des organismes par sa spéciation multiple.

Le corps humain contient environ 4 g de fer pour un homme de 70kg [Panel on Micronutrients, 2001, Walczyk et von Blanckenburg, 2005, Papanikolaou et Pantopoulos, 2005, Andrews, 2005a], principalement répartis entre le foie et les érythrocytes (également appelées hématies ou globules rouges). Il est absorbé au niveau intestinal et excrété dans l'urine, les sécrétions gastro-intestinales, la sueur, les pertes sanguines et la desquamation (Andrews, 1999, figure 3.2.1). Chez les femmes, on ajoutera les menstruations aux flux d'excrétion du fer, qui représentent de 0.15 à 0.70 mg/jour [Hallberg et Rossander-Hultén, 1991, Harvey *et al.*, 2005]. Le fer est stocké au sein du foie et des macrophages répartis entre la rate, la moelle osseuse et les cellules hépatiques de Kupffer. Il est utilisé par les muscles et les hématies pour la respiration des organes et tissus. Le contenu et les flux en fer de chacun de ces organes sont donnés figure 3.2.1 et tableau 3.1 pour le cas d'un homme de 70kg. Chez une femme menstruée, les réserves hépatiques sont plus faibles [Whitfield *et al.*, 2003, Andrews, 2008].

Dans le corps des mammifères, quatre grandes classes de protéines contiennent du fer. Il s'agit des protéines possédant un hème² (hémoglobine, myoglobine, cytochrome), les enzymes contenant à la fois du soufre et du fer (flavoprotéines), les protéines jouant un rôle dans le stockage et transport du fer (transferrine, lactoferrine, ferritine, hémossidérine) et enfin diverses enzymes non-hémique [Panel on Micronutrients, 2001]. Lors de l'absorption intestinale, le Fe²⁺ traverse la membrane plasmique par endocytose quand le Fe³⁺ est pris en charge par la protéine transporteuse de métaux divalents DMT1 et relâché dans le cytoplasme sous forme 2+ après avoir été réduit par la réductase ferrique duodénale Dcytb [McKie *et al.*, 2008]. Sorti de l'entérocyte³ par la ferroportine, les atomes de fer sont transportés sous forme 3+ par la transferrine au sein du plasma. Ils sont alors distribués aux organes [Andrews, 2005a]. Au sein du cytochrome c, leur capacité à capturer et relâcher des électrons permettra le processus de respiration cellulaire. Ils peuvent être stockés par la ferritine des cellules, en particulier celles du foie. On les trouve également associés à la myoglobine musculaire sous forme ferrique ou enrôlés, à nouveau sous forme ferreuse, dans le processus d'érythropoïèse au sein de la moelle osseuse. L'érythropoïèse désigne la formation des globules rouges. C'est un processus particulièrement actif puisque les hématies sont renouvelées tous les 120 jours, alors qu'elles représentent la moitié du contenu total en fer du corps humain [Andrews, 2008]. Ces hématies sont détruites au sein des macrophages (présents dans le foie, la rate et la moelle osseuse) où le fer est pris en charge et stocké par l'hémossidérine sous forme ferrique avant d'être relâché dans le plasma [Worwood, 1997].

2. voir le glossaire

3. voir le glossaire

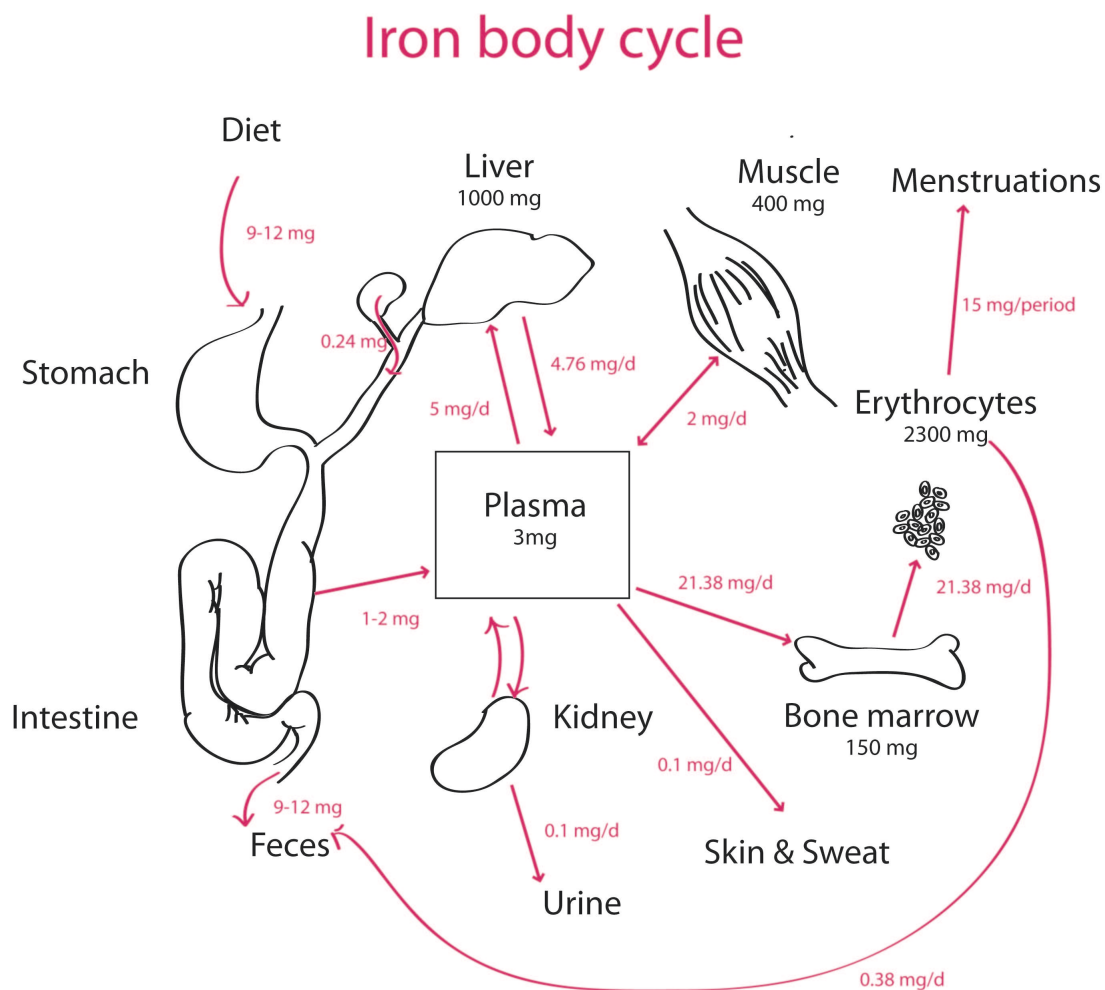


FIGURE 3.2.1: Cycle métabolique du fer. Diet=Bol alimentaire, Stomach=Estomac, Kidney=Rein, Liver=Foie, Intestine=Intestin, Bone marrow=moëlle osseuse.

Organe ou tissu	M_{Fe}	Protéine	Etat redox du fer
Plasma	3	transferrine	Fe^{3+}
Hématies	1800	hémoglobine	Fe^{2+}
Foie	1000	ferritine	Fe^{3+}
Muscles	400	myoglobine	Fe^{2+}
Moelle osseuse	150	hémossidérine	Fe^{3+}
Macrophages	600	hémossidérine	Fe^{3+}
Tous tissus et organes	50	cytochromes, hémoglobine et flavoprotéines	variable

TABLE 3.1: Distribution du fer dans le corps humain et protéines majeures contenant du fer associées à chaque réservoir. Source : Wordwood *et al.*, 1997, Andrews, 1999, Wessling-Resnick, 2000, Papanikolaou et Pantapoulos, 2005, Walczyk et von Blanckenburg, 2005

3.2.2.2 Cycle métabolique du cuivre

Le cuivre possède seulement deux isotopes stables dont les masses et abondances naturelles sont : ^{63}Cu (69,17 %) et ^{65}Cu (30,83 %). Il est essentiellement présent sous forme cuprique (Cu^{2+}) dans le corps humain mais également présent à l'état Cu^+ [Linder et Hazegh-Azam, 1996]. Il est impliqué dans les transports d'électrons dans la cellule, notamment lors de la formation d'ATP [Linder et Hazegh-Azam, 1996]. Il participe activement à l'homéostasie du cycle du fer, du glucose ou du cholestérol. On peut également citer son rôle majeur dans la croissance et le maintien des os [Dollwet et Sorenson, 1988, Linder et Hazegh-Azam, 1996].

L'estimation de la quantité de cuivre présente dans le corps humain (110 mg) repose sur des travaux réalisés par Chou et Adolph en 1935. Elle est abondamment reprise dans la littérature. Pourtant, lorsque l'on synthétise la masse contenue dans les principaux réservoirs de cuivre et les principaux organes et tissus du corps humain, on ne parvient pas à atteindre cette quantité (Tableau 3.2). Dès lors, il est plus probable que cette quantité, pour un adulte de 70 kg, soit de l'ordre de 70 mg. La figure 3.2.2 synthétise le cycle du cuivre dans le corps humain en présentant les flux entre organes recensés dans la littérature [Linder et Hazegh-Azam, 1996].

Suite à son absorption intestinale, le cuivre est initialement pris en charge par la transcupréine et l'albumine [Tapiero *et al.*, 2003] mais rapidement, 70 à 80 % des atomes se retrouvent associés à la céruloplasmine, une ferroxidase sécrétée par les hépatocytes [Kosman, 2002]. Une forte proportion du cuivre est déposée dans le foie [Weiss et Linder, 1985] où elle est stockée par des metallothionéines [Terada *et al.*, 1999]. La principale voie d'excrétion est réalisée par la bile, à raison de 2,5 mg/jour. Le reste de l'élimination se réalise par l'urine et les sucs intestinaux.

La céruloplasmine joue un rôle central dans le métabolisme du cuivre. En plus d'être une protéine de transport du cuivre, elle est impliquée en tant qu'enzyme dans l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique, permettant, en association avec la transferrine, le

Chapitre 3 Potentiel des métaux de transition comme nouveaux outils anthropologiques

Organes ou tissus	M_{Cu}	Protéines associées	Etat redox du cuivre
Plasma	5	céruleoplasmine, albumine, transcupréine	Cu^{2+}
Hématies	1	Superoxyde dismutase	variable
Foie	10	metallothionéine, superoxyde dismutase	Cu^{2+}
Muscles	26	cytochrome c oxydase, superoxyde dismutase	variable
Ossements	7	cartilage matrix glycoprotein	Cu^{2+}
Cheveux	0.4	cytochrome c oxydase, superoxyde dismutase	variable
Ongles	0.03	cytochrome c oxydase, superoxyde dismutase	variable
Coeur	1.6	cytochrome c oxydase, superoxyde dismutase	variable
Rein	3.7	cytochrome c oxydase, superoxyde dismutase	variable
Cerveau	7	cytochrome c oxydase, superoxyde dismutase	variable

TABLE 3.2: Masses de cuivre contenu dans les organes et tissus du corps humain et protéines associées à chaque réservoir de cuivre. L'état redox associé aux protéines est précisé. Les masses ont été estimées à partir des données de Linder et Hazam, 1996 et Lyengar, 1978.

transfert du fer de la ferritine au plasma [Linder *et al.*, 1999].

Au sein des cellules, le cuivre joue le rôle de cofacteur pour nombre de protéines notamment celles intervenant dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie, telle que la cytochrome oxydase. Cependant, le cuivre intracellulaire est majoritairement associé à la superoxyde dismutase (SOD) qui contient également du zinc et possède une activité redox. Elle est particulièrement abondante dans le foie, les reins et les hématies [Linder et Hazegh-Azam, 1996].

3.2.2.3 Cycle métabolique du zinc

Le zinc possède cinq isotopes stables. Leurs masses et abondances naturelles sont : ^{64}Zn (48,27 %), ^{66}Zn (27,90 %), ^{68}Zn (18,80 %) et ^{67}Zn (4,10 %) et ^{70}Zn (0,63 %). Il n'a qu'un état d'oxydation (2+) ce qui lui confère une stabilité réactive dans un milieu cellulaire gouverné par les processus d'oxydoréduction. 99% du zinc est intracellulaire dont 30 à 40% dans le noyau. Ses ligands sont multiples puisqu'il existe plus de 300 enzymes associées à cet élément [Vallee et Falchuk, 1993]. Par conséquent, il intervient dans de nombreuses fonctions biochimiques telles que la spermatogenèse, la condensation de la chromatine, l'expression des gènes, la vision, le fonctionnement du système nerveux central, le métabolisme des acides gras, les fonctions endocrines etc. [Vallee et Falchuk, 1993].

La quantité de zinc estimée dans le corps humain est de l'ordre de 2600 mg. Au contraire du fer et du cuivre, le foie n'est pas un organe de réserve du zinc. Cependant, après son absorption, le zinc semble directement transporté vers cet organe avant d'être redistribué dans les autres constituants du corps humain [Vallee et Falchuk, 1993]. Il n'existe pas à proprement parler de stockage du zinc dans le corps humain

Copper body cycle

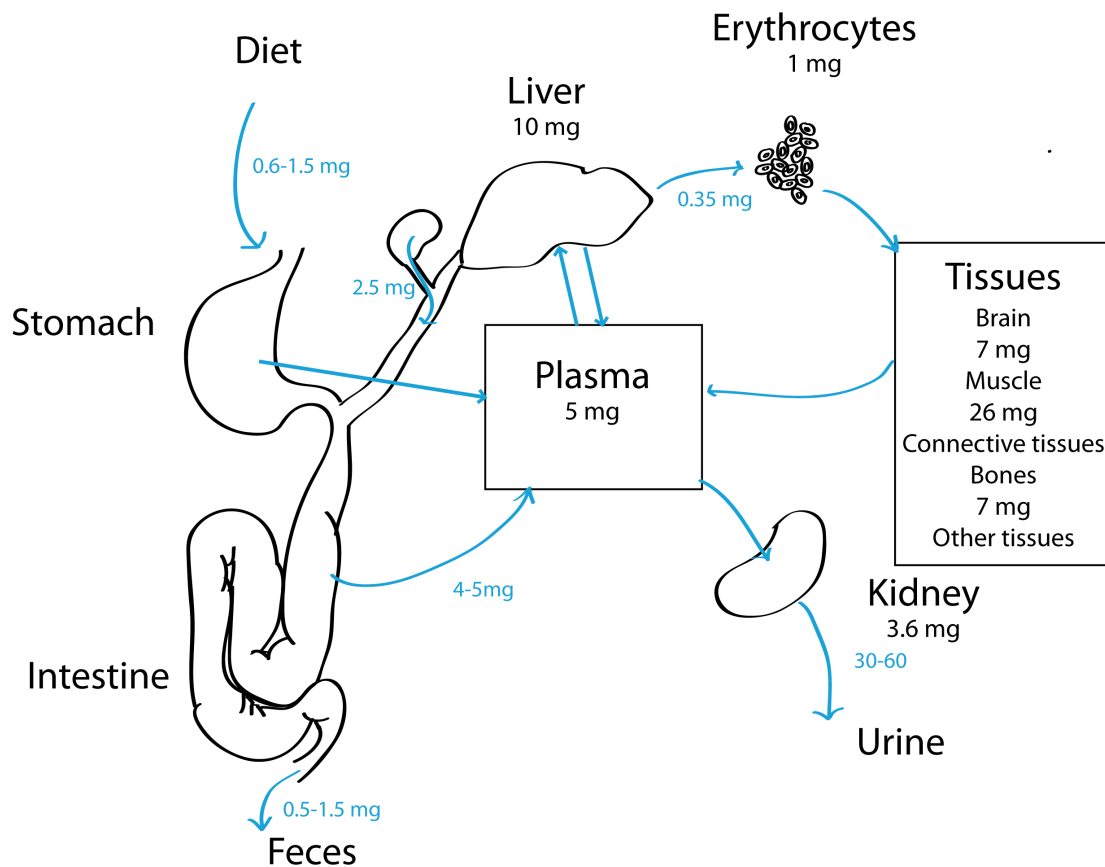


FIGURE 3.2.2: Cycle métabolique du cuivre. Diet=Bol alimentaire, Stomach=Estomac, Kidney=Rein, Liver=Foie, Brain=Cerveau, Bones=os, Connective tissues= Tissus connectifs.

[Cousins, 1985]. Les organes qui contiennent la plus grande partie de cet élément sont les os et les muscles. La principale voie d'excrétion de cet élément réside dans les sécrétions intestinales. La figure 3.2.3 présente sa distribution dans l'ensemble du corps humain et les flux entre chaque réservoir [Foster *et al.*, 1979, Turnlund *et al.*, 1984, Cousins, 1985, Vallee et Falchuk, 1993, Scott et Turnlund, 1994]. Les protéines associées à chaque réservoir ne sont pas précisées car trop nombreuses.

Suite à son incorporation dans le sang, le zinc est associé à l'albumine (50%) et à des macroglobulines du plasma. Seulement 10% du zinc sanguin est contenu dans le sang [Cousins, 1985]. Il sera présent dans les érythrocytes au sein de l'anhydrase carbonique, qui catalyse la conversion de CO_2 et de l'eau en $\text{H}_2\text{CO}_3^{2-}$ et en protons (et inversement). On le trouvera également dans la superoxyde dismutase avec le cuivre.

3.2.3 Interactions entre les cycles métaboliques

3.2.3.1 Cuivre et fer

Les carrefours métaboliques existant entre le métabolisme de cuivre et du fer sont très nombreux. La description de leur cycle en a donné un aperçu puisque que la céruloplasmine, qui contient du cuivre, réalise l'oxydation du fer. Nous allons ici présenter les principales interactions qui prennent place dans quatre types de cellules, en nous appuyant sur la figure 3.2.4 [Collins *et al.*, 2010].

(A) Dans l'entérocyte, cellule de la paroi intestinale, la céruloplasmine facilite la prise en charge du fer ionique par la transferrine. Par conséquent, l'absorption intestinale [Wollenberg *et al.*, 1990]. Le fer sort ensuite de la cellule grâce à l'héphaïstine (HP), une ferroxidase contenant du cuivre. Lors d'une carence en cuivre, le nombre d'héphaïstine décroît ce qui réduit l'absorption intestinale de fer. Au contraire, une carence en fer semble accroître le nombre d'ATP7A, protéine permettant l'export de cuivre.

(B) Les hépatocytes régulent l'homéostasie du cuivre et du fer. Une carence en cuivre ou en céruloplasmine (CP) engendre une accumulation de fer dans l'hépatocyte. Ainsi, c'est la céruloplasmine qui permet l'export de fer du foie. L'export de fer requiert en effet un changement d'état d'oxydation. Cette réaction redox emprunte le cuivre de la céruloplasmine comme échangeur d'électrons.

(C) Lors de la formation de l'hémoglobine, au sein des cellules précurseurs des érythrocytes, le fer est incorporé à l'hème (groupe porphyrique, cofacteur de l'hémoglobine) au sein de la mitochondrie. Le cuivre est lui aussi incorporé dans la mitochondrie ou il s'intègre ou complexe IV (CCO). Au coeur de ce complexe protéique, deux atomes de cuivre participent au transfert d'électrons requis pour la formation de l'hème. Le cuivre semble également participer au transport du fer au coeur de la mitochondrie.

(D) Les macrophages réticulaires participent au recyclage du fer des hématies sénescents. L'export du fer de ces macrophages vers la circulation sanguine requiert à nouveau l'intervention de la céruloplasmine.

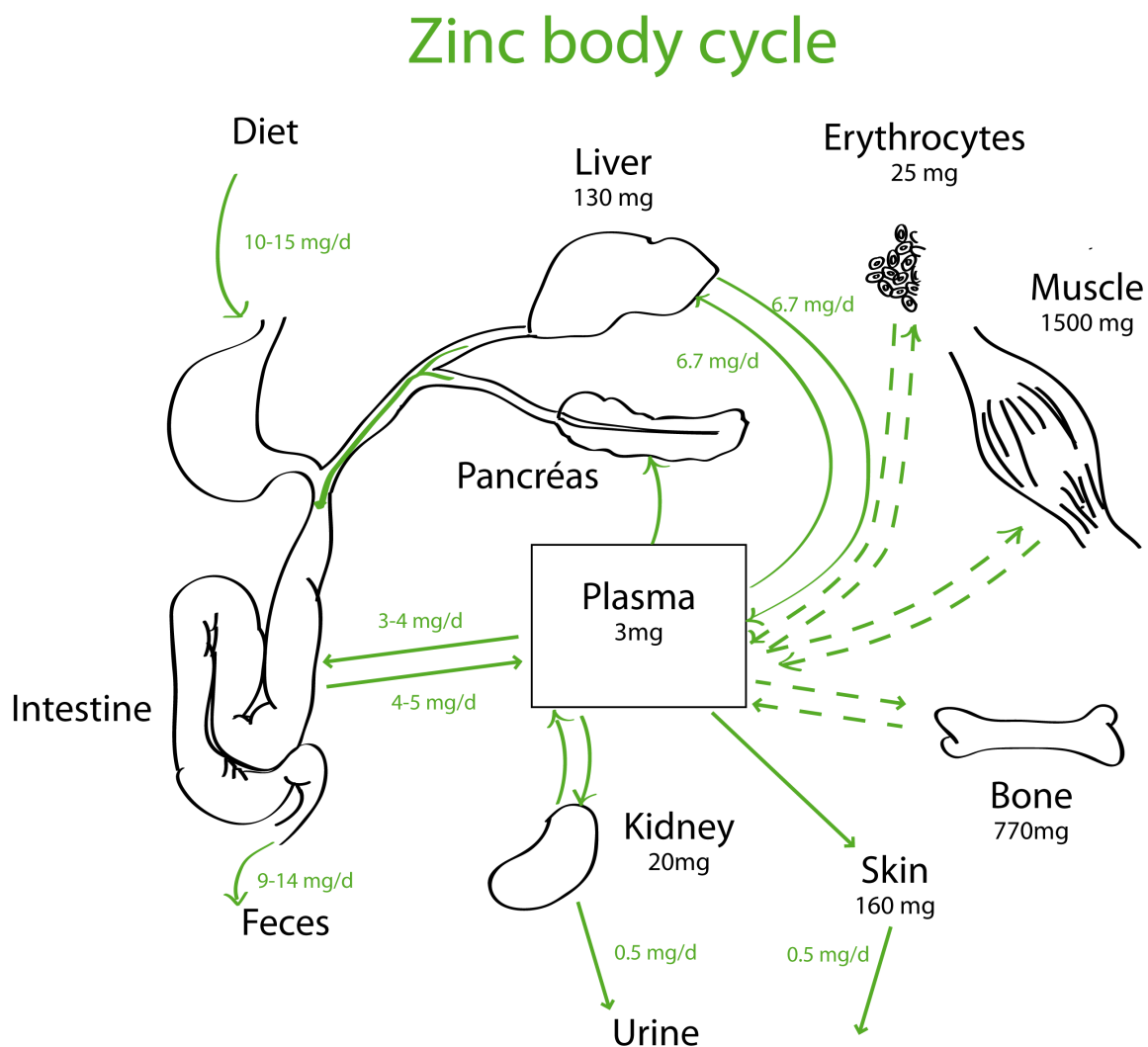


FIGURE 3.2.3: Cycle métabolique du zinc. Diet=Bol alimentaire, Stomach=Estomac, Kidney=Rein, Liver=Foie, Skin=Peau, Bones=os. Les flux notés en pointillés sont trop lents pour être quantifiés par les études cliniques avec supplémentation de zinc lourd (Foster et al, 1979).

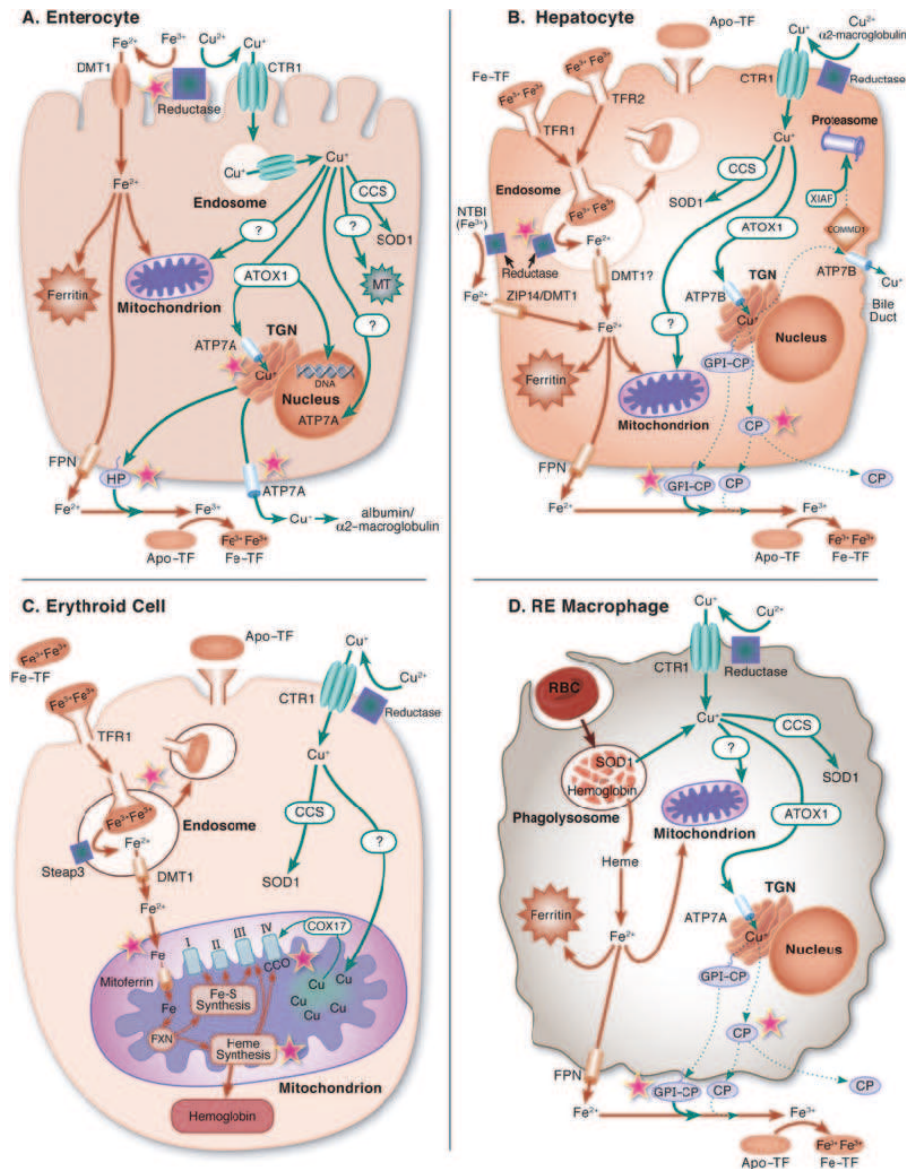


FIGURE 3.2.4: Principales interactions entre le métabolisme cellulaire du fer et du cuivre. Figure : Collins et al, 2010. Les étoiles indiquent l'emplacement des interactions entre les deux cycles dans la cellule. (A) Entérocyte (cellule intestinale) (B) Hépatocyte (cellule du foie) (C) Erythroïde (précurseur des hématies) (D) Macrophage. Abréviations : Apo-Tf : apo-transferrin, AT7PA et B : ATPase transporteuse de cuivre. ATOX1 : protéine anti-oxydante1. CCS : portéine chaperone de la SOD1; COX17 : protéine chaperone de la cytochrome oxydase c. CTR1 transporteur de cuivre 1. DMT1 : transporteur métallique divalent 1 : FE-TF transferrine FPN ferroportine FXN frataxine. MT metallothioneine NTBI : fer indépendant de la transferrine RE : réticuloendothélial. SOD1 superoxyde dismutase 1 TFR1 : récepteur de la transferrine. Les commentaires et autres abréviations de la figure sont dans le texte.

3.2.3.2 Cuivre et zinc

Le cuivre interagit également avec le cycle du zinc. Le traitement classique de la maladie de Wilson, une maladie provoquant l'accumulation de cuivre dans l'organisme, consiste à administrer des compléments de zinc [Vallee et Falchuk, 1993]. La métallothionéine, une protéine qui fixe le cuivre dans la paroi des entérocytes, va en effet être activée par le zinc, empêchant ainsi son passage dans la circulation sanguine. On citera également le fait que la superoxyde dismutase est une enzyme contenant à la fois du cuivre et du zinc.

Enfin, les cycles du fer, cuivre et zinc peuvent interagir simultanément. Par exemple, le transporteur du fer au sein des cellules de l'intestin, la protéine DMT1 (Figure 3.2.4), est également capable de faire passer du cuivre et du zinc [Andrews, 2008].

3.3 Processus engendrant des fractionnements isotopiques dans le vivant

Les isotopes d'un élément chimique contiennent tous le même nombre de protons et d'électrons. Ils ont par conséquent des propriétés thermodynamiques extrêmement proches. Cependant, la différence de masse existant entre chacun d'entre eux peut être à l'origine de fractionnements isotopiques. En effet, les énergies des liaisons à un hydrogène ou à un deutérium n'ont pas les mêmes paliers de vibrations. Plus l'élément considéré est lourd, moins la différence de masse entre les isotopes sera relativement importante. Par conséquent, on s'attend à voir de très faibles variations isotopiques pour des éléments tels que le fer, le cuivre ou le zinc. Les premières données sur des matériaux géologiques ont confirmé cette hypothèse [Beard et Johnson, 1999]. Néanmoins, il a ensuite été découvert que le vivant réalisait des fractionnements d'une bien plus grande ampleur [Beard *et al.*, 1999]. Par la suite, Anbar *et al.* ont mis en évidence des fractionnements du même ordre de grandeur dans des échantillons géologiques formés dans des conditions particulières [Anbar *et al.*, 2000]. Il n'en reste pas moins que le vivant réalise d'une manière générale des plus grands fractionnements isotopiques que les processus géologiques [Walczyk et Von Blanckenburg, 2002, Zhu *et al.*, 2002, Chu *et al.*, 2006, Balter *et al.*, 2010].

L'énergie d'une liaison moléculaire augmente avec sa fréquence vibratoire et, ainsi, diminue avec la masse atomique des isotopes métaboliques. La concentration préférentielle des isotopes lourds dans les liaisons fortes diminue l'énergie globale du système. En conséquence, les deux principaux facteurs potentiels de fractionnement isotopique sont l'état d'oxydation et la nature des ligands. Par exemple, le Fe^{3+} présente un plus fort champ électrostatique que celui du Fe^{2+} . Dès lors, les composés oxydés sont théoriquement enrichis en isotopes lourds comparés aux espèces réduites de même nature. De même, des ligands forts, tels que les bases de Lewis devraient être préférentiellement associés à des isotopes lourds.

En règle générale, trois processus peuvent engendrer un fractionnement isotopique

- les processus cinétiques : lors de réactions chimiques irréversibles, il peut se produire un appauvrissement ou un enrichissement isotopique dépendant de la quantité d'espèce chimique produite. Ce fractionnement est caractéristique des réactions biologiques catalysées par des enzymes.

- les processus diffusifs : généralement, les isotopes légers diffusent plus vite que les isotopes lourds. Ce phénomène peut engendrer un fractionnement diffusif.

- les processus thermodynamiques : lors de réactions d'échanges isotopiques à l'équilibre thermodynamique, il peut se produire un fractionnement isotopique contrôlé par la constante de réaction, elle-même dépendante de la température. Ce type de réaction peut par exemple se produire lors d'un changement de phase.

3.4 Historique des mesures du $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$

Depuis une vingtaine d'années, le développement des techniques spectrométriques ont permis l'analyse des abondances naturelles d'isotopes stables d'éléments jusqu'alors impossible à déterminer avec une haute précision. La résolution des spectromètres de masse ne permettait pas de résoudre certaines interférences. Pour le fer, par exemple, les ICP-MS (*induced coupled plasma mass spectrometry*) utilisent une flamme d'argon (Ar), un gaz inerte. La différence de masse entre l'isotope majeur du fer, le ^{56}Fe , et la molécule ArO est très difficile à résoudre. Cela nécessite l'utilisation d'ICP-MS à très grand rayon, tel que le Nu1700, où de travailler en pseudo-haute résolution.

Les premières mesures de haute précision pour le cuivre et le zinc ont été réalisées par Maréchal *et al.* en 1999. Les échantillons comprenaient à la fois des matériaux géologiques et biologiques : des roches sédimentaires, des minerais, un échantillon de sang humain et une moule (!). Par la suite, les variations isotopiques du cuivre et du zinc ont été étudiées dans des perspectives environnementales et géologiques (e.g. : Zhu *et al.*, 2000a, Zhu *et al.*, 2000b, Maréchal et Albarède, 2002, Pichat *et al.*, 2003, Albarède, 2004, Moynier *et al.*, 2006, Sonke *et al.*, 2008). Depuis 1998, les géochimistes mesurent les rapports isotopiques du fer dans des matériaux géologiques et étudient l'impact des bactéries sur les fractionnements isotopiques (e.g. Bullen et McMahon, 1997, Beard et Johnson, 1999, Beard *et al.*, 1999, Anbar *et al.*, 2000, Belshaw *et al.*, 2000, Zhu *et al.*, 2000, Beard *et al.*, 2003, Anbar, 2004, Moynier *et al.*, 2006).

Forts de leur expérience, les géochimistes se sont intéressés aux rapports isotopiques du cuivre, du zinc et du fer dans un nouvel objet d'étude : les plantes. L'outil géochimique a alors offert de nouvelles perspectives pour la compréhension de leur métabolisme (e.g. Weiss *et al.*, 2005, Guelke et von Blanckenburg, 2007, Viers *et al.*, 2007, Moynier *et al.*, 2009, Aucour *et al.*, 2011, Weinstein *et al.*, 2011, Jouvin *et al.*, 2012).

Parallèlement à l'étude des plantes, les premières mesures isotopiques du fer, cuivre et zinc ont été réalisées dans des tissus animaux à partir de 2002 [Walczyk et Von Blanckenburg, 2002, Zhu *et al.*, 2002, Balter *et al.*, 2010]. La première

décennie du XXI^{ème} siècle a vu naître peu de publications chez l'Homme. On citera cependant les travaux fondateurs de Walczyk et von Blanckenburg mettant en évidence une différence isotopique entre hommes et femmes dans le sang (2002) et cherchant à déchiffrer le message isotopique du corps humain (2005). À cela s'ajoutent les travaux d'Ohno *et al.* (2004, 2005) montrant la stabilité du rapport isotopique du sang au cours du temps chez un homme, ainsi que les études de Krayenbuehl *et al.* et Stenberg *et al.* sur l'impact de l'hémochromatose sur le $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$ du sang. Parmi ces études, notons que trois d'entre elles portent sur moins d'une dizaine d'individus [Ohno *et al.*, 2004, Ohno *et al.*, 2005, Stenberg *et al.*, 2005].

En revanche, l'ensemble de ces travaux ont ouvert des perspectives biomédicales à l'étude des rapports isotopiques et le rythme des publications semblent s'accélérer. Pendant la durée de ce travail de thèse, quatre nouvelles publications concernant les rapports isotopiques du fer, cuivre et zinc dans le sang ont vu le jour dans la littérature : [Albarède *et al.*, 2011, Hotz *et al.*, 2011, Hotz *et al.*, 2012, Van Heghe *et al.*, 2012]. Les résultats n'ont cependant jamais été envisagés sous un angle anthropologique. Le but de ce travail de thèse est de tenter de contribuer à ce manquement.

Conclusion

Les premiers travaux portant sur les isotopes du fer et du cuivre dans le corps humain ont mis en évidence une différence isotopique entre hommes et femmes. L'origine métabolique de cette différence est encore mal comprise et plusieurs hypothèses pour l'expliquer sont avancées. Pourtant, cette différence pourrait être d'un intérêt majeur pour les anthropologues connaissant les difficultés de diagnose sexuelle des os isolés. La piste de l'étude des isotopes du fer et du cuivre dans les restes humains semble primordiale mais ne doit pas être découplée de l'analyse des autres facteurs de variations. Les études isotopiques préliminaires et la connaissance du métabolisme de ces métaux mettent en lumière la nécessité d'étudier l'impact de l'alimentation, de la ménopause ou du vieillissement sur leur variabilité naturelle, que ce soit de manière intra ou inter-populationnelle. Les isotopes du zinc ne doivent pas être oubliés : leur métabolisme est lié à ceux du cuivre et du fer, comme en témoigne les études élémentaires et l'étude de Stenberg *et al.* (2005).

Matériel et Méthodes

Introduction

Ce travail de thèse implique la mesure de rapports isotopiques du fer, du cuivre et du zinc dans des échantillons biologiques. Ces échantillons sont de natures diverses : dents et ossements humains archéologiques et actuels, sang, foie ou encore endomètre. Cette partie vise à décrire leurs caractéristiques, leur provenance ainsi que la façon dont ils ont été préparés et analysés. L'analyse isotopique d'échantillons au spectromètre de masse à multicollection et à source plasma exige une purification préalable afin de limiter les interférences et les effets de matrice. S'agissant des premières mesures isotopiques de métaux de transition sur des ossements et de l'émail dentaire, nous décrivons ici les protocoles de purification ainsi que le principe et la réalisation des analyses spectrométriques. Enfin, nous évoquerons la précision et la reproductibilité des résultats.

Chapitre 4

Description des matériaux analysés

Ce chapitre a pour but de donner un aperçu de la structure, la formation et le renouvellement des matériaux biologiques étudiés au cours de cette thèse. Il sera également apporté des informations sur leurs teneurs en cuivre, zinc et fer.

4.1 Tissus minéralisés

L'os, l'émail dentaire et la dentine sont les seuls tissus minéralisés du corps humain. La partie minérale représente environ 70 % de l'os et 96 % de l'émail dentaire en masse sèche. Elle est constituée de bioapatite, une forme d'hydroxyapatite carbonatée $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ où les ions OH^- peuvent être substitués par des carbonates. La partie organique est essentiellement constituée de collagène mais contient également des protéines (1 %).

4.1.1 Os

4.1.1.1 Structure de l'os

On distingue trois types d'ossements : les os longs, courts et plats. Cependant, certains ossements ne correspondent à aucun de ces trois types. On parle alors d'ossements intermédiaires ou irréguliers que l'on classe parmi de nombreuses sous-catégories (os allongés, arqués, pneumatiques etc.). Quoi qu'il en soit, l'os sera généralement constitué d'une partie spongieuse protégée par une partie corticale (Figure 4.1.1). En fonction du type d'os, ces deux parties seront de dimensions et d'importance différentes. Dans ce travail de thèse, nous avons analysé la partie corticale d'os allongés, les phalanges, et des os pariétaux appartenant au groupe des os plats. Les os plats sont généralement fins et incurvés. Ils sont composés d'une couche d'os spongieux entourée de deux couches parallèles d'os compact, les tables externe et interne. La couche d'os spongieux est alors dite « en diploë ».



FIGURE 4.1.1: Vue en coupe du condyle occipital de l'individu D92 (collections du CCEC) dévoilant la partie corticale et spongieuse de l'os.

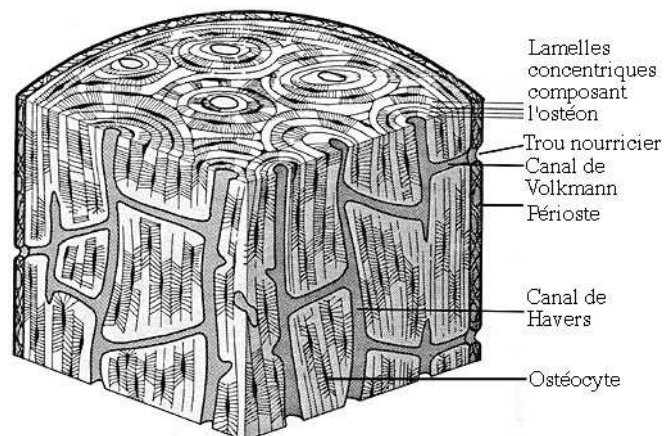


FIGURE 4.1.2: Structure fine de l'os compact. Dessin E. Walravens

La structure fine de l'os compact est illustrée par la figure 4.1.2. On y distingue des ostéons, unités structurales dont le grand axe est parallèle à celui de l'os long. Chaque ostéon est organisé en lamelles disposées autour du canal de Havers qui contient nerfs et vaisseaux sanguins. L'os, même dans sa partie corticale, est donc un tissu irrigué. Au sein ou entre les lamelles d'ostéons, des perforations, les ostéoplastes, contiennent les ostéocytes qui sont les cellules matures de l'os. Les canaux de Volkman relient les canaux de Havers entre eux et sont également en connexion avec le canal médullaire de la diaphyse et l'extérieur de l'os.

4.1.1.2 Croissance et remaniement de l'os

Les ostéoblastes synthétisent la partie non-minérale de l'os en sécrétant du collagène et des protéines. Ils participent également à la minéralisation en concentrant le phosphate et le calcium. De cette manière, les ostéoblastes se retrouvent « emmurés » par des couches concentriques de tissu osseux. La survie de ces cellules, que l'on nomme alors ostéocytes, est néanmoins assurée par des prolongements cytoplasmiques. Avec les ostéoclastes, cellules assurant la résorption de l'os, les ostéocytes permettent le perpétuel renouvellement de l'os (Figure 4.1.5). Les ostéocytes sont soumis à l'influence de nombreux facteurs hormonaux et locaux mais également à des paramètres tels que l'âge, le sexe et les pathologies [Sakamoto, 1982, Steele et Bramblett, 1988]. D'après les expériences portant sur le turnover des cellules osseuses, il apparaît que l'os enregistrerait le signal chimique des dix dernières années de la vie d'un adulte [Libby *et al.*, 1964, Stenhouse et Baxter, 1979]. Il semble cependant que le renouvellement de l'os compact soit plus lent que celui de l'os spongieux [Sealy *et al.*, 1995].

4.1.1.3 Le fer, le cuivre et le zinc dans l'os

Les concentrations en fer, cuivre et zinc de l'os donnent des résultats très variables en fonction des études. Ces différences peuvent s'expliquer par une variabilité naturelle importante entre les individus, les différentes zones de l'os (spongieux versus cortical) et les instruments de mesures utilisés (Figure 4.1.3). Les éléments traces sont à la fois présents dans la partie organique et minérale de l'os. Yoshinaga and Suzuki (1989) signalent d'ailleurs que la concentration en éléments traces est fortement affectée par la présence de matière organique. Les études portent sur des os prélevés du vivant [D'Haese *et al.*, 1999, Helliwell *et al.*, 1996] ou 24h après la mort des individus [Beneš *et al.*, 2000, Zaichick *et al.*, 2009]. Seuls les os analysés par Martinez-Garcia *et al.* (2005) ont été calcinés afin d'éliminer toutes traces de matière organique. On notera que ces os sont beaucoup plus riches en fer, cuivre et zinc que les autres, même en tenant compte de la correction de concentrations os sec/os calciné de Zwanziger *et al.* (1989).

Le fer, le cuivre et le zinc possèdent des cations divalents qui sont susceptibles de se substituer au calcium au sein de l'hydroxyapatite [Duff, 1975, Pan et Fleet, 2002]. Le zinc est principalement associé au fluor au sein de l'hydroxyapatite. Cet élément joue

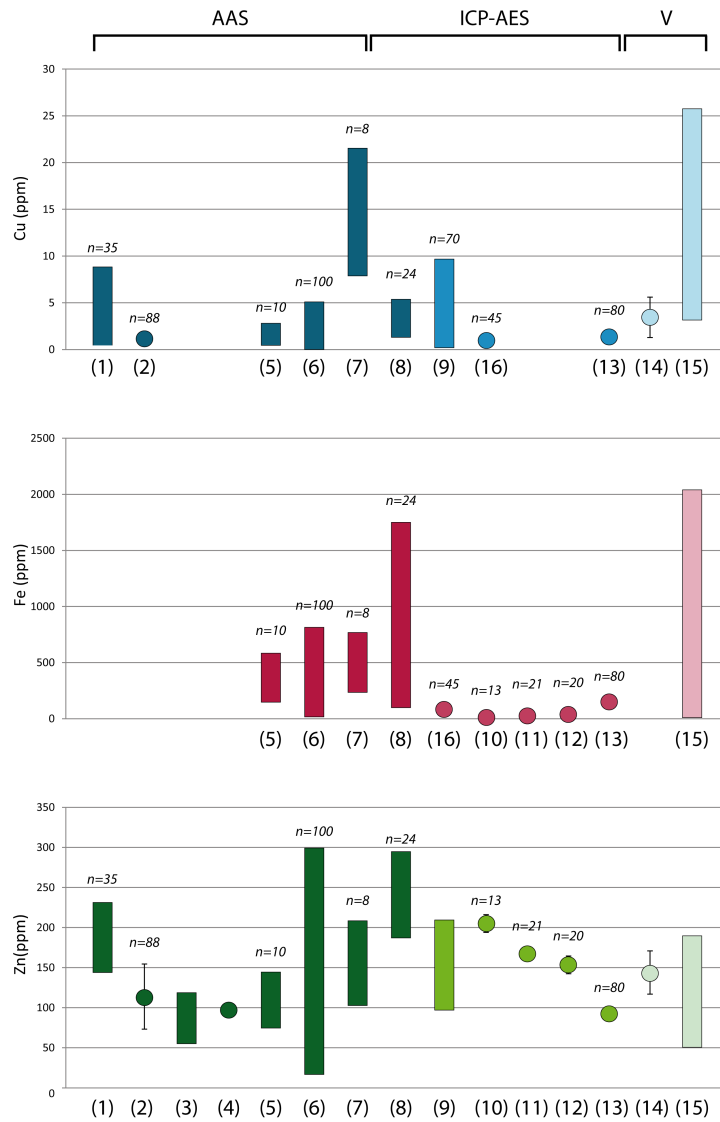


FIGURE 4.1.3: Concentrations de cuivre, fer et zinc mesurées par spectrométrie d'absorption atomique (AAS), spectrométrie optique à source plasma (ICP-AES) et d'autres méthodes (V). Les concentrations de la littérature ont été convertie en concentrations par masse sèche d'après les recommandations de Zwanziger *et al.* 1989. Les rectangles correspondent aux gammes de valeurs, les cercles aux valeurs moyennes et les barres d'erreur aux écartype. 1 : Baranovska *et al.*, 1995 (sternum); 2. Lappalainen *et al.*, 1982 (os spongieux); 3. Strehlow *et al.*, 1969 cité par Zwanziger *et al.*, 1989; 4. Wielopolski *et al.*, 1983 cité par Zwanziger *et al.*, 1989; 5. D'Haese *et al.*, 1999 chez des individus sains (os iliaque); 6. D'Haese *et al.*, 1999 chez des patients souffrant de défaillance rénale (os iliaque); 7. Martinez-Garcia *et al.*, 2005 (sternum) 8. Scancar *et al.*, 2000 (crête iliaque); 9. Benes *et al.*, 2000 (os pariétal); 10 Helliwell *et al.*, 1996 chez des individus sains (os trabéculaire du fémur); 11 Helliwell *et al.*, 1996 chez des individus souffrant d'arthrose (os trabéculaire du fémur); 12. Helliwell *et al.*, 1996 chez des individus souffrant de fracture (os trabéculaire du fémur) 13. Zaichick *et al.*, 2008 (côte) 14. Hyvonen & Dabek, 1981 cité par Zwanziger *et al.*, 1989, mesuré par PIXE; 15. Compilation de moyennes obtenues selon diverses techniques de Iyengar, 1978; 16. Yoshinaga *et al.*, 1994 (côte).

d'ailleurs un rôle crucial en tant que cofacteur dans la régulation et la résorption du tissu osseux, ainsi que dans la structuration de la trame de l'os. La présence de ces trois éléments dans la partie minérale peut également résulter d'un simple dépôt en surface [Helliwell *et al.*, 1996].

4.1.2 Email dentaire

L'émail dentaire est la partie externe de la couronne des dents qui recouvre la dentine (Figure 4.1.4). Il s'agit de la partie la plus minéralisée du corps humain.

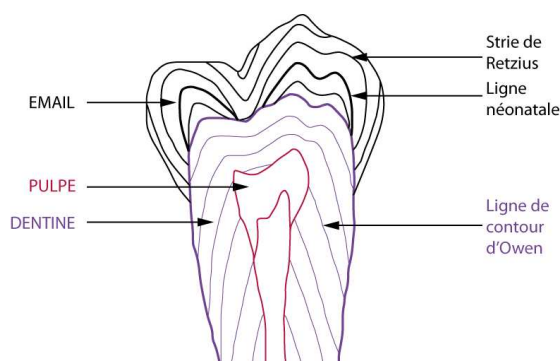


FIGURE 4.1.4: Schéma représentant une coupe transversale de dent. Les stries de Retzius et les lignes de contour d'Owen sont des lignes d'accroissement, respectivement dans l'émail dentaire et dans la dentine.

4.1.2.1 Structure de l'émail dentaire

En coupe transversale, on distingue des structures de croissance au sein de l'émail dentaire (Figure 4.1.4) :

- des stries de Retzius qui résultent de la périodicité de la formation de l'émail dentaire
- la ligne néonatale, une hétérogénéité structurale qui se met en place lors de la naissance pour les dents en formation.

La variabilité de l'orientation et de la forme des prismes énaméliques définit également des zones distinctes dans l'émail appelées bandes de Hunter-Schreger. Les prismes sont orientés de façon parallèle au sein d'une bande et sont perpendiculaires aux deux bandes adjacentes [Carter, 1990].

4.1.2.2 Formation de l'émail prismatique

Odontogénèse

La dent des Mammifères se forme à partir d'une ébauche mixte, épithélio-dermique. L'ébauche épidermique se différencie et un organe producteur d'émail se développe. Cet

organe de l'émail donne naissance à quatre strates de cellules : l'épithélium de l'émail externe, le réticulum interne, la strate intermédiaire et l'épithélium de l'émail interne. Cette dernière strate est à l'origine des améloblastes (ou adamantoblastes) qui assurent la sécrétion de l'émail dont les couches se superposent de manière centrifuge [Carter, 1990].

Amélogénèse

L'émail dentaire est produit par les améloblastes sous forme de couches peu épaisses et avasculaires. L'amélogénèse débute au niveau des futures cuspides¹ et se déroule en deux étapes :

- La phase sécrétoire où l'émail partiellement minéralisé se forme. Il est alors riche en protéines et en matrice organique.
- Le stade de maturation voit progresser la minéralisation.

La transition entre les deux phases est marquée par la perte des volatils et des protéines, par l'accélération de la minéralisation et par une stagnation de la masse sèche de l'émail. La masse de l'émail réaugmente peu après la poursuite de la minéralisation [Smith, 1998]. Les améloblastes, au cours de la phase de maturation prennent une apparence striée ou acquièrent une bordure ondulée. C'est la traduction du changement de fonction de ces cellules : de sécrétrices, elles deviennent transporteuses. En fin de maturation, les améloblastes disparaissent. Il est à noter que 25 % d'entre eux avaient déjà disparu au cours de la transition post sécrétoire et 25 % supplémentaire pendant la maturation. Ainsi, l'émail ne peut se renouveler après sa formation. L'émail vieillit et devient avec l'âge moins perméable aux fluides, moins soluble dans l'acide et contient moins d'eau [Piette et Goldberg, 2001].

Le déroulement temporel de l'amélogénèse

La formation de l'émail est un processus linéaire en terme de temps. Chez l'Homme, cette vitesse est de $4\mu m$ par jour et met en jeu 151 000 améloblastes. La mise en place de l'émail s'étale sur 4 à 5 ans pour une dent permanente humaine, 2/3 du temps étant occupé par la phase de maturation. Ces valeurs sont des moyennes et il est essentiel de connaître précisément le déroulement temporel de la formation de l'émail pour pouvoir donner un âge ou raisonner en terme de temps lors des études sur l'émail dentaire. Ces informations sont résumées figure 4.1.5 pour les dents que nous avons analysées au cours de notre étude.

4.1.2.3 Le fer, le cuivre et le zinc dans l'émail dentaire

L'émail dentaire est très minéralisé. L'essentiel des éléments traces qu'il contient provient d'une substitution entre le calcium de l'apatite et le Fe^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} . Les concentrations en ces trois éléments sont respectivement de 80 ppm, 8 ppm et 120 ppm

1. voir le glossaire

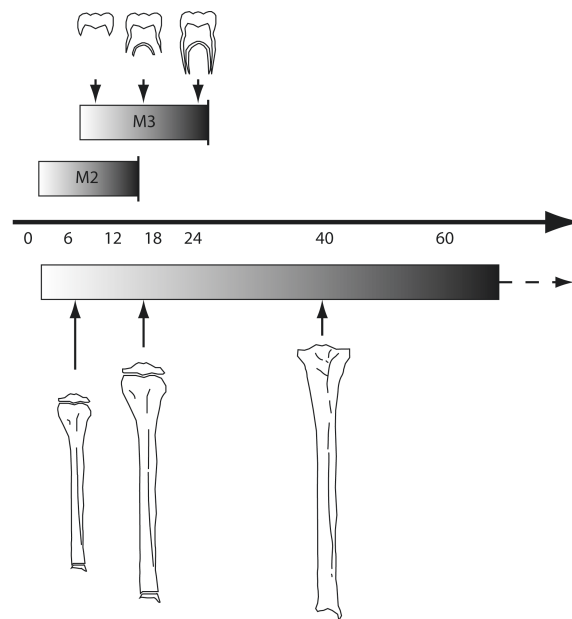


FIGURE 4.1.5: Formation et renouvellement des tissus osseux et dentaires. Modifiée d'après Herrscher *et al.*, 2003

[Gross et Berndt, 2002]. L'émail dentaire est riche en zinc, ce qui est lié à son association avec le fluor au sein de l'hydroxyapatite.

4.2 Sang

4.2.1 Composition

Le sang est un tissu conjonctif fluide. Il est constitué d'une composante liquide et d'éléments cellulaires (les éléments figurés). On parle d'hématocrite pour désigner le pourcentage du volume des cellules circulant dans le sang par rapport au volume total du sang. L'hématocrite est en moyenne de 45 %. Elle est plus faible chez la femme que chez l'homme. Chez les enfants et femmes enceintes, ce taux diminue considérablement.

4.2.1.1 Éléments figurés

- Les hématies (également appelées érythrocytes ou « globules rouges ») représentent 99 % des éléments figurés. Chez les Mammifères, elles sont anuclées et dépourvues d'organites. Leur cytoplasme est riche en hémoglobine, ce qui confère au sang sa couleur rouge.

- les leucocytes (ou « globules blancs ») sont des cellules du système immunitaire. Ils comprennent les lymphocytes, les granulocytes et les monocytes. Ces cellules constituent

0.2 % du total des éléments figurés.

- les thrombocytes (ou « plaquettes ») ne contiennent pas non plus de noyau. Ce sont des fragments de leur précurseur cellulaire, le mégacaryocyte. Les plaquettes constituent 0,6 à 1 % des éléments figurés.

4.2.1.2 Plasma sanguin

Le plasma sanguin est la composante liquide et jaunâtre du sang (Figure 6.2.1). Il est composé d'eau, d'ions et de diverses molécules : glucose, lipides, hormones et protéines.

Les principales protéines sont :

- les immunoglobulines et les protéines du complément qui participent aux réactions immunitaires
- l'albumine
- le fibrinogène

4.2.2 Formation et renouvellement

4.2.2.1 Hématopoïèse

L'hématopoïèse est le terme consacré à la formation des éléments figurés du sang. Ces éléments se forment à partir de cellules souches hématopoïétiques qui sont capables d'autorenouvellement tout comme de différenciation. Selon la voie de différenciation empruntée par ces cellules, on parle d'érythropoïèse (formation des hématies/érythrocytes), leucopoïèse (formation des globules blancs) ou thrombocytopoïèse (formation des plaquettes).

L'érythropoïèse est stimulée par l'érythropoïétine (EPO) et dure environ 5 jours. À partir de la cellule totipotente, un proérythroblaste se forme. Au cours de la différenciation de ce proérythroblaste, la cellule voit son taux d'hémoglobine croître et son nombre de ribosomes diminuer. Le noyau se condense progressivement avant d'être expulsé.

La durée de vie des hématies est d'environ 120 jours. Au terme de cette période elles sont dégradées dans les cellules du foie (cellules de Kupffer), de la rate et par les macrophages de la moelle osseuse.

4.2.2.2 Régulation du plasma sanguin

La présence d'albumine permet de réguler le volume de plasma sanguin et ainsi la pression oncotique. La régulation se fait donc par des échanges avec le réseau lymphatique.

4.2.3 Le fer, le cuivre et le zinc dans le sang

Le fer du sérum est essentiellement lié à la transferrine et dans une moindre mesure à la ferritine sous sa forme trivalente [Cohen *et al.*, 2010]. Le cuivre extracellulaire est

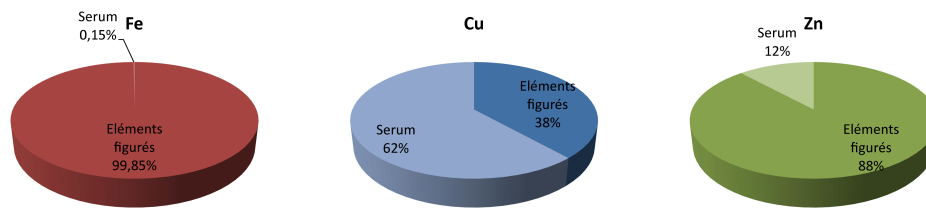


FIGURE 4.2.1: Répartition du fer, cuivre et zinc entre les éléments figurés et le plasma du sang.

hébergé à 80 % par la céruloplasmine sous sa forme divalente [Hellman *et al.*, 2002]. Dans les érythrocytes, ces deux éléments sont présents sous forme Fe^{2+} et Cu^{2+} , respectivement associés à l'hémoglobine et la superoxyde dismutase [Harris *et al.*, 1999, Andrews, 2005b]. Le zinc n'est présent qu'à l'état divalent dans le corps humain. Il est lié à l'anhydrase carbonique dans les érythrocytes et à l'albumine dans le serum. Le plus grande partie du zinc et du fer du sang est contenue dans les hématies quand seulement 40 % du cuivre y est hébergé (Figure 4.2.1).

4.3 Organes

4.3.1 Endomètre

L'endomètre est la paroi interne de l'utérus. Pendant les années reproductives et en dehors des périodes de grossesse, cette muqueuse utérine se nécrose et se renouvelle chaque mois. Ce renouvellement cyclique est dû à un contrôle hormonal : les oestrogènes, sécrétés par les follicules en première partie de cycle auxquels s'ajoutent la progestérone sécrétée par le corps jaune après l'ovulation. En cas de non fécondation, le corps jaune se dégenère, ce qui entraîne une diminution de la sécrétion de progestérone et consécutivement l'apparition des règles. L'évolution ovarienne des follicules, de l'ovulation et du corps jaune est lié à un contrôle par la LH et la FSH, hormones hypophysaires. (Figure 4.3.1)

Il n'existe pas de littérature traitant de la concentration des métaux de transition dans l'endomètre, mais on peut supposer que son contenu équivaut à celui des autres muqueuses.

4.3.2 Foie

Le foie est un organe volumineux et multifonctionnel. Il participe en effet à la fonction de digestion, réserve et excrétion. Le foie synthétise la bile, l'albumine, le fibrinogène, le glycogène ou encore les facteurs de coagulation. Il intervient également dans le stockage de la vitamine B12 et de métaux, en particulier le fer. 80 % des cellules le constituant sont des hépatocytes qui permettent le stockage du fer et du cuivre.

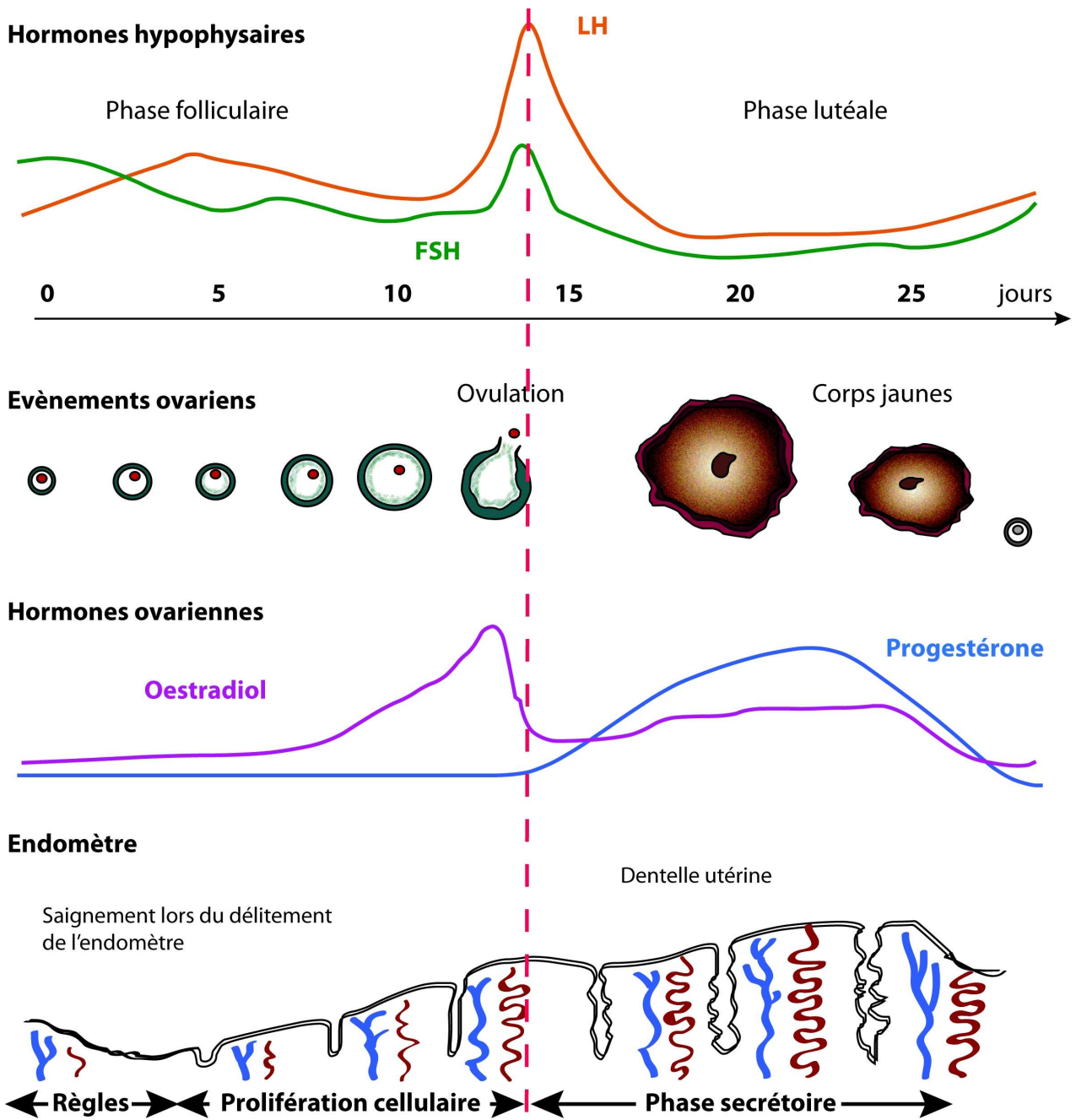


FIGURE 4.3.1: Evolution hormonale, ovarienne et endométriale au cours du cycle menstruel.

La concentration moyenne du fer, cuivre et zinc présents dans le foie est respectivement de 726 ± 136 ppm, 5.8 ± 6.1 ppm, 57.5 ± 56 ppm respectivement [Barry et Sherlock, 1971, Beneš *et al.*, 2000]. Le foie est l'organe principal du stockage du cuivre et du fer. Au sein des hépatocytes, le cuivre est principalement lié à la superoxyde dismutase sous forme Cu^+ [Harris *et al.*, 1999] mais peut également être associé à la céruloplasmine [Tavassoli *et al.*, 1986]. Le fer y est stocké sous sa forme trivalente au sein de la ferritine [Andrews, 2005b]. Le foie contient également 1,8 % du zinc total présent dans le corps humain.

Chapitre 5

Provenance des échantillons

Ce travail de thèse, à l'interface de la géochimie, de l'anthropologie et de la biologie médicale, a nécessité l'analyse d'échantillons de nature et d'origine variables. Cette partie a pour vocation de préciser ces informations ainsi que le contexte de vie des individus dont ils proviennent.

5.1 Echantillons osseux et dentaires

5.1.1 Saint-Laurent de Grenoble

5.1.1.1 Contexte archéologique

L'église de Saint-Laurent de Grenoble, construite au IV^{ème} siècle, a connu une utilisation ininterrompue jusqu'au XVIII^{ème} siècle [Colardelle, 2008]. Il s'agit ainsi d'un site archéologique exceptionnel par son contenu funéraire et monastique. L'église est située dans un faubourg de Grenoble, le quartier Saint-Laurent, sur la rive droite de l'Isère (Figure 5.1.1). Depuis le XII^{ème} siècle, elle comprend une nef, un chœur, un cloître et un mausolée (Figure 5.1.2). Les fouilles ont débuté en 1959 pour finir en 1995 et ont été menées successivement par Raymond Girard et Renée Colardelle. Ces travaux ont permis de mettre à jour plus de 1500 sépultures et 18 phases d'inhumation. Ces phases d'inhumation ont pu être calées chronologiquement à l'aide de 25 datations radiocarbones effectuées sur des ossements humains en connexion anatomique. Des tombes sont présentes dans la nef, mais elles sont principalement localisées dans le cloître, au sud de l'Eglise et sur la place Saint-Laurent.

Le matériel que nous avons étudié provient des fouilles réalisées dans le cloître (Figure 5.1.2). Il provient des phases d'inhumation 17 et 18, qui représentent le plus grand nombre de sépultures identifiées. Il n'existe pas de datation radiocarbone pour ces phases. Cependant, de nombreuses monnaies présentes dans les sépultures permettent de confirmer leur appartenance au XVII^{ème} et XVIII^{ème} siècles (Figure 5.1.3, [Colardelle, 2008]).

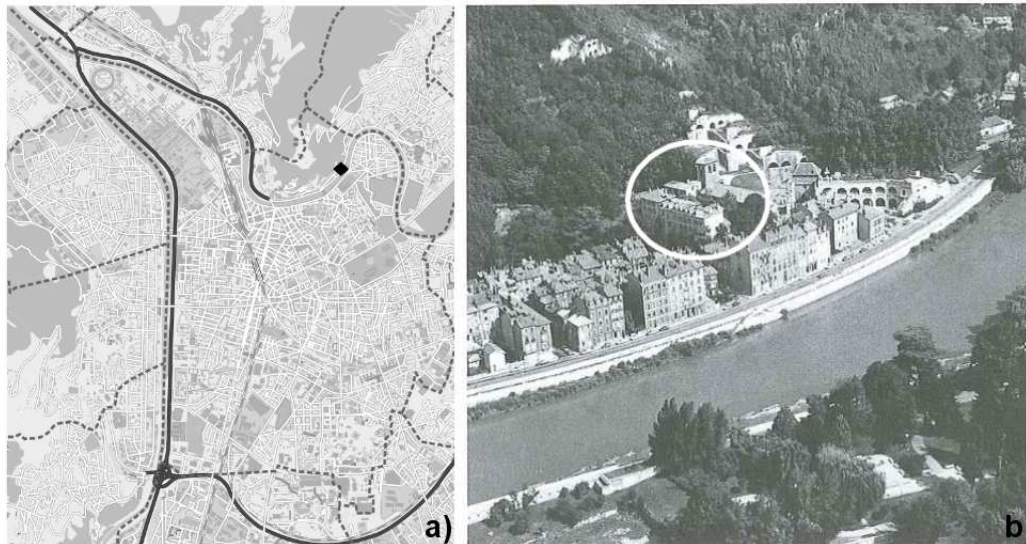


FIGURE 5.1.1: Localisation de l'église de Saint-Laurent de Grenoble a) Géolocalisation dans la ville de Grenoble b) Vue aérienne de la rive droite de l'Isère, Grenoble (Crédit photographique : Ville de Grenoble)

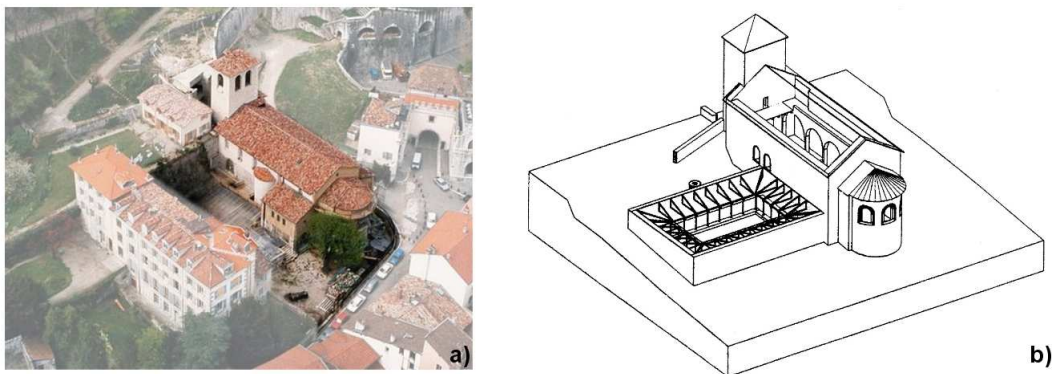


FIGURE 5.1.2: a) Vue aérienne de l'église de Saint-Laurent de Grenoble (crédit photographique : Sinagra) b) Axonométrie du site (dessin M.-T. P. d'après Renée Colardelle)

Au cours de ces deux siècles, l'activité économique de Grenoble se développe notamment avec l'essor de la ganterie, en grande partie localisée dans le quartier de Saint-Laurent [Colardelle, 2008]. Mais l'essor économique ne semble pas améliorer les conditions sanitaires : la démographie est affectée par les crises de subsistance (1694, 1709-10), et les épidémies de peste (1628-32, 1643 et 1691) [Tarcy *et al.*, 2012]. Toutefois, les maladies endémiques continuent de se développer en raison des déplorables conditions d'hygiène de la ville (système d'égouts insuffisant, nappe phréatique affleurante et donc polluée, rues et logements exigus ...). Ainsi on relève de nombreux cas de typhus, tuberculose, variole ou encore de maladies vénériennes. Il s'agit également d'un quartier surpeuplé dès le XVI^{ème} siècle. De 400 habitants en 1564, la paroisse de Saint-Laurent compte 400 habitants en 1775 [Herrscher *et al.*, 2006]. La population est constituée des classes sociales modestes et pauvres (entre 20 et 50 %, Chomel 1976).

Au cours de la phase 17, 42 % des tombes sont des cercueils avec clous et 26 % sont des fosses en pleine terre. Pendant la phase 18, les cercueils à clous sont également majoritaire (51 %) et les fosses en pleine terre toujours présentes (17 %). Les autres types de tombes n'ont pu être identifiés [Colardelle, 2008]. 20 à 30 % des sépultures contiennent également des linceuls, notamment dans les cercueils [Colardelle, 2008]. Parmi les 416 sépultures mises à jour pour les phases 17 et 18, nous avons réalisé des analyses sur 43 phalanges ou métacarpes et 17 troisièmes molaires. Cet échantillonnage a été choisi car une étude préalable paléolithaire avait été réalisée sur les ossements, et des données telles que le $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ sont ainsi disponibles pour ces squelettes annexe B [Herrscher, 2005, Herrscher *et al.*, 2006]. De plus, en raison de la bonne conservation des restes de Saint-Laurent, des données anthropologiques telles que le sexe, l'âge au décès et les pathologies ont pu être estimées.

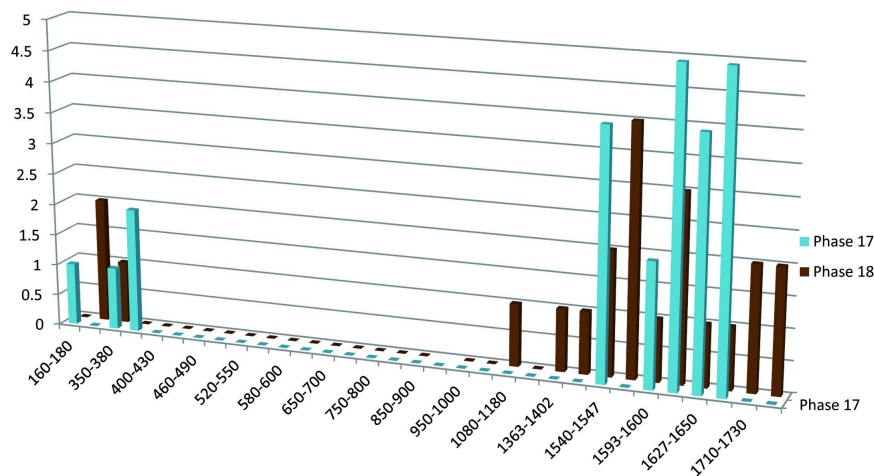


FIGURE 5.1.3: Datation des monnaies mises à jour dans les niveaux contemporains des phases d'inhumation 17 et 18. D'après Colardelle, 2008.

5.1.1.2 Données bioanthropologiques

Sexe

Deux méthodes d'estimation du sexe portant sur l'os coxal ont été appliquées sur les squelettes de Saint-Laurent : la méthode morphologique de Bruzek (2002) ainsi que la méthode de Murail *et al.* (2005). La méthode de Bruzek repose sur la combinaison de cinq caractères et permet de classer l'individu dans la catégorie homme, femme ou indéterminé. Dans notre cas, si trois critères sont concordants on estime le sexage correct à une probabilité de 91 %. Si les cinq critères concordent, on estime alors la probabilité comme étant supérieure à 95 %. La méthode de Murail *et al.* permet quant à elle d'estimer la probabilité pour un individu d'être un homme ou une femme, et le pourcentage retenu pour estimer le sexage fiable est de 95 %. Les résultats de ces estimations sont données dans l'annexe B.

Age au décès

L'age au décès a également été évalué selon deux méthodes. Celles-ci reposent sur la modification de la surface auriculaire de l'os coxal [Lovejoy *et al.*, 1985a, Schmitt, 2005]. Ces méthodes fournissent une gamme d'âges possibles et non pas une année précise. Hélas, les deux méthodes ne fournissent pas toujours les mêmes gammes. Nous avons donc attribué pour les âges au décès des gammes tenant compte des deux méthodes. De plus, les individus ne présentant pas de fusion de la crête iliaque, de la synchondrose sphéno-occipitale et de l'extrémité médiane de la clavicule ont été considérés comme appartenant au groupe des jeunes. Les individus ont ainsi pu être classés en quatre groupes : jeunes (YA, moins de 34 ans) ; mature (MA, de 34 à 45 ans) ; âgés (OA, plus de 45 ans) et âge inconnu (U). Ainsi, des comparaisons sont possibles entre les groupes d'âge malgré les incertitudes sur celui-ci.

Paléopathologie

L'étude paléopathologique révèle une recrudescence d'infections buccales et dentaires chez les adultes et subadultes en comparaison aux observations réalisées sur les squelettes médiévaux [Herrscher *et al.*, 2006]. Dans notre échantillonnage, on note un cas de syphilis (individu T39) et deux cas d'hyperostose squelettique idiopathique diffuse (T02 et T20) [Herrscher et Katzenberg, 2008].

5.1.2 Collections de crânes du Centre de conservation et d'Étude des Collections.

La collection de crânes humains du Centre de Conservation et d'Étude des Collections (CCEC) a été initialement rassemblée dans le cadre d'un projet d'anthropométrie, mais a finalement été léguée au CCEC. Les crânes proviennent d'individus décédés entre 1877



FIGURE 5.1.4: Crâne conservé au CCEC. Il s'agit d'un homme décédé en 1879 à l'âge de 29 ans.

et 1881 dans les Hospices civils de Lyon (Figure 5.1.4). Aucun d'entre eux n'a donc été enterré. Les 24 crânes ont été choisis de telle manière à obtenir des âges au décès variés, une proportion quasi équivalente d'hommes et de femmes et un prélèvement d'une troisième molaire. Des informations telles que l'âge au décès, le sexe, la commune et le département de vie de l'individu ont été relevés lors de l'hospitalisation des individus. Un registre consigne également l'année de la mort des individus et parfois la cause du décès. Ces informations sont disponibles dans l'annexe C.

5.1.3 Collections du Musée d'Anatomie de Lyon

Quatre phalanges ou métacarpes nous ont été fournis par le Musée d'anatomie de Lyon. Si le sexe et l'âge au décès des individus sont inconnus, il s'agit toutefois d'ossements n'ayant jamais enterrés.

5.1.4 Échantillons actuels

Huit troisièmes molaires (M3, dents de sagesse) ont été collectées par des dentistes dans le cadre d'extractions motivées par des raisons médicales. Les volontaires ont répondu à un questionnaire permettant de recueillir des informations telles que le sexe, l'âge, le lieu de vie et l'âge des premières règles (Tableau 5.1).

Id	Sexe	Age	Ménarche	GS	Dpt	PM
E1	M	60	-	O+	76	?
E2	F	60	11	A+	76	?
E3	F	51	?	O+	76	M3
E4	M	45	-	?	76	?
E5	F	61	14	O+	76	?
E6	F	28	12	B+	76	?
E7	M	24	-	A+	69	DD
E8	F	47	13-14	?	69	DP

TABLE 5.1: Informations sur les individus dont proviennent les 8 troisièmes molaires actuelles. Id : code d'identification, GS : Groupe Sanguin, Dpt : Code du département de résidence, PM : plombage métallique, M3 : troisième molaire, DD : dent déciduale, DP : dent permanente .

5.2 Echantillons de sang

5.2.1 Volontaires de Viliouïsk

Au cours d'une mission en 2007 menée par Morgane Gibert, des prélèvements sanguins ont été réalisés sur 38 personnes à l'hôpital de Viliouïsk en Russie (République de Sakha, ancienne Yakoutie, Figure 5.2.1). Pour chacune d'entre elles, des données bioanthropologiques ont été répertoriées (Annexe B), notamment l'âge, le sexe, et le statut hormonal (ménopausée ou non).

5.2.2 Volontaires français de moins de 50 ans.

Au sein de mon réseau d'entourage, 12 personnes se sont portées volontaires pour des prélèvements sanguins. Des données physiologiques ont été recueillies pour ces personnes. Elles ont également répondu à un questionnaire alimentaire quantitatif permettant de définir un régime alimentaire de manière qualitative (Annexe C). Parmi ces volontaires, 6 personnes ont également fourni un à deux échantillons de sang menstruel.

5.2.3 Volontaires de l'Établissement français du sang

Les échantillons de Lyonnais d'âge supérieur à 50 ans nous ont été fournis par l'Établissement Français du Sang de Lyon, qui avait déjà fourni les échantillons pour l'étude de notre équipe publiée en 2011 [Albarède *et al.*, 2011]. Nous disposons ainsi de 19 échantillons de sang de femmes ménopausées et de 15 échantillons de sang d'hommes âgés de plus de 50 ans.

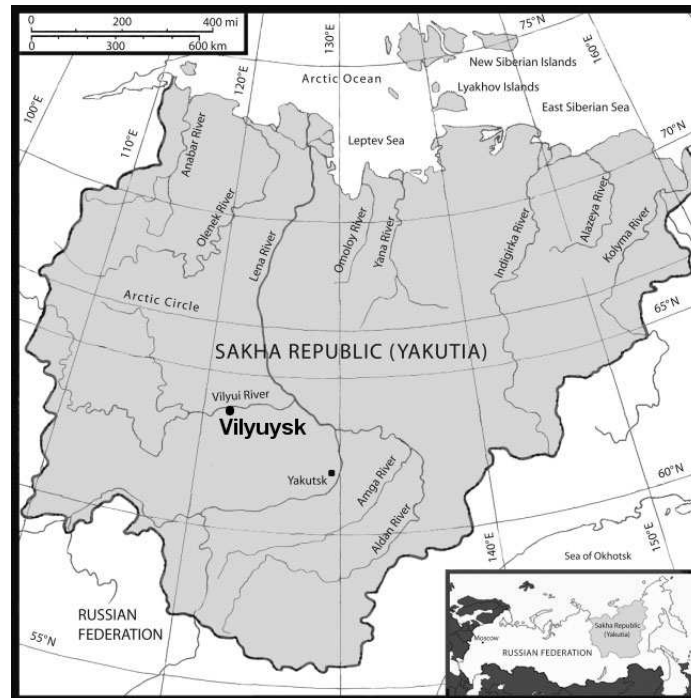


FIGURE 5.2.1: Localisation de Viliouïsk. Carte d'après Snodgrass et *al.*, 2005.

5.2.4 Grands singes de Parcs Zoologiques

Des vétérinaires de parc zoologique de la Palmyre et du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris nous ont fourni six échantillons de sang de grands singes accompagné d'informations résumées Tableau 5.2. Les prélèvements sanguins ont été réalisés lors d'anesthésies motivées par des raisons médicales (pauses d'implants, soin de blessures etc.). Ainsi, les animaux n'ont pas eu à subir une anesthésie supplémentaire liée à notre étude. Les volumes prélevés (<6 mL) sont mineurs en comparaison du volume sanguin total de ces grands singes. Il s'agissait en effet de Gorilles, Orangs-Outans et Chimpanzés. Ainsi, les prélèvements n'ont en théorie aucune conséquence sur le stress ou la santé des animaux. Les conditions exceptionnelles permettant le prélèvement expliquent la faiblesse du nombre d'échantillons recueillis au cours de cette thèse.

5.3 Échantillons de foies

Grâce à un accord avec les hôpitaux de Lyon, nous avons pu avoir accès à huit échantillons de foie ne présentant pas de pathologie. Ils ont été prélevés dans le cadre d'une biopsie motivée par des raisons médicales. Seul le sexe des donneurs a été renseigné. La préparation, la purification chimique et l'analyse isotopique des métaux des échantillons de foie ont été réalisées par Aline Lamboux.

Id	Nom vernaculaire	Nom scientifique	Sexe	Provenance	Age	Prélèvement	Traitement	Dernière MB
C1	Chimpanzé	Pan troglodytes	F	ZP	16	04/04/2011	Implant	17/03/2011
C2	Chimpanzé	Pan troglodytes	M	ZP	17,5	12/05/2011	GnRH	
G1	Gorille des plaines de l'Ouest	Gorilla gorilla gorilla	F	ZP	18	11/04/2011		25/06/2009
G2	Gorille des plaines de l'Ouest	Gorilla gorilla gorilla	M	ZP	21	13/05/2011		
O1	Orang outan de Bornéo	Pongo pygmaeus	M	MNHN		03/2011		
O2	Orang outan de Bornéo	Pongo pygmaeus	M	ZP	17,5	14/05/2011		

TABLE 5.2: Données physiologiques de six grands singes. ZP : Zoo de la Palmyre, MNHN Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, MB=mise à bas

5.4 Échantillons de sol

Notons pour finir qu'un échantillon de la terre du cloître de Saint-Laurent de Grenoble a été prélevé par Estelle Herrscher en 2011 lors d'une école d'été.

Chapitre 6

Protocole de prélèvement et préparation des échantillons

La nature variable des échantillons précédemment décrits nécessite de nombreux protocoles de prélèvement et de préparation des échantillons en vue d'une chromatographie sur colonnes. Nous nous attachons dans cette partie à décrire ces protocoles qui sont peu développés dans les articles des parties 3, 4 et 5.

6.1 Echantillons minéralisés

6.1.1 Cas des ossements

Le prélèvement de l'os est réalisé à l'aide d'une micro-perceuse équipée d'un disque à tronçonner. Pour les échantillons provenant du centre de conservation et d'étude des collections, nous avons choisi de réaliser des prélèvements osseux discrets en nous focalisant sur le condyle occipital (Figure 6.1.1).

Les phalanges des individus de Saint-Laurent de Grenoble ont déjà fait l'objet d'une étude isotopique et ne nécessitent pas de précautions particulières lors du prélèvement (Figure 6.1.2).

Les échantillons sont d'abord débarrassés des traces de sol à l'aide d'un scalpel. Pour les phalanges, seule la partie corticale de l'os est conservée. Ce nettoyage est affiné par l'utilisation d'une microperceuse équipée d'un foret diamanté sur toute la superficie de l'os. Le broyage se déroule sous hotte à flux laminaire dans un mortier en agate. Une fois réduit en poudre, les échantillons sont débarrassés d'éventuels carbonates secondaires. Cette étape de leaching consiste à agiter le broyat en présence d'acide acétique à 0,1 N pendant 30 min avant de le centrifuger et de le rincer trois fois à l'eau distillée. Les leaching sont ensuite mis à évaporer sur plaques chauffantes. Pour les ossements n'ayant pas été enterrés, on s'affranchit de l'étape de leaching. Les échantillons sont ensuite directement repris dans 1mL de HCl 7N + 0.001 % H₂O₂.

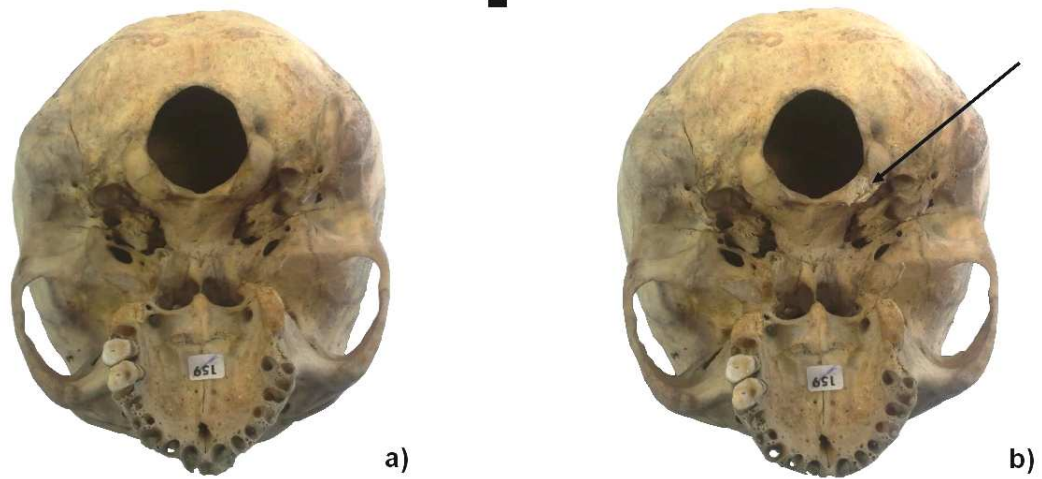


FIGURE 6.1.1: Face exocrânienne de l'individu M14. a) Avant prélèvement b) Après prélèvement. L'échelle vaut 1cm, la flèche indique la zone prélevée du condyle occipital.



FIGURE 6.1.2: Phalange de l'individu T06 de Saint-Laurent de Grenoble. L'échelle de 1 cm.

6.1.2 Cas de l'émail dentaire

Le prélèvement de l'émail dentaire a été réalisé par abrasion à l'aide d'une micro-perceuse équipée d'un foret diamanté. La poudre engendrée est récupérée sur du papier à peser. Elle est ensuite dissoute dans 1mL d'HCl 7N+0.001 % d'H₂O₂.

6.2 Echantillons sanguins

6.2.1 Prélèvements sanguins

La majorité des échantillons de sang ont été prélevés par seringue par des professionnels de la santé agréés. Pour les échantillons provenant du réseau d'entourage, certains ont été récupérés à l'aide d'une lancette. Elle est appliquée au bout d'un doigt dans lequel on aura pris soin de faire refluer le sang. Les gouttes de sang sont directement récupérées dans un tube. Pour tout ces prélèvements, les tubes utilisés contiennent un anticoagulant, l'héparine. Une étude préalable effectuée par Vincent Balter et Aurore Hutzler a permis d'établir que ces tubes ne contenaient pas de traces de Fe, Cu et Zn détectables. Ils peuvent donc être utilisés sans risque de contamination de l'échantillon.

Deux types de tubes ont servi au prélèvement (Figure 6.2.1).

- Les tubes « à bouchon bleu » contiennent de l'héparine et permettent donc de conserver le sang total sans coagulation. Cependant, l'héparine ne permet pas d'empêcher la lyse progressive des hématies.

Le sang des volontaires de Lyon de moins de 50 ans, de Viliouïsk et celui des grands singes ont été récupérés dans ce type de tube à l'exception de l'individu K.

- Les tubes « à bouchon vert » contiennent en plus de l'héparine un gel séparateur (Figure 6.2.1). Directement après le prélèvement, le tube peut être centrifugé pendant 5 min à 3000 tours/min. Les hématies migrent alors à travers le gel au fond du tube. Le plasma sanguin et les hématies sont ainsi séparés. En raison de la densité des cellules rouges et l'épaisseur du gel, il n'y a pas d'échanges ultérieurs entre les deux composants du sang. La centrifugation doit être réalisée rapidement après le prélèvement afin d'isoler le plasma des hématies avant qu'il ne soit contaminé par la lyse de celles-ci.

Le sang provenant de l'Etablissement français du sang a été récupéré dans ce type de tube ainsi que celui l'individu K.

6.2.2 Mise en solution des échantillons de sang

6.2.2.1 Dissolution du sang total et des hématies

500 μ L à 1mL de sang liquide ou 50mg d'hématies lyophilisées sont prélevés dans les tubes héparinés et placés dans des béchers (Savillex) d'une contenance de 7mL.

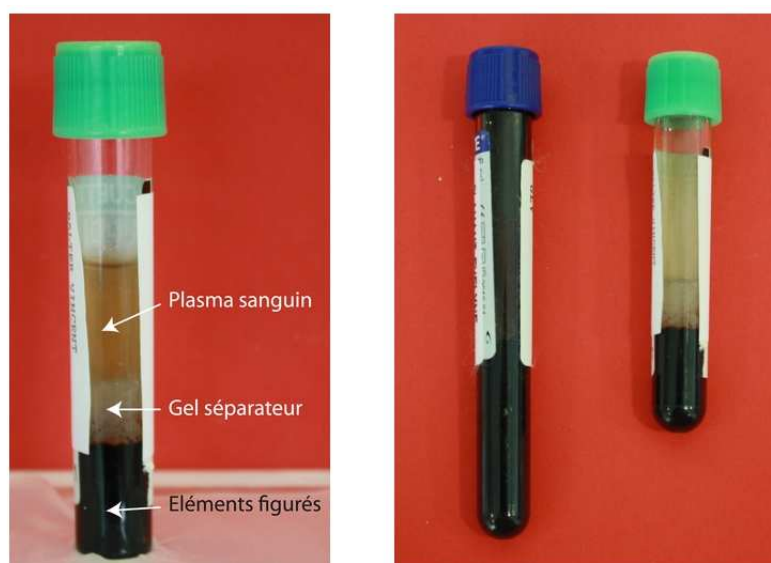


FIGURE 6.2.1: Tubes de prélèvement : Tube « à bouchon vert » avec gel séparateur (image de gauche) permettant de séparer les éléments figurés du plasma sanguin. Image de droite : à gauche, tube pour sang total (6mL), à droite, tube avec gel séparateur pour plasma sanguin et éléments figurés (4mL)

On ajoute alors 1mL d'acide nitrique concentré (HNO_3) et 10 à 20 L d' H_2O_2 à 30 %. Les béchers sont placés sur une plaque chauffante. Une fois l'échantillon dissous, il est évaporé. L'évaporation doit être particulièrement surveillée. Si le résidu est trop sec, il sera impossible à reprendre en HCl même concentré. Dès la disparition de la dernière goutte du mélange $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ on ajoute 1mL d'HCl 7N+0.001 % d' H_2O_2 . Les béchers sont alors placés successivement sur plaque chauffante et dans un bac d'ultrasons afin de redissoudre entièrement le résidu. Afin de faire disparaître des traces résiduelles d'acide nitrique, les échantillons sont à nouveau évaporés et repris en HCl 7N+0.001 % d' H_2O_2 .

6.2.2.2 Leaching des parois des tubes conservés depuis plus de trois ans

Pour certains échantillons conservés au réfrigérateur pendant une durée excédent trois ans, une amorce de coagulation du sang a été remarquée. Afin de s'assurer que cela n'engendre pas de fractionnement isotopique, un leaching des parois du tube a été opéré pour ces échantillons. Il s'agit alors de vider dans un premier temps le contenu du tube dans un bécher de 30 mL. On remplit le tube avec de l' HNO_3 4N et on place les tubes dans un bacs à ultra sons pendant un quart d'heure. Le contenu est alors versé dans le bécher de 30 mL. On rince enfin les parois du tube à l'eau distillée en récupérant cette eau et son contenu avec le reste de l'échantillon. La concentration de l'acide nitrique (4N) a été choisie car une concentration supérieure provoque un début de dissolution du gel et une concentration inférieure ne permet pas de décrocher toutes les traces de sang

du gel.

6.3 Endomètre

6.3.1 Prélèvement de sang menstruel



FIGURE 6.3.1: Coupes menstruelles : à gauche, version pour les nullipares, à droite, version pour les multipares. Image : Fleurcup®

Le sang menstruel a pu être récupéré à l'aide d'une coupe menstruelle (Figure 6.3.1) ou par récupération directe des écoulements dans des tubes.

6.3.2 Isolation des débris d'endomètre

Le sang est ensuite centrifugé à 1000 tours/min pendant 30 secondes afin d'isoler les débris d'endomètre du reste du sang sans provoquer la séparation des hématies et du serum. Le surnageant est éliminé et le tube est complété avec une solution de NaCl à 8 ‰. L'ajout de cette solution physiologique permet de ne pas provoquer la lyse des hématies. La centrifugation et l'élimination du surnageant est répétée plusieurs fois (de 8 à 10) jusqu'à la disparition de la coloration du surnageant. Les débris au fond du tube correspondent alors aux débris d'endomètre.

Le protocole d'attaque est alors identique à celui mis en place pour le sang.

6.4 Sol

L'échantillon de sol du cloître de l'église de Saint-Laurent de Grenoble est constitué principalement d'une matrice argilo calcaire.

6.4.1 Echantillon TSL1

60 mg de terre du cloître de Saint-Laurent de Grenoble ont été placés dans un bécher de 30 mL. On y a ajouté 20 gouttes d' HNO_3^c (environ 1mL) et 60 gouttes d' HF^c (environ 3mL). Le bécher a alors été placé sur une plaque à une température de 140°C pendant 72h. Une fois l'échantillon totalement dissous, il a été évaporé et repris en HCl 7N 0.001 % H_2O_2 . Pour cela, le bécher a été de nouveau placé sur une plaque chauffante à 130°C pendant 5h.

6.4.2 Echantillon TSL2

40 mg de terre du cloître de Saint-Laurent de Grenoble ont été placés dans un bécher de 6mL. 1mL d' HNO_3^c a été ajouté. Une fois la réaction de dissolution terminée, le contenu du bécher a été centrifugé et le surnageant prélevé. Ce surnageant est ensuite évaporé, et repris en HCl 7N+0.001 % H_2O_2 .

Chapitre 7

Protocole de séparation et purification

7.1 Protocole de séparation et purification des métaux de transition

La mesure d'un rapport isotopique dans un échantillon nécessite des étapes préalable d'extraction et purification des éléments d'intérêt. En effet, sans cela, de nombreuses interférences et effets de matrice rendraient impossible une analyse isotopique dans un spectromètre de masse à source plasma et à multicollecion (MC-ICP-MS).

L'obtention d'un rapport isotopique du fer, du cuivre et du zinc nécessite ainsi une première étape de préparation chimique réalisée dans une salle blanche par chromatographie sur résine échangeuse d'ions. Les protocoles de séparation sont réalisés dans une salle en légère surpression et sous atmosphère filtrée afin d'éviter la contamination des échantillons par les poussières du milieu extérieur. De plus, chaque étape de ces extractions/purifications se déroulent sous hotte, à flux laminaire durant les éluions et à reflux au cours des évaporations. Cette précaution supplémentaire évite les contaminations croisées entre échantillons.

7.1.1 Principe de la chromatographie sur résine échangeuse d'ions en phase liquide.

La chromatographie est une méthode de séparation de différents composants en fonction de leur affinité à l'égard d'une phase stationnaire et d'une phase mobile. Dans le cas de la chromatographie sur colonne, différentes espèces chimiques initialement présentes dans une phase liquide vont interagir de manière réversible avec la résine (phase stationnaire) présente dans la colonne. En fonction de leur coefficient de partage entre la solution liquide et la résine, les espèces chimiques vont migrer à des vitesses différentes et seront donc séparées les unes des autres. Les espèces chimiques auxquelles nous sommes intéressés sont des ions. Pour désigner la migration des ions le long d'une co-

lonne contenant de la résine lors du passage d'une solution aqueuse (éluant), on parle d'élution. L'affinité d'un ion pour la résine dépend de sa nature, du milieu (type d'acide, concentration, degré d'oxydation) et de la nature de la résine (capacité d'échange, degré de polymérisation, taille des grains de résine, etc.)

7.1.1.1 Résines échangeuses d'ions

Les résines échangeuses d'ions sont des polymères organiques de styrènes et divinylbenzènes. Ces polymères se présentent sous forme de sphères dont le diamètre fixe dépend du type de résine. Ils sont liés en surface à des groupements chargés : on trouvera par exemple le groupement NH_3^+ pour les résines anioniques et SO_3^- pour les cationiques. Afin d'assurer la neutralité de la résine, des contre-ions sont liés aux groupes fonctionnels (par exemple, Cl^- pour les résines anioniques et H^+ pour les cationiques). Ces ions seront échangés avec des ions de même charge lors du passage de la phase liquide sur la colonne.

Les résines ayant été utilisées au cours de ce travail de thèse sont les résines Biorad AG MP1 100-200 Mesh et Biorad AG1 X8 100-200 Mesh. « Mesh » désigne le « maillage » c'est-à-dire la taille des billes. Cette taille est ici comprise entre 150 et $75\mu\text{m}$. Ces deux résines sont de nature anionique et sont en forme chlorures. La résine macroporeuse AG MP1 présente des coefficients de distribution du Cu, Fe et Zn en milieu HCl plus élevés que ceux observés pour les résines anioniques classiques. Elle présente de larges pores et une structure fortement polymérisée. Sa porosité est de 20 %. Ces caractéristiques confèrent à la résine des propriétés particulières nécessitant des précautions supplémentaires lors de sa préparation. C'est une résine fragile, qui se compacte vite, avec des grains de résines plus en forme d'éclat que de billes. Nous avons donc suivi les recommandations de Maréchal (1998) concernant le lavage et la décompaction de cette résine.

7.1.1.2 Coefficient de distribution et volume d'élution

L'affinité d'un ion i pour la résine peut être caractérisée par le coefficient de distribution D_i

$$D_i = \frac{m_i^{\text{résine}}}{m_i^{\text{solution}}} \cdot 100$$

Ainsi, une valeur de coefficient de distribution élevée traduit une rétention importante de l'élément sur la résine. Le volume d'éluant nécessaire pour décrocher l'ion est proportionnel à ce coefficient de distribution, la relation liant les deux paramètres étant : $D_i = v_i - V/V$ où :

- v_i est le volume de rétention, c'est-à-dire le volume d'éluant pour lequel le maximum de l'élément est élué

- V est le volume interstitiel de la résine, c'est-à-dire le volume total de liquides dans ses pores pour une quantité donnée de résine

À l'aide des coefficients de distribution, on peut définir la normalité et la nature des éluants nécessaires pour séparer des éléments d'une matrice à l'aide de tables établies pour chaque résine. Un exemple de dépendance entre coefficient de distribution, nature et normalité des acides est donné figure 7.1.1 pour une résine anionique à base forte (Dowex).

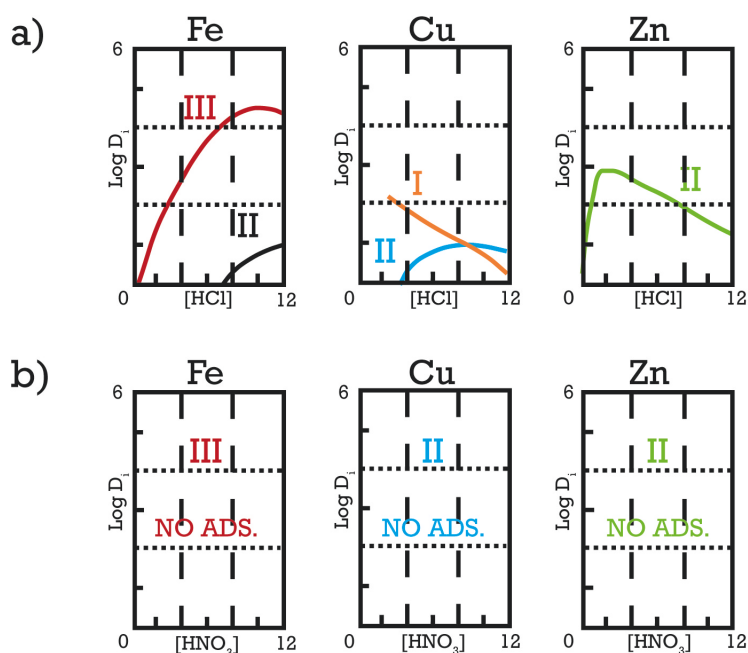


FIGURE 7.1.1: Coefficients de distribution du fer, cuivre et zinc sur résine échangeuse d'anions (base forte). a) pour des solutions d'acide chlorhydrique (modifié d'après Kraus et Nelson, 1958) b) pour les solutions d'acide nitrique (modifié d'après Faris et Buchanan, 1964).

7.1.1.3 Évaluation de la charge limite de la résine.

Les résines fixent les ions présents dans la phase liquide. Elles se saturent ainsi progressivement jusqu'à atteindre le maximum de leur capacité d'échange.

On peut définir la capacité totale d'un volume de résine comme le nombre de sites actifs où l'échange d'ions se produit. Cependant, cette capacité totale ne correspond pas à la capacité utile, c'est à dire le nombre de sites où l'échange s'est effectivement produit. Cette capacité utile représente également le nombre de charges électriques des ions fixés. On exprime donc la capacité d'échange en eq/L. La capacité utile est toujours inférieure à la capacité totale. En effet, lorsque l'échantillon est déposé sur la résine au sein de la colonne, les couches supérieures se saturent progressivement, mais la réaction d'échange

n'est pas instantanée. Certains ions circulent ainsi dans des couches de la résine plus basses alors que les couches supérieures ne sont pas saturées. Si le volume de résine est trop faible par rapport à la masse d'échantillon chargée, certains ions ne seront pas fixés. En général, la capacité utile d'une résine anionique se situe entre 70 et 90 %.

Pour chaque type d'échantillons (sang, émail dentaire et os), nous avons recherché dans la littérature les concentrations typiques en éléments majeurs formant des cations en solution. Ainsi, on a pu calculer la masse d'échantillon limite pouvant être chargée compte tenu de la capacité de la résine donnée par le fabricant et le volume de résine.

Les capacités des résines sont exprimées en mEq/ml. Il faut donc convertir les masses de cations par gramme d'échantillons en meq. Un équivalent correspond à la masse d'un cation pur se combinant à une mole d'ions hydroxyde. Elle est donc dépendante de la charge du cation. Un exemple de tableau de calcul est donné ci-dessous (Tableau 7.1) pour l'émail dentaire. Par précaution, nous avons aussi tenu compte des phosphates, molécules très abondantes dans les os et l'émail. En effet, même si ceux ci ne se fixent pas sur la résine, ils provoquent tout de même un encombrement autour des sites actifs.

Ion		Masse molaire	Masse cations	mEq
Si ²⁺	2	28.09	200	0.00057
Al ³⁺	3	26.98	60	0.00018
Fe ²⁺	2	55.85	120	0.00017
Mn ²⁺	2	54.94	30	0.00004
Ni ²⁺	2	58.69	0	0
Mg ²⁺	2	24.31	5600	0.01843
Ca ²⁺	2	40.08	440800	0.87984
Cr ³⁺	3	52.00	0	0
Na ⁺	1	22.90	4280	0.01497
K ⁺	1	39.10	0	0.00041
P ³⁻	3	30.97	230800	0.89428
Total meq	Avec phosphates			1.81
	Sans phosphates			0.91
Capacité utile/1.6mL				1.90

TABLE 7.1: Calcul de la charge maximale par mL de résine AG50W-X8 pour 40 mg d'émail dentaire.

On trouve ainsi un volume limite de 40 mg pour l'émail dentaire, 80 mg pour l'os et 200 mg pour le sang par 1.6 mL de résine, en prenant une capacité utile équivalent à 70 % de la capacité totale.

7.1.2 Extraction et purification des métaux de transition

7.1.2.1 Séparation Fe, Cu, Zn

La figure 7.1.1 montre l'affinité du fer, cuivre et zinc en milieu chlorhydrique et nitrique pour une résine anionique. On s'aperçoit qu'à des concentrations élevées en acide chlorhydrique, le zinc et le fer ont une affinité relativement forte avec la résine, alors qu'elle est faible pour le cuivre. À une concentration de HCl 2N, le fer est élué (Figure 7.1.2) quand l'affinité du zinc pour la résine augmente. Ce dernier élément n'a aucune affinité pour les sites actifs en milieu nitrique, tout comme le cuivre et le fer. Si les éléments se comportent de manière similaire pour toutes les résines anioniques, les valeurs numériques des coefficients de distribution dépendent du type de résine. Ainsi, une chimie de séparation de ces trois éléments peut être théorisée puis testée en tenant compte des coefficients de distributions propres à chaque résine (AG MP1, Van der Walt *et al.*, 1985). Pour l'essentiel des échantillons, le protocole de séparation des éléments est adapté à partir de celui de Maréchal *et al.* (1999). Le protocole a en effet dû être légèrement modifié. Pour les échantillons d'os et d'émail dentaire, il a été constaté une récupération incomplète du cuivre et le volume d'éluion du cuivre a donc été augmenté (Tableau 7.3). Il convient cependant de ne pas augmenter drastiquement ce volume sans quoi on voit apparaître du zinc dans les volumes de récupération du cuivre. Pour les échantillons de sang, du fer était parfois présent dans les fractions de zinc. Le volume d'éluion du fer a donc lui aussi été augmenté. La procédure adoptée pour ces échantillons est donnée dans le tableau 7.3.

7.1.2.2 Purification des métaux

Le protocole de purification du cuivre et du fer consiste simplement dans la répétition du protocole précédent. La difficulté majeure lors de cette étape est la reprise complète en solution du résidu de cuivre à purifier. L'échantillon ne peut en effet être correctement repris si le résidu est totalement sec. La fin de l'évaporation doit donc être précautionneusement surveillée. Pour le zinc, un protocole adapté de Moynier *et al.* (2006) a été choisi étant donné qu'il est moins coûteux en volume d'acide et en temps (Tableau 7.4). L'échantillon y est dilué dans 1mL d'HBr 1,5N, avant d'être évaporé à sec et à nouveau repris dans 1mL d'HBr 1,5N. L'étape de dilution/évaporation permet d'éliminer toute trace de zinc sous la forme $Zn(NO_3)_2$. Le zinc est alors sous forme $ZnBr_4^{2-}$. La solution est chargée sur une colonne de polypropylène BioRad contenant 1mL de résine anionique AG1 X8 100-200 Mesh. La résine aura été préalablement nettoyée par un lavage alternant eau distillée et acide nitrique à 0,5N puis conditionnée en HBr 1,5N. Le zinc a une très grande affinité pour la résine AG1 X8 ($D_{ZnBr_4^{2-}} \gg \gg 1$) en milieu bromhydrique. Il n'est donc pas élué lors de l'ajout d'HBr 1,5N, au contraire des éléments majeurs (Calcium, sodium, potassium, fer) et ceux risquant d'engendrer des interférences lors des analyses spectrométriques (Cu, Ni). Le zinc sera par la suite élué en HNO_3 0,5N, le $Zn(NO_3)_2$ n'ayant aucune affinité pour la résine en milieu nitrique. (Figure 7.1.1)

Etape	Eluant	Protocole ajusté	Protocole Maréchal (1998)
		Volume mL	Volume mL
Remobilisation des colonnes	H ₂ O		
Oxydation de l'échantillon	H ₂ O ₂	0.01	0.01
Lavage	HNO ₃ 0.5N	7	7
	H ₂ O	3	3
	HNO ₃ 0.5N	7	7
	H ₂ O	3	3
	HNO ₃ 0.5N	7	7
	H ₂ O	3	3
Conditionnement	HCl 7N+0.001 % H ₂ O ₂	7	7
Prélèvement d'un aliquot	HCl 7N+0.001 % H ₂ O ₂	0.05	0.05
Chargement	HCl 7N+0.001 % H ₂ O ₂	1	1
Elution de la matrice	HCl 7N+0.001 % H ₂ O ₂	9	9
Elution du cuivre	HCl 7N+0.001 % H ₂ O ₂	25	25
Elution du fer	HCl 2N+0.001 % H ₂ O ₂	12	12
Elution du zinc	HNO ₃ 0.5N	12	12

TABLE 7.2: Protocole d'éluion du cuivre, fer et zinc dans le cas d'échantillons d'os et d'émail dentaire

Etape	Eluant	Protocole ajusté	Protocole Maréchal (1998)
		Volume mL	Volume mL
Remobilisation des colonnes	H ₂ O		
Oxydation de l'échantillon	H ₂ O ₂	0.01	0.01
Lavage	HNO ₃ 0.5N	7	7
	H ₂ O	3	3
	HNO ₃ 0.5N	7	7
	H ₂ O	3	3
	HNO ₃ 0.5N	7	7
	H ₂ O	3	3
Conditionnement	HCl 7N+0.001 % H ₂ O ₂	7	7
Prélèvement d'un aliquot	HCl 7N+0.001 % H ₂ O ₂	0.05	0.05
Chargement	HCl 7N+0.001 % H ₂ O ₂	1	1
Elution de la matrice	HCl 7N+0.001 % H ₂ O ₂	10	9
Elution du cuivre	HCl 7N+0.001 % H ₂ O ₂	20	25
Elution du fer	HCl 2N+0.001 % H ₂ O ₂	13	12
Elution du zinc	HNO ₃ 0.5N	10	12

TABLE 7.3: Protocole d'éluion du cuivre, fer et zinc dans le cas d'échantillons de sang

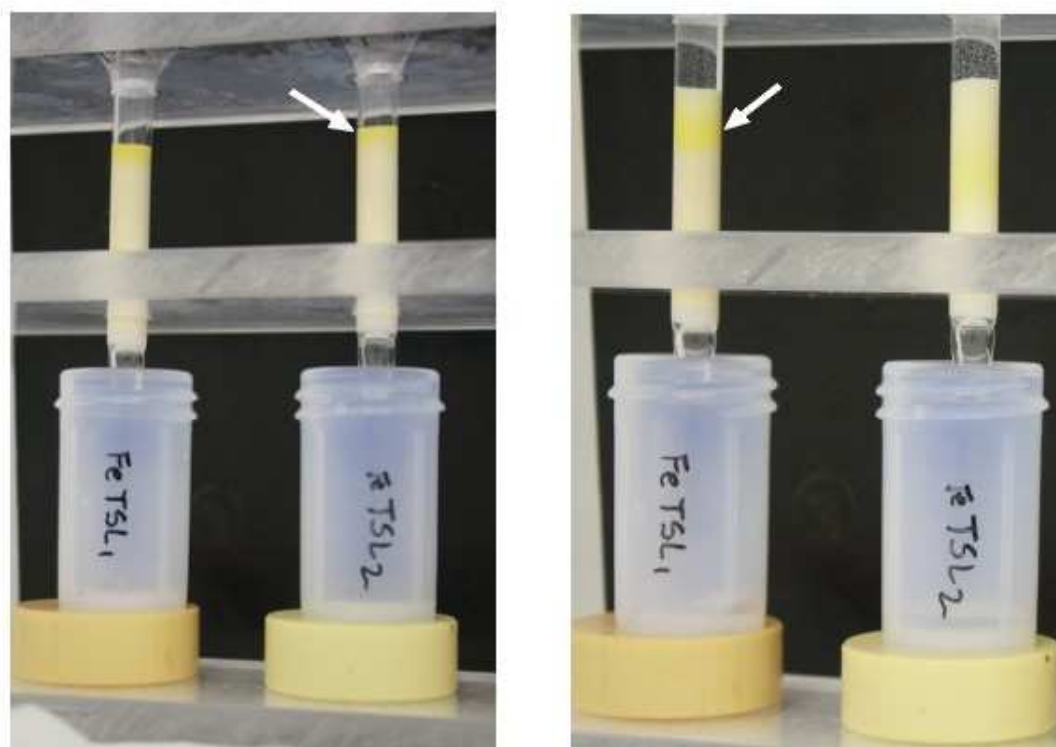


FIGURE 7.1.2: Elution du fer : Dans ces échantillons particulièrement concentrés en fer, on peut suivre la progression des ions de fer. a) Le fer (indiqué par une flèche), après le chargement de l'échantillon en milieu chlorhydrique concentré, reste accroché dans les couches supérieures de la résine. b) Lors de l'ajout d'HCl 2N, le fer perd son affinité pour les sites actifs de la résine. La flèche indique la progression du fer, en jaune intense.

Volume de résiné	Etape	Eluant	Protocole ajusté	
			1mL	0.5mL
			Volume mL	Volume mL
Remobilisation des colonnes		H ₂ O		
Lavage		HNO ₃ 0.5N	5	2.5
		H ₂ O	5	2.5
		HNO ₃ 0.5N	5	2.5
		H ₂ O	5	2.5
Conditionnement		HBr 1.5 N	3	1.5
Chargement		HBr 1.5 N	1	0.5
Elution de la matrice		HBr 1.5 N	2	1
Elution du zinc		HNO ₃ 0.5N	5	2.5

TABLE 7.4: Protocole de purification du zinc

7.1.2.3 Mesure des rendements de chimie

Les protocoles de séparation ont été calibrés de telle manière à ce que 100 % du fer, du cuivre et du zinc contenu dans l'échantillon chargé puissent être récupéré à la sortie de la colonne. Il arrive cependant que cette récupération complète échoue (titrateur défectueux engendrant une mauvaise évaluation de la normalité des acides, colonnes surchargées etc...). Cette récupération incomplète génère des fractionnements isotopiques car les isotopes lourds et légers de chaque élément ont des affinités variables pour la résine de la colonne. Ainsi, dans le cas du cuivre, les isotopes lourds ont tendance à être élués plus rapidement que les légers. Il convient donc de vérifier pour chaque échantillon la concentration en fer, cuivre, et zinc dans l'aliquote prélevé avant le chargement et celui prélevé dans la solution purifiée à l'aide d'un spectromètre de masse permettant des analyses élémentaires (Q-ICP-MS). Soit r le rendement, $M_{initial}$ la masse de l'élément présente dans l'échantillon, M_{final} la masse de l'élément récupérée après le passage de l'échantillon sur la colonne, il suffit alors d'évaluer

$$r = \frac{M_{final}}{M_{initial}} * 100$$

7.2 Protocole de séparation et purification des éléments légers

Pour l'analyse des isotopes du carbone et de l'azote, l'échantillon est introduit sous forme gazeuse. Pour les mêmes raisons qu'en spectrométrie à source plasma, les espèces chimiques désirées (ici N_2 et CO_2) doivent être préalablement purifiées. On utilise alors

un analyseur élémentaire (Elementar Vario PYRO cube) en mode « Purge and Trap » permettant de séparer l'azote et le dioxyde de carbone (sous forme gazeuse) issus des échantillons suite à une combustion, une réduction puis un piégeage.

Environ 300 mg d'échantillons sont placés dans des capsules d'étain. Les capsules sont ensuite fermées et déformées en sphère. Une fois chargées sur le carrousel, le transfert vers le tube de combustion est automatisé. Les échantillons sont nettoyés à l'aide d'un gaz inerte afin d'éliminer les traces d'azote atmosphérique. Ils subissent ensuite une combustion catalytique suivie d'une réduction par du cuivre dans un second four. Le four de combustion fonctionne à 1150°C et le four de réduction à 850°C. Les gaz formés (N_2 , CO_2 , H_2O , SO_2) sont alors intégrés au courant porteur d'hélium. Le CO_2 et le SO_2 sont alors piégés à température ambiante sur des colonnes (trap) qui leur sont spécifiques tandis que le N_2 se dirige vers le détecteur TCD. Le piège à eau est constitué de "sica-pant". Le « piège » est ensuite chauffé et le CO_2 libéré. Les mesures $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ sont faites de manière simultanée sur la même aliquote d'échantillon. Un système de dilution du pic de CO_2 est alors utilisé.

L'analyseur élémentaire possède aussi un détecteur électrique de type TCD, permettant l'évaluation des concentrations en carbone et en azote contenues dans les échantillons. Ce type de détecteur est basé sur le principe du pont de Wheatstone. Le passage des espèces chimiques provoque une variation de la tension liée à la différence de conductibilité entre les gaz.

Chapitre 8

Analyses spectrométriques

8.1 Principe des analyses spectrométriques

- La spectroscopie est l'étude des systèmes physiques grâce au rayonnement électromagnétique avec lesquels ils interagissent ou qu'ils produisent.
- La spectrométrie est la mesure de ces radiations comme un moyen d'obtenir des informations sur les systèmes et leurs composants.
- La spectrométrie de masse est la branche de la science qui traite de tous les aspects des spectromètres de masse et des résultats obtenus avec ces instruments. Elle s'intéresse au rapport m/z ¹, à la place des ondes électromagnétiques.
- La spectrométrie d'émission optique (AES pour atomic emission spectrometry) et de masse (MS pour mass spectrometry) sont des techniques d'analyse permettant d'identifier des molécules, éléments ou atomes. Le principe général de la spectrométrie optique repose sur l'intensité d'une émission chimique à une longueur d'onde donnée.

Il existe beaucoup de types de spectromètres de masse qui diffèrent en fonction de leur système d'introduction de l'échantillon, source d'ionisation, de l'analyseur et des détecteurs. Au cours de cette thèse, les instruments de mesures sont des spectromètres de masse à rapports isotopiques (IRMS) et à source plasma également équipés de quadripôle (Q-ICP-MS) ou de multicollection (MC-ICP-MS). Il a également été utilisé un spectromètre d'émission optique à source plasma (ICP-AES). Dans ce chapitre, nous décrirons le principe de fonctionnement de ces différents spectromètres. Pour cela, nous détaillerons les dispositifs permettant les analyses élémentaires et isotopiques à partir de l'introduction de l'échantillon jusqu'à la détection de ses constituants.

1. m désigne la masse d'un ion, z la charge

8.1.1 Système d'introduction de l'échantillon

Les échantillons peuvent être introduits dans le spectromètre de masse sous forme gazeuse, liquide ou solide. Les analyses élémentaires et isotopiques ont été réalisées avec des systèmes d'introduction des échantillons dissous en phase liquide dans le cas des métaux de transitions.

- En phase liquide, l'échantillon est dilué dans une solution acide pour les analyses élémentaires (HNO_3 0.5N) à légèrement acide pour les analyses isotopiques (HNO_3 0.05N). Le choix d'une faible acidité en isotopie est liée à la volonté de ne pas « décrocher » des polluants au sein de la machine².

- Le système d'introduction des gaz est à flux continu, le spectromètre de masse à rapport isotopique (IRMS) étant directement connecté à l'analyseur élémentaire. Les gaz s'écoulent ensuite dans de longs capillaires supportant des pressions élevées. Ainsi, un flux laminaire de gaz est créé sans risque de rétro diffusion et de fractionnement isotopique diffusif.

8.1.2 Source d'ionisation

8.1.2.1 Par torche à plasma

Les spectromètres de masse et d'émission optique du parc analytique du laboratoire de Géologie de Lyon du site de l'ENS Lyon utilisent comme source d'ionisation le couplage plasma inductif (ICP). Le principe de la méthode repose sur l'injection d'un aérosol dans un plasma afin d'obtenir une ionisation optimale. Cet aérosol est généré, pour les spectromètres de masse utilisés au cours de ce travail de thèse, par un nébuliseur. La nébullisation repose sur le principe de l'effet Venturi avec une injection sous pression par un orifice étroit. Cela permet de plus une aspiration passive. L'aérosol est ensuite transmis dans la chambre de nébullisation permettant l'homogénéisation de l'aérosol. Les gouttelettes formées, de dimension d'une dizaine de micromètres, arrivent ensuite à la torche³, transportées par un flux de gaz inerte (argon). Le plasma, d'une température comprise entre 6000 et 10 000 K selon le type de spectromètre de masse, vaporise ensuite et ionise les atomes contenus dans les gouttelettes.

8.1.2.2 Electronique

Dans le cas des spectromètres de masse à rapport isotopique et à source gazeuse, un filament de rhénium chauffé à une température de 2400°C produit un flux d'électrons avec une énergie de 90eV. Les collisions entre les électrons émis par le filament et les molécules entrant dans la source crée des ions. En effet, lors de la rencontre, si l'énergie cinétique des électrons est suffisante, un électron est arraché de la molécule, la transformant en

2. Notons que parler d'une légère acidité pour une concentration de 0.05N est très relatif, étant donné qu'elle correspond à un pH de 1.3

3. La torche est la pièce de silice dans laquelle se trouve le plasma.

un cation. L'énergie du premier potentiel d'ionisation est faible comparée à celle du flux d'électrons (13,77eV pour le CO_2). Selon l'énergie interne de l'ion, une fragmentation de l'espèce chimique peut avoir lieu. Afin d'augmenter la probabilité de rencontre des molécules et des électrons, un champ magnétique est créé autour de la cage et produit un déplacement des électrons en spirale. Le rendement d'ionisation de ces sources reste cependant assez faible (1 molécule sur 1000).

8.1.3 Accélération et focalisation des ions en spectrométrie de masse

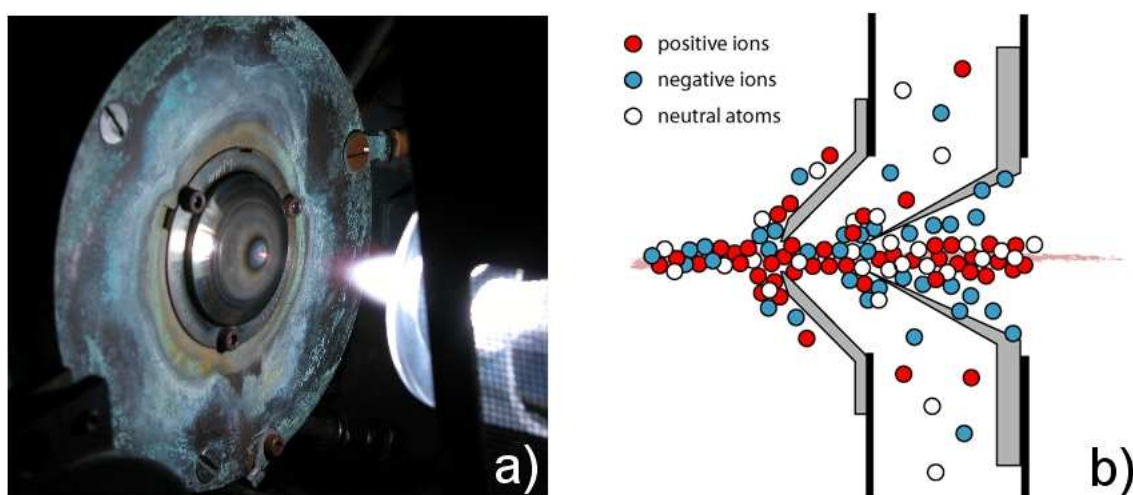


FIGURE 8.1.1: Interface entre la source et l'analyseur a) Photographie de la transmission entre un plasma et le skimmer cone b) Sélection en ions opérées au niveau des cônes

Avant de parvenir à l'analyseur, les ions doivent être sélectionnés, accélérés et focalisés. Ils doivent également passer du secteur à pression atmosphérique à celui de l'analyseur à très basse pression. Pour cela, un vide primaire est effectué entre deux cônes en nickel sous haute tension (sampler et skimmer cones, Figure 8.1.1) par une pompe rotative. Les cônes permettent également l'élimination des ions provenant d'éléments non destinées à être analysés. En effet, malgré la purification chimique réalisée au préalable, la solution ionisée contient toujours d'autres éléments que celui d'intérêt à l'état de traces. Cette élimination résulte simplement du diamètre des orifices des cônes (environ 1mm) qui permet de sélectionner la portion centrale du faisceau ionique provenant de la torche. L'accélération et la focalisation est permise par la mise sous tension des cônes et d'un jeu de lentilles.

8.1.4 Analyseurs

Le type d'analyseur présent dans un spectromètre de masse est crucial pour le niveau d'analyse souhaité (analyses moléculaires, élémentaires, isotopiques etc.). Si chacun d'entre eux permet une séparation des ions du faisceau en fonction du rapport m/z , les méthodes pour cette séparation et leurs efficacités sont variable. Au cours de ce travail de thèse, trois types d'analyseurs ont été utilisés en couplage à une torche à plasma :

8.1.4.1 Analyseur optique

Dans le cas de la spectrométrie optique, ce n'est pas le faisceau ionique produit par le plasma qui est analysé mais la lumière sortant du plasma. En effet, les atomes ionisés, en retournant à leur état fondamental, émettent un photon dont l'énergie est caractéristique de l'élément. Par la constante de Planck, on peut ainsi analyser les longueurs d'onde à l'aide d'un polychromateur et en déduire les éléments présents. L'intensité de la lumière est mesurée et comparée à celle émise par un étalon, c'est à dire un élément de concentration connue analyser dans les mêmes conditions. Les limites de cette méthode sont liées à la proximité de certains raies lumineuses. L'ICP-AES du parc analytique du laboratoire de Géologie de Lyon permet ainsi l'analyse d'éléments d'une concentration comprise allant de quelques ppm à plusieurs milliers de ppm.

8.1.4.2 Analyseur à quadripôle

La séparation des ions dans les Q-ICP-MS est assurée par un quadripôle, c'est à dire 4 électrodes constituées de barres cylindriques séparées en deux paires et soumises à des tensions continues et alternatives. La tension dans les électrodes adjacentes est de même potentiel et de signe opposé. Les électrodes opposées sont portées à des potentiels identiques. Dans le plan formé par la paire positive, les ions trop légers sont déviés et heurtent les barres. L'ion de l'élément d'intérêt et ceux ayant une masse supérieure restent entre les barres. Dans le plan de la paire négative, ce sont les ions lourds qui sont déviés. En combinant ces deux plans, seuls les ions ayant le rapport masse/charge désiré sont transmis au détecteur. L'analyseur quadripolaire permet une séparation élémentaire efficace et une détection des éléments traces (jusqu'à une centaine de ppt).

8.1.4.3 Analyseur à secteur électromagnétique

Sur les MC-ICP-MS, le principe de double focalisation est utilisé. Ainsi, les ions sont séparés au sein d'un secteur électrostatique puis magnétique (Figure 8.1.2). Le secteur électrostatique permet la sélection des ions en fonction de leur énergie cinétique. En effet, le rayon de trajectoire d'un ion est proportionnel à son énergie cinétique dans un champ électrostatique radial E , $R = \frac{2Ec}{qE}$. Les ions sont ainsi déviés et seuls ceux de même énergie sortent du secteur.

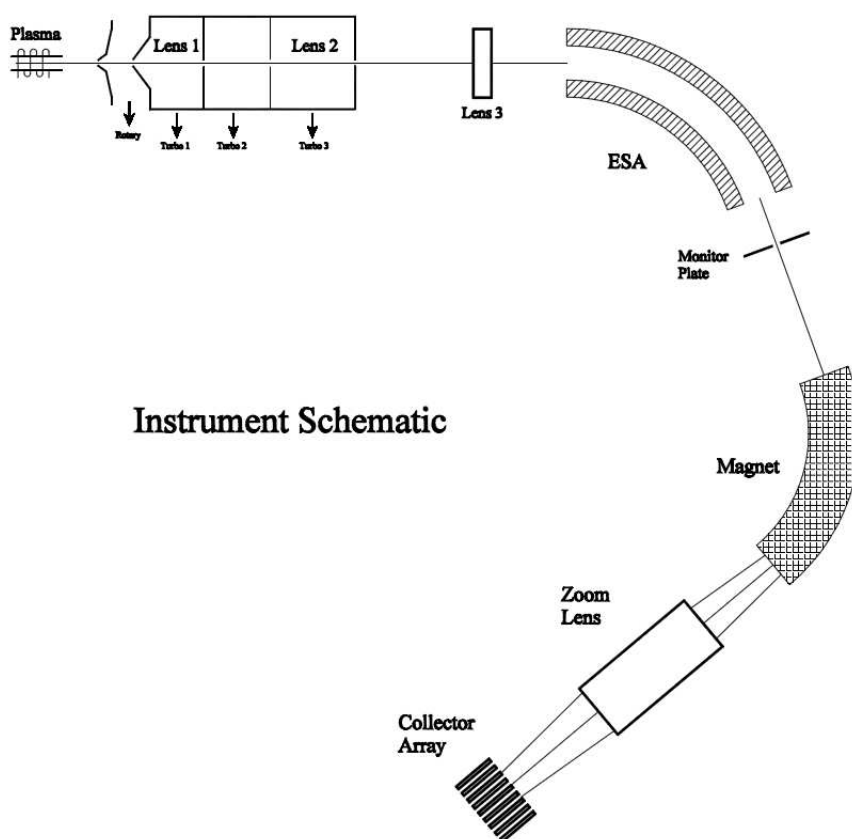


FIGURE 8.1.2: Schéma de l'organisation d'un MC ICP MS Nu1700 disposant d'un secteur électrostatique et magnétique

Les ions pénètrent ensuite dans un champ magnétique de vecteur B perpendiculaire à la vitesse V . Le mouvement des ions suit alors une trajectoire de rayon R tel que

$$R = \sqrt{\frac{2Um}{qB^2}}$$

Ainsi, dans le secteur magnétique, les ions de m/q sont triés selon des trajectoires de rayons différents. Les ions sont alors collectés dans les cages dont la position et la largeur sont préalablement paramétrées.

L'analyseur présent dans les spectromètres de masse à rapport isotopique (IRMS, Isotope Ratio Mass Spectrometer) destinés à l'analyse des rapports isotopiques des éléments légers est simplement composé de la partie magnétique. (Figure 8.1.2).

8.1.5 Détecteurs

Les détecteurs sont également de nature variable. Si le principe de détection varie, ils permettent tous une quantification des ions dans un milieu sous vide.

Les MC-ICP-MS utilisés à Lyon sont équipés de cages de Faraday dont la position de certaines d'entre elles peut être ajustée. Au sein d'une cage de Faraday, trois multiplicateurs de comptage d'ions sont présents. Chaque collecteur présente une fente dont la largeur et la position centrale peuvent être modifiées. Le Q-ICP-MS Agilent 7500x est équipé de multiplicateurs d'électrons, plus sensibles que des cages de Faraday mais moins précis. Les détecteurs présents dans les IRMS sont également des cages de Faraday.

8.2 Mesures élémentaires

8.2.1 Intérêt des mesures élémentaires

Ce travail de thèse se concentre sur l'analyse et l'interprétation de rapports d'isotopes stables dans divers échantillons. Cependant, l'évaluation préalable des concentrations élémentaires est nécessaire pour diverses raisons :

- L'évaluation des concentrations en métaux de transition des aliquotes prélevés dans un échantillon avant et après son passage sur une résine permet de déterminer l'efficacité de la chimie (voire paragraphe 7.1.2.3).

- Ces mêmes analyses permettent de déterminer les dilutions nécessaires à effectuer à partir des échantillons purifiés pour pouvoir réaliser les analyses spectrométriques. En effet, si l'élément à analyser est trop concentré dans la solution destinée à la mesure isotopique, les collecteurs des spectromètres de masse sont saturés. À l'inverse, une concentration trop proche ou en dessous des limites de détection ne donne pas de résultats fiables.

- Enfin, l'analyse élémentaire permet la comparaison des concentrations des éléments d'un échantillon analysé à celles répertoriées dans la littérature et aux résultats isotopiques. On peut ainsi déterminer en cas de concentrations inhabituelles une éventuelle contamination (cf paragraphe 7.1.2.3).

8.2.2 Majeurs

Le spectromètre destiné à l'analyse des éléments majeurs d'un échantillon au sein du laboratoire de Géologie de Lyon est un spectromètre à émission optique et à ionisation plasma (ICP-AES, iCAP 6000 Radial). Les éléments analysés avec ce spectromètre sont le calcium, le phosphate et le strontium des ossements à des concentrations comprises entre 1 et 20 ppm. Les solutions n'ont pas été plus concentrées afin d'éviter la saturation des détecteurs des raies du calcium. Le standard interne utilisé est le scandium. Régulièrement, des blancs d'analyses et des échantillons contenant des solutions de standard de concentration connue sont intercalés dans la séquence afin de vérifier l'absence de pollution de la machine et de dérive instrumentale.

8.2.3 Eléments traces

Le spectromètre utilisé au sein du laboratoire de Géologie de Lyon pour l'analyse d'éléments traces est le spectromètre de masse à quadripôle (Q-ICP-MS) Agilent 7500 CX. La limite de détection pour la plupart des éléments se situe autour de 0.1 ppb. Les gammes étalons ont à chaque fois été adaptées aux types d'échantillons et d'éléments analysés. L'Agilent a permis à la fois l'évaluation des concentrations en fer, cuivre et zinc dans les échantillons mais également la vérification de l'efficacité des chimies en mesurant les éléments majeurs dans l'échantillon de départ dans les solutions post-chimie.

Les dilutions effectuées sont réalisées pour que les éléments d'intérêt soient présents pour des concentrations comprises entre 0,1 et 150 ppb. On prend également soin à ce que les éléments majeurs ne dépassent pas 100 ppm en concentration afin de ne pas polluer la machine. Pour les échantillons d'os et d'email dentaire, qui contiennent 40 % de calcium, on prend soin de ne pas dépasser 30 ppm. Le calcium est en effet un élément qui a tendance à obstruer l'orifice des cônes. Le standard interne utilisé est l'indium. Les gammes étalons sont réalisées à partir des solutions mono élémentaires ou multiélémentaires commerciales selon les gammes étalons nécessaires pour chaque élément au cours d'une analyse. Comme pour les analyses à l'ICAP, des blancs d'analyse et des solutions standards sont intercalés de manière à vérifier l'absence de pollution et de dérive instrumentale. Les détecteurs traduisent des nombres de coups par isotopes. Le logiciel recalcule la concentration de chaque élément à partir des abondances naturelles des isotopes. On a donc accès à des concentrations élémentaires déterminées à partir de l'analyse de chaque isotope. Les concentrations les plus fiables sont naturellement celles calculées à partir de l'isotope majeur.

L'analyse du fer nécessite l'utilisation d'une cellule de collision afin d'éviter l'interférence polyatomique ArO avec l'isotope majeur du fer, le ^{56}Fe . Au sein de la cellule de collision, l'utilisation d'hélium permet en effet de briser les liaisons moléculaires. Le plasma étant fait d'Argon, l'analyse du fer est très peu précise sur cette machine sans cellule de collision même en utilisant les autres isotopes.

Les limites de ces analyses sont que les résultats ne sont pas parfaitement reproduc-

tibles, surtout pour de faibles concentrations. La gamme optimale d'analyse se situe entre 1 et 50 ppb quand les concentrations mesurées pour le cuivre avoisinent souvent les 0.1 ppb et celles de fer excèdent les 100 ppb.

8.3 Mesures isotopiques

Les mesures isotopiques ont été réalisées sur trois instruments différents : un IRMS pour le carbone et l'azote et deux MC-ICP-MS pour les métaux de transitions.

8.3.1 Analyse isotopique des éléments légers

La mesure isotopique du carbone et de l'azote est réalisée par un spectromètre de masse à rapport isotopique à source gazeuse (IRMS Isoprime). Ce spectromètre est couplé à un analyseur élémentaire en flux continu comme précisé paragraphe 7.2. La mesure d'un rapport isotopique d'un échantillon se réalise donc en une fois au contraire de la double injection et chaque échantillon est analysé trois fois. Tous les cinq échantillons, le standard de référence est analysé afin de vérifier l'absence de dérive instrumentale.

8.3.2 Analyse isotopique des métaux de transition

L'analyse des rapports du cuivre et du zinc sont réalisés par des spectromètres de masse à multicollection et à source plasma. Les deux spectromètres de masse fonctionnent de manière très similaire (Figure 8.3.1), ils diffèrent uniquement l'un de l'autre par leur géométrie, leur nombre fentes et collecteurs et la puissance de leur aimant. Les plasmas sont constitués d'argon (Ar). Ce type d'instrument est sensible à une dérive instrumentale. Ainsi, les rapports bruts présentent une variabilité au cours du temps. Celle-ci est liée à des paramètres tels que l'instabilité dynamique du plasma, les variations de température et d'hygrométrie. Si la température et l'hygrométrie sont contrôlées, il reste à corriger l'instabilité du plasma. Pour ce faire, un standard isotopique est analysé très régulièrement entre les échantillons (*standard sample bracketing*)

8.3.2.1 Cuivre et Zinc

La mesure des isotopes stables du cuivre et du zinc est réalisée à l'aide du MC-ICP-MS Nu 500 (Figure 8.3.1). Les échantillons sont mis en solution à une concentration autour de 300 ppb. Notons toutefois que beaucoup d'échantillons sont très pauvres en cuivre, en particulier l'émail dentaire. Ces échantillons purifiés ne sont donc pas dilués pour la mesure isotopique. Certains contiennent un niveau de cuivre insuffisant pour obtenir un résultat robuste, voire en dessous des limites de détection. La mesure isotopique semble être fiable à partir d'un voltage en cuivre total de 1 volt. Le spectromètre est configuré en basse résolution et n'est pas couplé à un système de désolvatation qui engendre

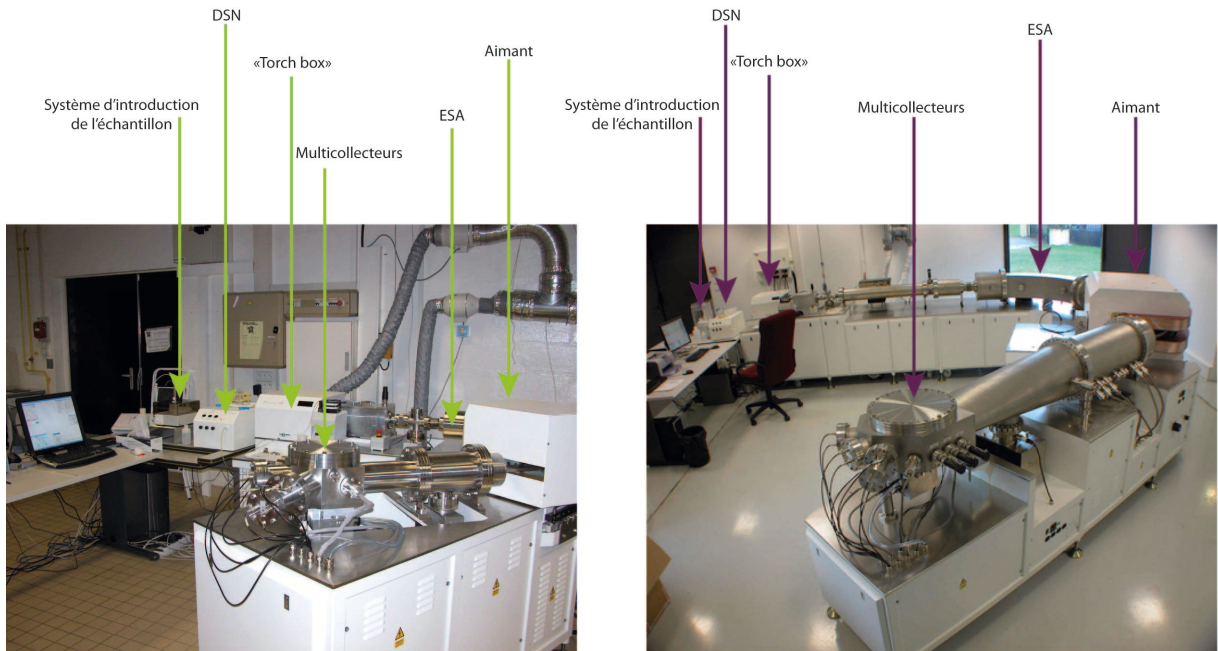


FIGURE 8.3.1: Organisation d'un Nu 500 (à gauche) et Nu 1700 (à droite). Photographie : Philippe Telouk. DSN = Desolvating nebuliser system. ESA=Electrostatic analyser

un fractionnement isotopique du cuivre et du zinc lié à la membrane de désolvation. L'analyse d'un échantillon comprend 30 mesures et un centrage du pic est réalisé avant le démarrage de ce bloc.

Corrections de la dérive instrumentale et du standard d'analyse

Comme précisé plus haut, la correction de la dérive instrumentale est réalisée par standard bracketing. Tous les deux échantillons, les standard isotopiques du zinc (JMC 3-0749-L) et du cuivre (NIST 976) sont analysés. Le standard du zinc ayant été épuisé en 2011, un nouveau standard préalablement calibré a ensuite été utilisé.

Le calcul du delta du zinc avec le nouveau standard (pour un échantillon passant immédiatement après un standard (standard 1) et suivi d'un autre échantillon puis d'un autre standard (standard2) s'écrit donc :

$$\delta^{66}\text{Zn} = \left(\frac{\left(\frac{^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}}{^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}} \right)_{ech}}{\frac{2}{3} \left(\frac{^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}}{^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}} \right)_{std1} - \frac{2}{3} \left(\frac{^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}}{^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}} \right)_{std2}} - 1 \right) \cdot 1000 + \Delta_{stdJMC}$$

ou Δ_{stdJMC} est la différence mesurée entre l'ancien et le nouveau standard.

Corrections du fractionnement instrumental

L'ionisation diffère entre les isotopes lourds et légers au sein d'un plasma ce qui engendre un fractionnement isotopique. Une solution pour corriger ce fractionnement est d'utiliser un « spike » ; pour cela, on ajoute à l'échantillon une solution d'un élément n'étant pas celui d'intérêt et dont la composition isotopique est connue. En mesurant simultanément la composition isotopique de l'élément d'intérêt et de celui du spike, on peut connaître la valeur du fractionnement instrumental affectant les deux éléments (Maréchal *et al.*, 1998). Elle sera en effet identique entre les deux à un facteur de fractionnement près. L'élément choisi en tant que spike doit être d'une masse proche de celle de l'élément d'intérêt afin de pouvoir être mesuré en même temps. Il ne doit pas non plus posséder d'isotopes risquant d'interagir avec ceux de l'élément d'intérêt. Enfin, afin de pouvoir mesurer un fractionnement, l'élément doit posséder au moins deux isotopes stables. Ainsi, dans le cas du cuivre, l'élément de spike est le zinc. A l'inverse, le cuivre est utilisé comme standard lors des mesures du zinc.

On a donc

$$\left({}^{66}\text{Zn}/{}^{64}\text{Zn} \right)_{\text{réel}} = \left({}^{66}\text{Zn}/{}^{64}\text{Zn} \right)_{\text{mesuré}} \cdot \left(\frac{M_{66}}{M_{64}} \right)^{f_{\text{Zn}}}$$

où M_{66} est la masse de l'isotope ${}^{66}\text{Zn}$ et f_{Zn} le facteur de fractionnement.

Et

$$\frac{\ln\left({}^{65}\text{Cu}/{}^{63}\text{Cu} \right)_2 - \ln\left({}^{65}\text{Cu}/{}^{63}\text{Cu} \right)_1}{\ln\left({}^{66}\text{Zn}/{}^{64}\text{Zn} \right)_2 - \ln\left({}^{66}\text{Zn}/{}^{64}\text{Zn} \right)_1} = \frac{f_{\text{Cu}} \cdot M_{65}/M_{63}}{f_{\text{Zn}} \cdot M_{66}/M_{64}}$$

Cette équation est celle d'une droite à $\frac{f_{\text{Cu}}}{f_{\text{Zn}}}$ constant (Figure 8.3.2). Ainsi en mesurant simultanément les rapports isotopiques du cuivre et du zinc on peut évaluer le fractionnement instrumental. Cette méthode de spike est moins sensible aux effets des matrices et permet une précision de 0.04 ‰ [Albarède, 2004].

Corrections des interférences isobariques

Malgré les étapes de purification des solutions analysées au spectromètre de masse, il subsiste à l'état de traces d'autres éléments que celui d'intérêt. Le nickel possède en effet un isotope ${}^{64}\text{Ni}$ dont l'abondance naturelle est de 0.91 ‰. Le ${}^{64}\text{Ni}$ sera compté avec le ${}^{64}\text{Zn}$ dans le collecteur dédié à la masse 64. Afin de corriger cette interférence, on mesure un autre isotope du nickel, le ${}^{62}\text{Ni}$. Celui-ci à une abondance naturelle de 3.52 ‰. Il est alors possible d'estimer l'interférence en ${}^{64}\text{Ni}$ et de la soustraire à l'intensité mesurée dans le collecteur dédié à la masse 64.

Soit xI l'intensité mesurée dans le collecteur dédiée à la masse x. On a alors

$$\left({}^{66}\text{Zn}/{}^{64}\text{Zn} \right)_{\text{réel}} = \left({}^{66}I/{}^{64}I \right)_{\text{mesuré}} - \left({}^{62}\text{Ni}/{}^{64}\text{Ni} \right)_{\text{naturel}} \cdot \left(\frac{{}^{66}I}{{}^{62}I} \right)_{\text{mesuré}}$$

avec $\left({}^{62}\text{Ni}/{}^{64}\text{Ni} \right)_{\text{naturel}} = 0.25247$

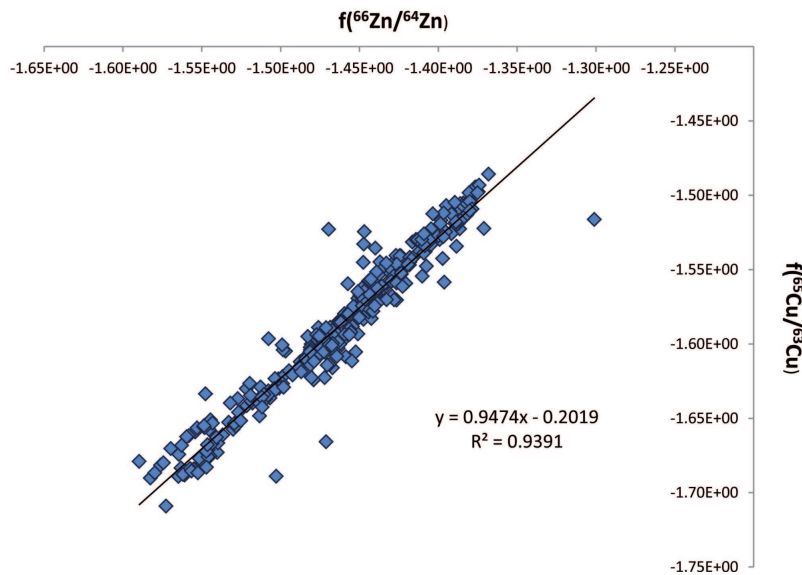


FIGURE 8.3.2: Coefficient de corrélation entre les facteurs de fractionnement du cuivre et du zinc.

8.3.2.2 Fer

Les mesures des isotopes du fer sont réalisées à l'aide du MC-ICP-MS Nu 1700. Il ne peut pas être mesuré en haute résolution par le Nu500 qui ne permet pas de résoudre l'interférence entre l'isotope ^{56}Fe et la molécule ArO (Figure 8.3.3). Le grand rayon, la présence de trois fentes et la puissance de l'aimant du Nu1700 permettent cette résolution en masse (Figure 8.1.2), en passant d'une résolution de 700 à 3000.

Utilisation d'un système de désolvation

Le « *Desolvating Nebulizer System* » est un instrument permettant de produire un flux d'échantillon stable et sec dans une source plasma.

Concrètement, un nébuliseur produit un aérosol dans une chambre de pulvérisation. L'échantillon vaporisé arrive ensuite sur une membrane de PTFE semi-poreuse et chauffée. La partie de l'échantillon correspondant au solvant passe à travers la membrane et est entraînée à l'extérieur par un courant de gaz. La partie restant dans la membrane est conduite vers le plasma. Le système de désolvation utilisé à l'ENS Lyon (DSN-100) comprend aussi un gaz chaud additionnel qui est introduit dans la chambre de pulvérisation. Il est dirigé vers les parois et empêche ainsi la condensation de l'échantillon.

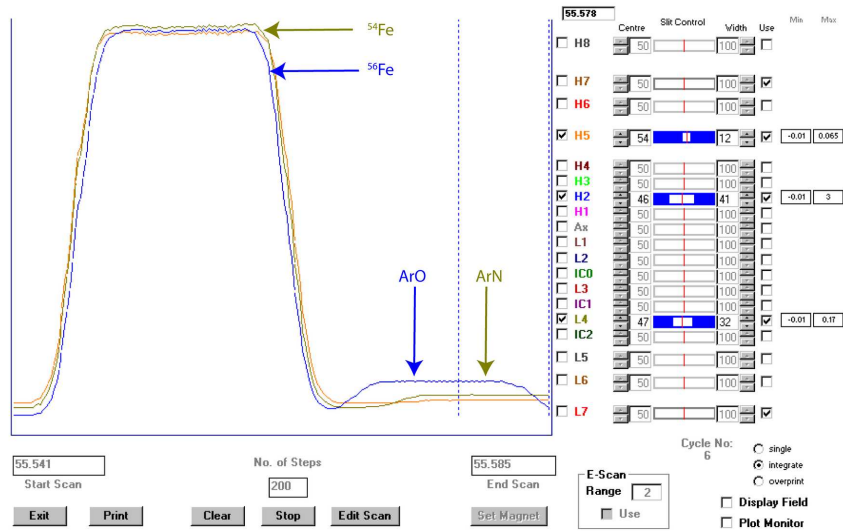


FIGURE 8.3.3: Résolution de l'interférence ArO vis à vis du ^{56}Fe . Image : Nu Instruments®

Corrections isobariques

Le chrome possède un isotope à la masse 54 (abondance naturelle du ^{54}Cr : 2,4 %) interférant avec le ^{54}Fe . Suivant le même principe que la correction isobarique du nickel pour le zinc, le ^{52}Cr (abondance naturelle de 83,8 %) est mesuré pour permettre une correction. Cependant, il a été noté que pour des échantillons très pauvres en fer une intensité était détectée à la masse 52 malgré l'absence de chrome dans l'échantillon initial. Il s'agit probablement d'une interférence liée à des molécules liées aux traces de matrices, relativement plus importantes en abondance dans des échantillons pauvres en fer. Pour ces échantillons, la correction semble incorrecte puisque que les isotopes semblent fractionner de manière indépendante de la masse. Dans ces cas, la correction isobarique doit être retirée.

Correction du fractionnement et de la dérive instrumentaux

Le spike classiquement utilisé pour les mesures isotopiques du fer utilise le nickel. Cependant, les tests sur le Nu1700 ont révélé l'absence d'amélioration des mesures lors de l'utilisation de cette méthode. Le fractionnement instrumental est donc supposé constant et sa valeur est fixée dans le programme de correction. Pour la correction de la dérive instrumentale par standard bracketing, on analyse un standard après chaque échantillon. Le standard utilisé est l'IRMM 14. Ainsi, le $\delta^{56}Fe$ s'écrit

$$\delta^{56}Fe = \left(\frac{(^{56}Fe/^{54}Fe)_{ech}}{\frac{1}{2} (^{56}Fe/^{54}Fe)_{std1} - \frac{1}{2} (^{56}Fe/^{54}Fe)_{std2}} - 1 \right) \cdot 1000$$

Chapitre 9

Précision et reproductibilité des mesures

Lors d'une mesure permettant d'obtenir une valeur numérique, il faut considérer trois sources d'erreur.

- La précision de la mesure (appelée *resolution*)
- La dispersion statistique (appelée *precision*)
- L'erreur systématique (appelée *accuracy*)

La précision de la mesure (*resolution*) est d'ici de 0.01 ‰. L'erreur systématique, correspondant à l'écart qui, malgré la répétition des mesures, subsiste entre la valeur vraie et la valeur mesurée. L'utilisation de standard externe permet d'estimer l'ordre de grandeur de cette erreur. A chaque début de session, un standard externe est donc analysé. Si la valeur obtenue ne correspond pas à la valeur attendue, on procède à de nouveaux réglages de la machine. Cette erreur est par conséquent inférieure à la précision de la machine. La dispersion statistique résulte de l'erreur d'échantillonnage, l'erreur de préparation et la stabilité de l'appareil. Pour quantifier l'erreur liée à la stabilité de la machine, on mesure la déviation des standards lors d'une session de spectrométrie de masse. Cette reproductibilité interne est associée à toutes les mesures isotopiques disponibles dans les annexes. En général, elle est de l'ordre de 0.05 ‰ pour les mesures isotopiques de Cu et de Zn. Pour le fer, l'utilisation du spectromètre en full HR et l'absence de spike engendre davantage d'instabilité. La reproductibilité interne des standards pour le fer est ainsi, en moyenne, de 0.08 ‰.

L'erreur de préparation peut elle aussi être évaluée en quantifiant la « reproductibilité externe ». Cette reproductibilité est estimée en mesurant le même échantillon préparé plusieurs fois selon le même protocole au cours de différentes sessions de MC-ICPMS. On mesure ainsi la dispersion statistique liée à la stabilité et les réglages de la machine ainsi que les fractionnements sur les colonnes résines anioniques échangeuses d'ions.

9.1 Dispersion statistique liée à la machine

Un standard in-house externe a été passé à chaque session de spectrométrie de masse de fer. L'échantillon initial est du sang de mouton. D'une valeur moyenne de -1.87‰ , il témoigne d'un écart type de 0.11‰ (Figure 9.1.1). Le calcul de cet écartype est réalisé à partir de toutes les mesures, y compris celles ayant permis de diagnostiquer un mauvais réglage.

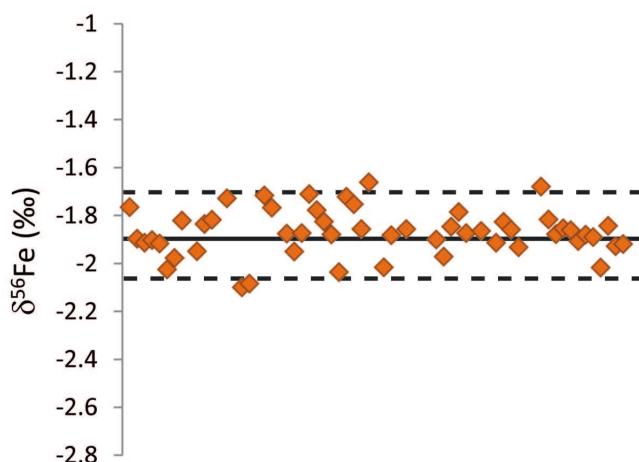


FIGURE 9.1.1: Reproductibilité externe « machine » d'un échantillon de sang de mouton (3H, $n=53$). La ligne noire représente la valeur moyenne. Les lignes pointillées délimitent la zone des échantillons compris entre la moyenne \pm deux écart-types. Les valeurs données ici tiennent compte de celles obtenues lors de mauvais réglages.

De la même manière, plusieurs échantillons de cuivre et de zinc ont servi de standard interne. Les valeurs obtenues pour certains d'entre eux sont donnés dans le Tableau 9.1., où l'on retrouve les valeurs pour l'échantillon 3H ainsi que celles pour un autre échantillon de fer, L1. On constate que l'ordre de grandeur de l'écartype des valeurs de ces standards « in-house » est équivalente à celle des standards externes. Ainsi, la reproductibilité externe « machine » est égale à la reproductibilité interne. En d'autres termes, les réglages entre différentes sessions n'engendrent pas de biais de mesure.

9.2 Dispersion statistique totale

Afin de s'assurer du bon déroulement des séparations chimiques, nous pouvons mesurer les rendements comme nous l'avons évoqué paragraphe 7.1.2.3. Cependant, le cuivre est

Sample name	Mean (‰)	Range		SD	n
		Min	Max		
$\delta^{65}\text{Cu}$					
CuO	-0.31	-0.36	-0.25	0.03	13
2L	-1.38	-1.46	-1.29	0.06	5
Cu49n	-0.4	-0.49	-0.32	0.04	11
Cu49o	-0.29	-0.36	-0.22	0.04	9
GB9	0.13	-0.02	0.23	0.05	20
$\delta^{56}\text{Fe}$					
3H	-1.87	-2.1	-1.67	0.11	53
L1	-2.91	-3.06	-2.78	0.07	33
$\delta^{66}\text{Zn}$					
ZnO	0.64	0.57	0.67	0.04	8
40Zn	0.5	0.39	0.60	0.06	7
3L	-0.66	-0.72	-0.63	0.04	4
ZnST4	0.36	0.28	0.41	0.04	6
Zn9	0.02	-0.06	0.07	0.05	6
ZnST9	0.25	0.15	0.35	0.06	10
$\delta^{15}\text{N}$					
stdAA	-6.48	-6.51	-6.47	0.01	10
$\delta^{13}\text{C}$					
stdAA	-24.79	-24.96	-24.54	0.01	10

TABLE 9.1: Variabilité des mesures isotopiques pour huit échantillons (Jaouen *et al.*, 2012)

contenu en très faible concentration dans les échantillons sur lesquels portent ce travail de thèse. Par conséquent, il n'est pas possible de mesurer sa concentration de façon précise avant la purification chimique. En effet, lors des analyses élémentaires sur le Q-ICP-MS, les éléments majeurs ne doivent pas excéder une concentration de 100 ppm. Pour les os et les dents, il faut même veiller à ce que cette concentration n'excède pas 20 ppm car le calcium, élément majeur des bioapatites, a tendance à s'accrocher et à boucher les cônes.

Afin de vérifier le bon déroulement de la séparation chimique du cuivre, il a donc été choisi d'utiliser un standard de chimie « in-house ». Au cours de chaque chimie, un os de vache médiéval, préalablement réduit en poudre et tamisé, a été analysé. Cet échantillon est en théorie homogène et est susceptible de réagir de la même manière que les autres échantillons d'os et d'email dentaire au problème de chimie étant donné qu'il présente une « matrice » similaire. A l'aide de cet échantillon, on peut dès lors quantifier la reproductibilité totale des mesures isotopiques.

9.2.1 Reproductibilité externe des mesures de zinc

Nous nous proposons ici de présenter la reproductibilité externe de l'échantillon AZE (l'os médiéval de vache). Parmi les 10 séparations chimiques ici présentées, 3 valeurs se distinguent des autres (Figure 9.2.1). Pour les deux valeurs « orange », il se trouve qu'il a été mis en évidence a posteriori que le titrateur électronique ne fonctionnait plus correctement. La normalité des acides étant biaisée, la récupération du zinc des échantillons, que ce soit celui-ci ou les autres des mêmes séries, n'a pas été totale. Pour la valeur rouge, les calculs de rendement ont mis en évidence une récupération incomplète (60 %) alors que les échantillons de la même série montre une récupération totale. L'origine de cette anomalie n'a donc pas pu être identifiée. Ces exemples montrent l'intérêt de l'utilisation complémentaire de ces deux méthodes afin de détecter des anomalies au cours des séparations élémentaires. Pour les séparations chimiques n'ayant pas été problématiques, la valeur moyenne obtenue pour le $\delta^{66}\text{Zn}$ de l'os AZE est de 1.50 ‰ avec un écartype de 0.04. La reproductibilité externe totale est ainsi équivalente à la reproductibilité interne. L'écartype est identique à celui mesuré par [Maréchal *et al.*, 1999] avec un protocole de séparation similaire mais sur un autre spectromètre de masse (Plasma 54).

9.2.2 Reproductibilité externe des mesures de cuivre

Concernant le $\delta^{65}\text{Cu}$ de l'échantillon AZE, on constate une nette dégradation de la reproductibilité externe de celle-ci par comparaison des résultats (Figure 9.2.2, $\sigma=0.12$). Cet écartype est supérieur à celui observé par [Maréchal *et al.*, 1999]. La figure 9.2.2 présente également la reproductibilité d'un autre échantillon, celui du sang d'un individu ayant été régulièrement échantillonné sur trois ans. L'écartype observé est inférieur à celui de l'échantillon AZE ($\sigma=0.09$) mais toujours supérieur à celui constaté par [Maréchal *et al.*, 1999].

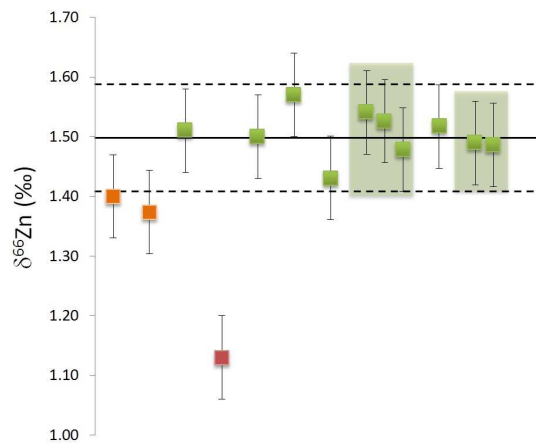


FIGURE 9.2.1: Reproductibilité externe totale (séparation chimique + analyse spectromètre de masse) de la mesure isotopique du Zn. La ligne en trait plein désigne la moyenne, les lignes pointillés correspondent à la moyenne $\pm 2SD$. Barres d'erreur : 1SD. Les rectangles se surimposant aux carrés verts permettent le regroupement des différentes valeurs obtenues pour des échantillons ayant subi la même séparation chimique.

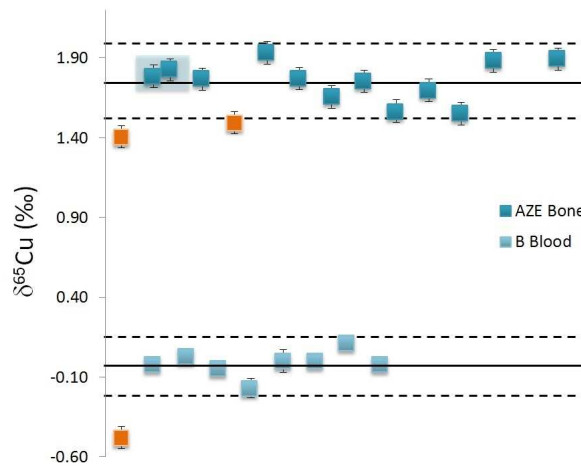


FIGURE 9.2.2: Reproductibilité externe totale (séparation chimique + analyse spectromètre de masse) de la mesure isotopique du Cu. Barres d'erreur : 1SD calculé à partir de la déviation des standards

Deux facteurs peuvent expliquer ce phénomène.

- En premier lieu, les échantillons d'AZE et de sang contiennent très peu de cuivre. Les échantillons sont parfois mesurés en limite de détection, ce qui engendre un biais. Par exemple, un même échantillon mesuré à des concentrations variables donnent des résultats très reproductibles, sauf en dessous de 50 ppb. En effet, pour un échantillon de composition isotopique connue (-0.39 ‰) mesuré à des concentrations comprises entre 20 et 600 ppb, on obtient des points très proches de la moyenne pour les concentrations supérieures ou égales à 200 ppb. Lors des analyses à 50 et 100 ppb, la mesure isotopique peut être encore considérée comme juste car égale à la moyenne \pm deux écartypes. En deça de cette concentration, on sort de la barre d'erreur (Figure 9.2.3). La sensibilité du spectromètre de masse le jour de ces analyses était d'un voltage de 0,5 V pour 50 ppb de cuivre. Nous recommandons donc de prendre avec précaution les compositions isotopiques mesurées en dessous de ce voltage.

- D'autre part, il se peut qu'un effet de matrice se surajoute, car il reste des traces d'éléments majeurs. En effet, même si la purification est très efficace (on passe d'un calcium constituant 40 % de l'échantillon à une concentration de celui ci inférieure à 100 ppb), il n'en reste pas moins que le calcium est présent avec une concentration dont l'ordre de grandeur équivaut à celui du cuivre. Enfin, pour l'échantillon B, il est possible qu'une variabilité naturelle au cours du temps du $\delta^{65}\text{Cu}$ du sang engendre une variabilité isotopique. On peut en conclure que les $\delta^{65}\text{Cu}$ des échantillons contenant très peu de cuivre sont à prendre avec précaution. Au lieu de considérer l'incertitude équivalente à celle de la déviation des standards, on devra estimer l'erreur équivalente à $1\text{ SD} \approx 0.10\text{ ‰}$.

9.2.3 Reproductibilité externe des mesures de fer

Pour la composition isotopique fer, la mesure de l'échantillon AZE n'a pas été réalisée car il est quasiment systématiquement détecté un voltage sur la cage recueillant la masse 52. La détection de cette masse 52 permet une correction liée à la présence de chrome. Cependant, l'échantillon AZE ne contient pas de chrome. Cette détection résulte probablement d'une interférence liée à des traces de matrices dans l'échantillon final. Ce problème a en effet été constaté pour d'autres échantillons très peu concentrés en fer. Nous avons exclu ces échantillons de nos interprétations. Cependant, certains échantillons ont été analysés à plusieurs reprises. La figure 9.2.4 représente les valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ obtenues pour 11 échantillons de sang au cours de différentes séparations chimiques. On constate que tous les résultats sont reproductibles, et que cette reproductibilité équivaut à la reproductibilité interne.

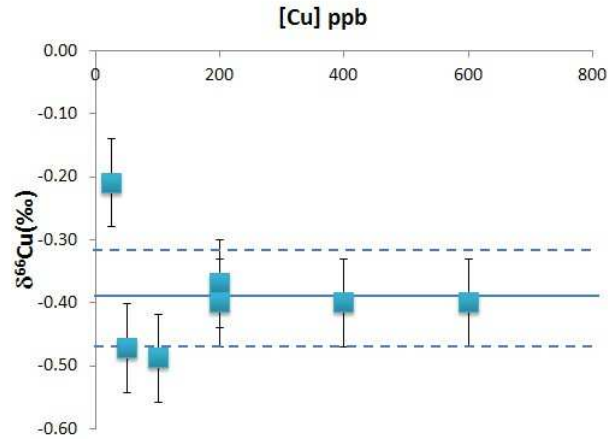


FIGURE 9.2.3: Reproductibilité du $\delta^{65}\text{Cu}$ d'un échantillon pour diverses concentrations. Le trait tireté correspond à la moyenne, la zone bleutée à la moyenne $\pm 2\text{SD}$.

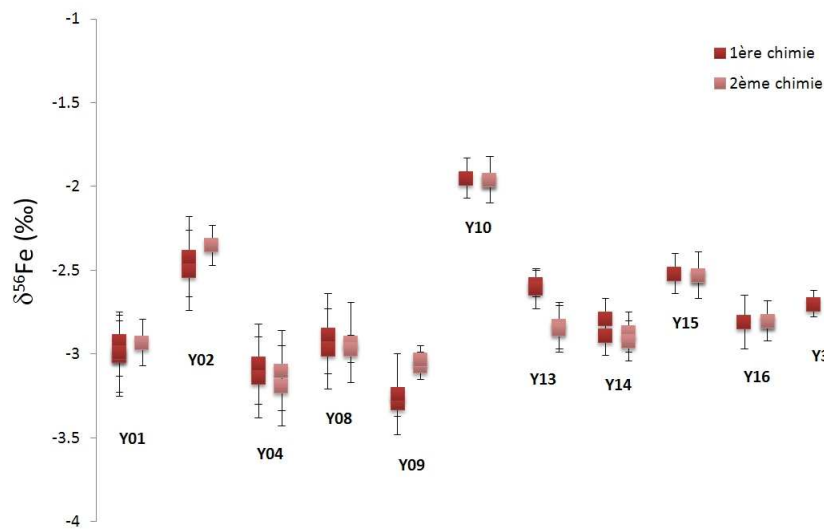


FIGURE 9.2.4: Reproductibilité externe totale (séparation chimique + spectromètre de masse) des $\delta^{56}\text{Fe}$ de 11 échantillons de sang de Yakoutes. Barres d'erreurs : 2SD calculé à partir de la déviation des standards.

Conclusion

L'ensemble des méthodes exposées au cours de cette partie permettent de mesurer les rapports isotopiques du fer, cuivre et zinc dans divers matériaux biologiques. Nous allons maintenant replacer ces analyses dans le contexte d'une problématique et voir quel peut être l'apport des analyses isotopiques des métaux de transition à la détermination du sexe des ossements humains.

Isotopie du sexe

Introduction

La détermination du sexe des humains fossiles est une étape indispensable en paléoanthropologie. Elle utilise principalement des informations morphométriques mesurées sur l'os coxal [Bruzek, 2002, Murail *et al.*, 2005] et génétiques obtenues à partir de l'ADN ancien (e.g. Halbout *et al.*, 1996, Stone *et al.*, 1996). Lorsque l'os coxal n'est plus conservé ou bien quand l'ADN est trop dégradé, il est difficile de sexer correctement les vestiges humains, ce qui biaise les reconstitutions paléodémographiques et paléobiologiques. De plus, les méthodes morphométriques souffrent d'un biais de subjectivité lié au jugement de l'observateur [Walrath *et al.*, 2004].



FIGURE 9.2.5: $\delta^{56}Fe$ mesurés dans le sang d'hommes et de femmes, modifié d'après Walczyk et von Blanckenburg, 2005

En 2002, Walczyk et von Blanckenburg découvrent l'existence d'une différence isotopique en fer entre le sang des hommes et celui des femmes : le $\delta^{56}Fe$ du sang des femmes est, en moyenne, plus élevé que celui des hommes (Figure 9.2.5). Cette différence est confirmée par des études ultérieures [Krayenbuehl *et al.*, 2005, Albarède *et al.*, 2011]. De plus, Albarède *et al.* (2011) ont démontré que le sang des hommes et des femmes se distinguent également par leur composition isotopique en cuivre (Fig 9.2.6, Annexe A) : les hommes présentent un enrichissement du sang en isotopes lourds pour cet élément. Enfin, les abondances naturelles des isotopes stables d'un troisième métal de transition, le zinc, ont été mesurées dans le sang d'hommes et de femmes [Albarède *et al.*, 2011, Stenberg *et al.*, 2005, Ohno *et al.*, 2005]. Si aucune différence liée au sexe n'a pu être démontrée pour les variations isotopiques du zinc, on constate que les $\delta^{66}Zn$ du sang sont similaires entre les différentes populations. Cette observation peut

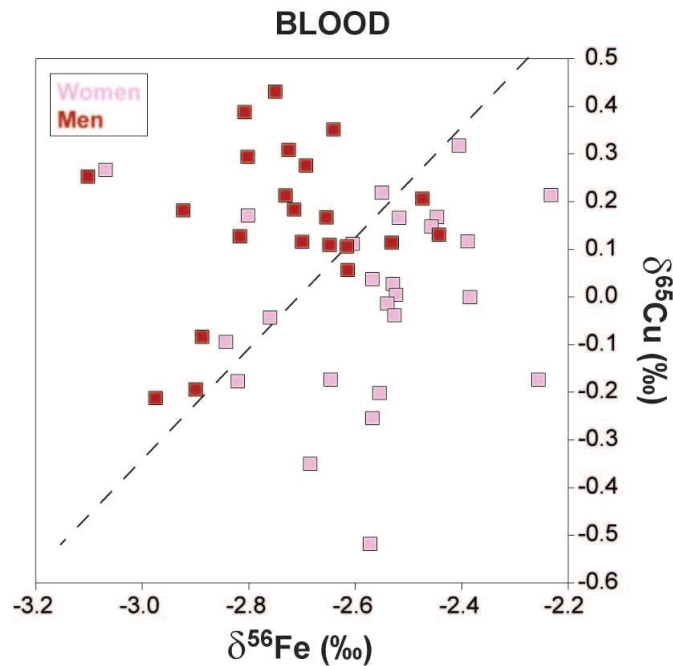


FIGURE 9.2.6: $\delta^{56}Fe$ et $\delta^{65}Cu$ mesurés dans le sang d’hommes et de femmes, d’après Albarède *et al.*, 2011

être élargie à l’élément fer (Fig 9.2.7). Pour le cuivre, aucune conclusion ne peut être apportée étant donné qu’une seule étude a été réalisée pour sa composition isotopique dans le sang humain. Ces constats nous permettent d’arguer en faveur du développement d’un outil isotopique de détermination du sexe : en effet, les méthodes morphométriques sont généralement calibrées sur une collection d’ossements et donnent des moins bons résultats sur d’autres populations [Case et Ross, 2007]. Burrows *et al.* (2003) le démontrent en testant plusieurs méthodes publiées sur une collection de métacarpes provenant de squelettes euro-américains actuels. Les méthodes avaient été originellement calibrées sur des squelettes anglais récents [Scheuer et Elkington, 1993], sur des squelettes américains du XX^{ème} siècle [Falsetti, 1995] et sur des squelettes euro-américains [Stojanowski, 1999]. Les attributions à un sexe étaient alors correctes pour plus de 92 % des individus, sauf pour Stojanowski (1999) (entre 80 et 90 % selon les fonctions). Lorsqu’elles sont appliquées à la population étudiée par Burrows *et al.* (2003) les scores de sexe tombent à 66 % pour Scheuer et Elkington et 87% pour Falsetti (1995). Seuls les résultats de la méthode calibrée par Stojanowski (1999) semblent reproductibles, ce qui peut être lié au fait qu’il s’agit dans les deux cas d’une population euro-américaine récente. L’existence d’un outil indépendant de la population pour la détermination du sexe serait donc d’un intérêt majeur pour l’anthropologie, car vraisemblablement applicable à diverses populations passées.

Cependant, le risque majeur lors de l’étude chimique des ossements humains est celui

de la contamination par le sol. En effet, les sols sont souvent très riches en oxydes de fer et de manganèse et le fer est capable de se substituer au calcium au sein de l'hydroxyapatite. Dans une moindre mesure, le sol contient également du cuivre et du zinc. Ainsi, pour des squelettes anciens, une méthode de détermination du sexe reposant sur les isotopes stables des métaux dans les os n'est envisageable que dans les cas dépourvus du risque de contamination du sol : ensevelissement dans le pergélisol, momies, etc. Le seul vestige humain susceptible d'être préservé d'une contamination post mortem dans des sols avec circulation d'eau est l'émail dentaire qui est très minéralisé. Mais est-il capable d'enregistrer les signaux isotopiques du sang ? Les os sont en effet de bien meilleurs candidats pour cet enregistrement car c'est au sein des os, dans la moelle osseuse que se forment les érythrocytes.

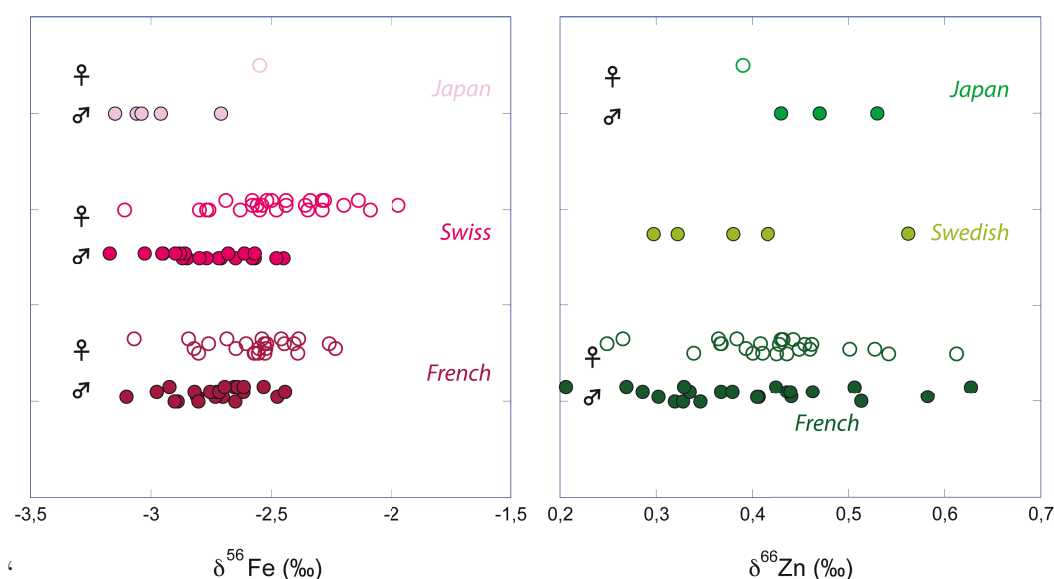


FIGURE 9.2.7: Variabilité de la composition isotopique du fer et du zinc dans le sang de diverses populations. F=femme, H= homme, I=inconnu. Les données sont issues d'Albarède *et al.*, 2011 ; Stenberg *et al.*, 2005 ; Ohno *et al.*, 2004 ; Ohno *et al.*, 2005 ; Walczyk et von Blanckenburg, 2002. Le $\delta^{65}\text{Cu}$ n'est pas représenté car il a uniquement été mesuré dans la population française (Albarede *et al.*, 2011).

Actuellement l'origine des valeurs $\delta^{56}\text{Fe}$ et du $\delta^{65}\text{Cu}$ des os et du sang des femmes, respectivement élevées et faibles par rapport aux tissus masculins, n'est pas clairement identifiée. Il a été proposé qu'elle soit liée à une absorption intestinale plus importante chez les femmes [Krayenbuehl *et al.*, 2005, Walczyk et Von Blanckenburg, 2002, Walczyk et von Blanckenburg, 2005] ou à une répartition des réserves de fer et de cuivre différentielle entre foie et sang [Albarède *et al.*, 2011]. Le mécanisme à l'origine de la différence isotopique va jouer un rôle crucial dans le potentiel de l'émail dentaire comme

outil de détermination du sexe. En effet, Woodhead *et al.* (1991) ont montré que pour des groupes d'enfants âgés, en moyenne, de 9 ans, le groupe des filles présentait une absorption intestinale du fer significativement plus importante. Les auteurs de l'étude attribuent cette différence aux hormones sexuelles, dont la concentration ne cesse d'augmenter dans le sang entre 5 et 11 ans [Mitamura *et al.*, 2000, Klein *et al.*, 1994]. Dès lors, on peut imaginer que le décalage isotopique en fer et en cuivre du sang féminin s'amorce dans l'enfance. Si la différence isotopique n'est pas liée à l'absorption mais à la diminution des réserves de fer dans le foie, il faudra attendre la ménarche pour voir une augmentation du $\delta^{56}\text{Fe}$ et une diminution du $\delta^{65}\text{Cu}$ des tissus des femmes [Hallberg et Rossander-Hulten, 1991]. Les données préliminaires rassemblées pour les isotopes stables du fer du sang d'enfant montrent des valeurs similaires chez les filles et les garçons, mais l'échantillonnage reste très faible (5 enfants dont 1 fille et 5 nouveau-nés dont trois filles, Fig 9.2.5). Il n'est donc pas possible de trancher entre ces deux hypothèses. Afin d'avoir une chance d'enregistrer une différence isotopique liée au sexe, il convient d'analyser des dents encore en formation à l'âge où le décalage isotopique débute.

D'autre part, les deux hypothèses expliquant l'origine de la différence isotopique homme/femme ont une conséquence majeure : la disparition de cette différence après la ménopause. A l'heure actuelle, on ignore en effet l'impact de cet événement sur le $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ du sang des femmes. Les os se renouvelant en permanence au cours de la vie, la disparition d'une signature isotopique féminine après 50 ans serait lourde de conséquences sur une diagnose sexuelle isotopique.

Afin d'évaluer le potentiel du $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$ pour le sexage des restes humains, nous avons analysé dans un premier temps des ossements archéologiques (Ossements de Saint-Laurent) dont le sexe avait été déterminé par la méthode de Bruzek *et al.* (2002). Les résultats ont été comparés à ceux que nous avons obtenus dans un autre type d'os sur des individus n'ayant jamais été enterrés (Ossements du CCEC). Dans un deuxième temps, nous nous sommes attachés aux perspectives d'un outil de sexage des fossiles anciens par l'émail dentaire en discutant également de l'impact de la ménarche sur les compositions isotopiques corporelles. Enfin, nous avons évalué précisément l'impact de la ménopause sur le $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ du sang humain et comparé nos résultats à ceux obtenus dans les tissus minéralisés.

Chapitre 10

L'enregistrement isotopique du sexe dans les ossements humains

10.1 Introduction

Afin d'évaluer l'enregistrement de la différence isotopique existant entre le sang des hommes et celui des femmes dans les restes humains, nous nous sommes d'abord intéressés à des ossements archéologiques. L'étude des compositions isotopiques du fer et du cuivre dans les ossements provenant du cloître de Saint-Laurent de Grenoble ont fait l'objet d'une publication en mai 2012 dans l'*American Journal of Physical Anthropology*. Nous nous sommes préalablement assurés que les os archéologiques avaient été préservés de la contamination du sol. Les détails des tests et des conclusions sont donnés Annexe D. Ainsi, sur les 49 échantillons analysés, 5 ont été écartés des interprétations car leur signature isotopique était potentiellement contaminée par celle du sol. Les données complémentaires (Supplementary Data) accompagnant l'article sous sa forme publiée sont présentées Annexe B.

10.2 Article « *Fe and Cu stable isotopes in archaeological bones and their relationship to sex* »

Résumé

L'attribution précise des restes humains anciens à un sexe repose sur la disponibilité de l'os coréal ou de la bonne conservation de l'ADN. Les abondances naturelles des isotopes stables ($^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ et $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$, respectivement) du fer (Fe) et du cuivre (Cu) ont été récemment mesurées dans le sang humain, et un résultat inattendu a été la découverte d'un appauvrissement en ^{56}Fe et un enrichissement en ^{65}Cu du sang des hommes comparé à celui des femmes. L'os étant irrigué par le sang de façon permanente, il est

susceptible de conserver la signature en $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ et en $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ du sang qui peut se révéler utile pour déterminer le sexe des ossements archéologiques. Nous exposons ici les ratios $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ et $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ à partir d'un ensemble de phalanges bien conservées ($n = 43$) appartenant à des individus enterrés entre le XVII^{ème} et XVIII^{ème} siècles dans la nécropole de Saint-Laurent de Grenoble (France) et pour lesquels le sexe a été estimé à partir de la morphologie osseuse du bassin. Les métaux ont été purifiés à partir de la matrice osseuse par chromatographie liquide sur résine échangeuse d'ions et les compositions isotopiques ont été mesurées par spectrométrie de masse à source plasma et multicollection. Les résultats montrent que, comme on pouvait l'attendre au vue des données de la littérature sur le sang, le fer des os des hommes est appauvri en ^{56}Fe et enrichi en ^{65}Cu par rapport à ceux des os féminins. Aucune différence liée au sexe n'a été mise en évidence pour les rapports $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ de l'os. La concentration et les données isotopiques démontrent l'absence de contamination des sols. Pour quatre échantillons sur 5 (77%) l'attribution d'un sexe a été correcte, un résultat comparable à la détermination du sexe à l'aide de Fe et Cu isotopes dans le sang (81%). L'analyse isotopique des métaux peut donc représenter une méthode valable d'attribution du sexe applicable aux restes humains isolés.

FE AND CU STABLE ISOTOPES IN ARCHEOLOGICAL HUMAN BONES AND THEIR RELATIONSHIP TO SEX

Klervia Jaouen^{1*}, *Vincent Balter*¹, *Estelle Herrscher*², *Aline Lamboux*¹, *Philippe Telouk*¹, *Francis Albarède*¹

¹Laboratoire de Géologie de Lyon, CNRS UMR 5276, Ecole Normale Supérieure de Lyon/Université Lyon I, 46 allée d'Italie, 69007 Lyon, France

² CNRS UMR 7269, LAMPEA, BP 647, 13904 Aix-en-Provence Cedex 02, France

* Corresponding author : Klervia Jaouen

Keywords : metal stable isotopes ; iron ; copper ; zinc ; sex determination ;

ABSTRACT

Accurate sex assignment of ancient human remains relies on the availability of coxal bone or well-preserved DNA. Iron (Fe) and copper (Cu) stable isotope compositions ($^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ and $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$, respectively) were recently measured in modern human blood, and an unexpected result was the discovery of a ^{56}Fe -depletion and a ^{65}Cu -enrichment in men's blood compared to women's blood. Bones, being pervasively irrigated by blood, are expected to retain the $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ and $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ signature of blood, which in turn is useful for determining the sex of ancient bones. Here we report the $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$, and $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ ratios from a suite of well-preserved phalanges (n=43) belonging to individuals buried in the XVIIth and XVIIIth centuries at the necropolis of Saint-Laurent de Grenoble, France, and for which the sex was independently estimated from pelvic bone morphology. The metals were purified from the bone matrix by liquid chromatography on ion exchange resin and the isotope compositions were measured by multiple-collector inductively-coupled plasma mass spectrometry. The results show that, as expected from literature data on blood, male bone iron is depleted in ^{56}Fe and enriched in ^{65}Cu relative to female. No sex difference is found in the $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ ratios of bone. The concentration and isotopic data show no evidence of soil contamination. Four samples out of 5 (77%) can be assigned their correct sex, a result comparable to sex assignment using Fe and Cu isotopes in blood (81%). Isotopic analysis of metals may therefore represent a valid method of sex assignment applicable to incomplete human remains.

INTRODUCTION

Sex assignment of human remains is a crucial step of forensic and paleoanthropological studies. Presently, sex determination most often relies on pelvic morphology (Bruzek, 2002; Murail et al., 2005) or ancient DNA analysis (Stone et al., 1996). When pelvic bones are lacking or deteriorated or when ancient DNA is not preserved, the sex assignment of human remains is uncertain.

Walczyk and von Blanckenburg, (2002) showed that the iron (Fe) stable isotope abundances (as represented by the $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ ratio) of male and female blood were different, though with significant overlap. The sex factor indicated by Fe isotopes was confirmed by subsequent work (Krayenbuehl et al., 2005; Stenberg et al., 2005; Albarède et al., 2011) and also found for copper ($^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$), but not for $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ (Albarède et al., 2011).

Iron, copper, and zinc are three metals essential to human metabolism. Iron is present in hemoglobin for the transport of oxygen and is involved in electron transfer. Copper also plays a role in electron transfer in critical metabolic pathways, and the metabolic relationships between Cu and Fe are multiple (Collins et al., 2010). Zinc is present in more than 300 metalloproteins, most of which have enzymatic or structural properties (Cousins, 1985). Being essential elements, the concentrations of Fe, Cu, and Zn are regulated by the organism to be between the deficiency and toxicity levels.

For a given element, the abundances of stable isotopes in various biological compartments vary because bond energy changes with the mass of each isotope. The molecular configuration, redox conditions, and kinetics are known to be the main driving forces for isotopic variations. As illustrated by recent literature (Walczyk and von Blanckenburg, 2002; Krayenbuehl et al., 2005; Albarède et al., 2011), isotopic variability of essential elements potentially yields information on metabolic pathways and health conditions that may not affect metal concentrations outside of the natural variability. Iron has four stable isotopes, ^{54}Fe (5.8 %), ^{56}Fe (91.7 %), ^{57}Fe (2.2 %), and ^{58}Fe (0.28%). Although studies of the variations of Fe stable isotope ratios are still at a very early stage, they have been documented for some human organs such as liver, hair, muscle, feces, urine, and nails (Ohno et al., 2004; Krayenbuehl et al., 2005; Stenberg et al., 2005; Walczyk and von Blanckenburg, 2005; Albarède et al., 2011). Zinc has five stable isotopes, ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn , and ^{70}Zn , with respective average natural abundances of 48.6, 27.9, 4.1, 18.8, and 0.6%. Copper has only two stable isotopes, ^{65}Cu (30.8%) and ^{63}Cu (69.2%). While a first systematic investigation was published for the organs and body fluids of sheep by Balter et al. (2010), Zn and Cu stable isotope compositions of blood and hair constitute the only reference for humans (Ohno et al., 2005; Stenberg et al., 2005; Albarède et al., 2011). Blood Fe and Cu isotope compositions show that Fe is enriched in ^{56}Fe and Cu depleted in ^{65}Cu in women's blood relative to the values observed for men, yet with some overlap for Fe (Walczyk and von Blanckenburg, 2002, 2005; Albarède et al., 2011) (Fig. 12.2.1). For Fe, isotopic differences have been attributed to differential intestinal absorption between men and women (Walczyk and von Blanckenburg, 2002; Krayenbuehl et al., 2005; Walczyk and von Blanckenburg, 2005).

Bones are permanently irrigated by blood and participate in metal storage. Iron and copper in bones could, therefore, be recording the $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ and $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ ratios of blood. Since bones can be fossilized, archeological implications are potentially important because fossil bones may preserve sex differences in their Fe and Cu stable isotope

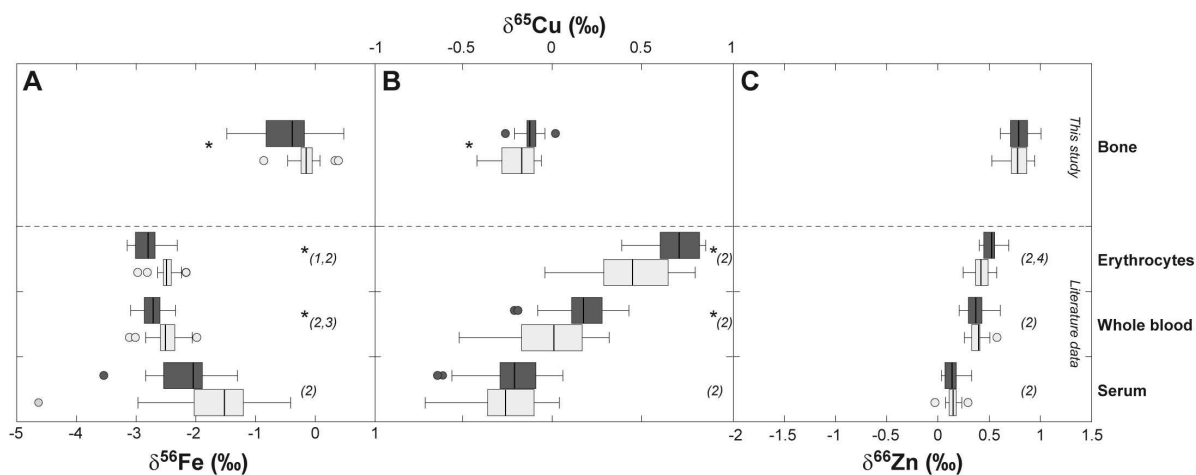


FIGURE 10.2.1: Fe, Cu and Zn isotope variations of the organs discussed in the text. The delta annotations are given by $:\delta^x Fe = \left[\frac{(x Fe / ^{54} Fe)_{sample}}{(x Fe / ^{54} Fe)_{standard}} - 1 \right] * 1000$ with $x = 56$ or 57). The “IRMM14” solution stands for the Fe isotope standard. $\delta^{65} Cu = \left[\frac{(^{65} Cu / ^{63} Cu)_{sample}}{(^{65} Cu / ^{63} Cu)_{standard}} - 1 \right] * 1000$. The “NIST-SRM 976” solution was used as Cu isotope standard. $\delta^x Zn = \left[\frac{(x Zn / ^{64} Zn)_{sample}}{(x Zn / ^{64} Zn)_{standard}} - 1 \right] * 1000$ with $x = 66, 67, 68,$ or 70). The “JMC 3-0749” solution is the well-distributed Lyon Zn isotope standard. The box represents the 25th–75th percentiles (with the median as a bold vertical line) and the whiskers show the 10th–90th percentiles. Numbers in brackets correspond to references. Bone data are from this study. Statistically significant differences between women and men ($p < 0.02$) are indicated by an asterisk. Literature data : 1. Walczyk and von Blanckenburg, 2002. ; 2. Albarède et al, 2011 ; 3. Ohno et al, 2004 ; 4. Ohno et al, 2005.

compositions. A vast literature already exists on the variability of Fe, Cu, and Zn concentrations in recent or archaeological bones (Brätter et al., 1977; Lyengar et al., 1978; Lambert et al., 1982; Beattie and Avenell, 1992; Vuorinen et al., 1996; D'Haese et al., 1999; Martínez-García et al., 2005). While this variability may be indicative of ancient disease or post-mortem contaminations, it does not seem to relate to sex. The range of their stable isotope compositions also remains undocumented. We therefore measured the Fe, Cu, and Zn stable isotope compositions in well-preserved bones from a suite of individuals recovered from XVIIth and XVIIIth century French graves and for which the sex had previously been established from the morphology of the pelvic bones.

Stable isotope compositions of metals in bones may first be controlled by diet. Metal stable isotope compositions are known to vary among dietary foodstuffs : for instance, the Fe in animal products is depleted in ⁵⁶Fe relative to plant foodstuffs, presumably due to preferential intestinal absorption of light Fe isotopes (Walczyk and von Blanckenburg, 2005). Likewise, Zn stable isotope compositions differ between animal and vegetal products as a result of isotope fractionation during intestinal uptake, with ⁶⁶Zn being preferentially absorbed relative to ⁶⁴Zn (Balter et al., 2010). For copper, no such pattern is known, either for concentrations or for isotopic ratios (Byrne and Parris, 1987). The relative importance of plants versus animal consumption and the presence of C3 versus C4 plants in the diet can be assessed using the carbon and nitrogen stable isotope compositions (¹³C/¹²C and ¹⁵N/¹⁴N, respectively) of collagen (Herrscher, 2003; Balter et al., 2005, Herrscher and Le Bras, 2010). In order to separate the effects of sex and diet, we tested potential relationships between ¹³C/¹²C and ¹⁵N/¹⁴N and metal stable isotope compositions.

The original metal stable isotope compositions of bones can be affected by diagenesis. Iron forms colloidal phases that can be transported by groundwater and can entrain large amounts of copper and zinc. Secondary mineral phases, such as iron hydroxides, can enter the porosity of bones and overprint the original isotopic signatures. There is no mineralogical criterion for unambiguous detection of diagenesis (Pucéat et al, 2004). Here, we use combined measurements of concentrations and stable isotope compositions to evaluate whether the initial biological metal inventory has been perturbed by a diagenetic end-member. For any given element, addition of variable proportions of a soil component to the initial biogenic inventory is expected to produce a mixing line, i.e., a correlation between concentrations and isotopic compositions. (Albarède, 1996). It will further be tested whether manganese, which has been used as a proxy of Fe diagenesis due to its association with Fe in Fe-Mn oxy-hydroxides (Kohn et al., 1999), can be correlated with the indicators of diagenetic mixing.

MATERIAL

Human skeletal material has been excavated from the cemetery of the Saint-Laurent-de-Grenoble Church, located on the right bank of the Isère river within Grenoble (Northern Alps, France, Colardelle 2008). According to ¹⁴C dates, 1500 skeletons discovered

in primary burials belong to the period from the early Middle Ages (5th c. AD) to the 18th century AD (Colardelle 2008). This particular archeological sample set was selected because the C and N isotope compositions of the skeletons, motivated by investigations of the diet and breastfeeding, are available (Herrscher 2003, 2011 ; Herrscher et al 2001). Furthermore, due to the good preservation of the skeletal material anthropological data such as sex and age at death have been collected for numerous individuals (Herrscher 2007, Herrscher et al 2006). For the present study, a subsample of metacarpals and/or phalanges of 18 females and 31 males from the 17th-18th c. AD (Modern Period) were selected. Historical and archaeological data indicate deterioration of the economical context and the social status of the inhabitants of the Saint-Laurent quarter during the Modern Period compared with the Medieval Period (Colardelle, 2008). Palaeopathological data reveal a significant increase of infectious and dental lesions for both adults and subadults (Herrscher and Valentin, 2005 ; Herrscher et al 2006). The palaeopathology of the samples also disclosed one case of syphilis (T39) and two cases of metabolic disorders with two individuals suffering from Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis with (DISH, T02, T20) (Herrscher and Katzenberg 2008).

Sex assessment was performed on the hip bone (os coxae) using morphoscopic (Bruzek, 2002) and morphometrical methods (Murail et al., 2005). Bruzek's (2002) method for determining sex relies on the combination of 5 characters that allows samples to be classified as female, male or indeterminate, whereas Murail's (2005) method estimates the probability for an individual to be a female or a male. In our case, Bruzek's (2002) method was applied using the first three characters with a success of 91% and the five characters with a success of better than 95% (Bruzek, 2002 : 165-166). For the Murail determination, the threshold retained for assigning sex was 95%. When the results were different for the both methods, no sex assessment was given. Assessment of age at death was done using two methods based on the modification of the auricular surface of the coxal bone (Lovejoy et al 1985 ; Schmitt et al 2005). As for sex, the Lovejoy method attributes a range of age, whereas the Schmitt method assigns a probability within an age interval. The two "age at death" estimation methods do not always give the same range, requiring merged ranges to be considered. Individuals were divided into four categories of young (YA, less than 34 yrs old), mature (MA, 34-45 yrs old), old (OA, more than 45 years old), and unknown (U). This division allows comparison between groups with minimal bias despite uncertainties on the age at death. In addition, individuals with no fusion of the sphenoid-occipital-synchondrosis, the iliac crest, or the medial extremity of clavicle were assigned to the young age group.

ANALYTICAL METHODS

Sample preparation and chemical purification

Cortical bone samples were surface abraded and ground in an agate mortar. They were leached for 30 minutes with dilute acetic acid (0.1 N) to remove diagenetic mineral phases

(mainly carbonates). Residual material was rinsed three times with distilled water, dried down, and dissolved in 4.5 N HNO₃. The dissolved samples were then evaporated to dryness and re-dissolved in 1 mL of 7 N HCl + 0.001 % H₂O₂ and evaporated again in order to remove any traces of remaining nitric acid. Finally, samples were taken up in 1 mL 7 N HCl + 0.001% H₂O₂ and a 50 μ L aliquot was taken for elemental concentration measurements. The remaining solution was processed for isotope analysis according to the technique of Maréchal and Albarède (2002) on a column filled with the AG MP-1 anion-exchange resin (100–200 mesh, Bio-Rad). Copper was eluted with 20 mL 7 N HCl + H₂O₂ 0.001 %, iron with 10 mL 2 N HCl + H₂O₂ 0.001%, and zinc with 10 mL 0.5 N HNO₃. The process was repeated for each element in order to further reduce the amount of matrix.

Isotopic and elemental analyses

Copper and zinc stable isotope compositions were determined on a Nu-HR multiple-collector inductively-coupled plasma mass spectrometer (MC-ICPMS) using wet plasma, while Fe was run on a large-radius high-resolution Nu-1700 MC-ICPMS using dry plasma and a resolution of 4500. The samples were introduced by free aspiration in 0.05 N distilled HNO₃. For Cu and Zn, instrumental mass fractionation was corrected using elemental doping and standard-sample bracketing following the technique of Albarède et al. (2004). The reproducibility of Cu, Zn, and Fe isotopic ratios was 0.05 permil. Samples were randomized during analysis and duplicates were measured to check for systematic errors. The external reproducibility based on the repeated measurement of in-house standards is given in Table 13.1. Iron, copper and zinc concentrations were determined using inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Agilent 7500 CX).

Sample name	Mean (‰)	Range		SD	n
		Min	Max		
$\delta^{65}\text{Cu}$					
CuO	-0.31	-0.36	-0.25	0.03	13
2L	-1.38	-1.46	-1.29	0.06	5
Cu49n	-0.4	-0.49	-0.32	0.05	8
$\delta^{56}\text{Fe}$					
3H	-1.87	-2.1	-1.67	0.11	53
$\delta^{66}\text{Zn}$					
ZnO	0.64	0.57	0.67	0.04	8
40Zn	0.5	0.39	0.60	0.06	7
3L	-0.66	-0.72	-0.63	0.04	4
ZnST4	0.36	0.28	0.41	0.04	6

Table 10.1: Variability of the isotopic measurements for eight samples

Bones	$\delta^{56}Fe$			$\delta^{65}Cu$			$\delta^{66}Zn$		
	n	av	2SD	n	av	2SD	n	av	2SD
Women	16	-0.12	0.65	13	-0.20	0.25	13	0.77	0.25
Men	27	-0.45	0.85	18	-0.11	0.16	18	0.80	0.22
All	43	-0.33	0.82	31	-0.15	0.22	31	0.79	0.23
p		0.01			0.02			0.34	

TABLE 10.2: Average isotope compositions (av) in delta units (permil or ‰) and 95% range (2SD) for the isotope compositions of Zn, Cu, and Fe in the bones and p value for t test performed between male and female values.

Statistical analysis

Diagenesis is expected to increase the spread of metal concentrations. Data falling outside the 2 standard-deviation range about the mean were therefore considered outliers and eliminated (Indrayan, 2006). In order to validate the potential of Fe and Cu isotopes for sex assessment, we first tested the data using bilateral Student's t tests (Table 10.5). We performed a MANOVA, a discriminant analysis and a leave-one-out cross validation using PAST software (Hammer et al, 2001). Fisher test on $\delta^{56}Fe$ and $\delta^{65}Cu$ values was also used to look at differences between men and women. For statistical differences between age groups, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used because of the number of samples per age group (Table 10.4). Age groups only include individuals for which age assignment is unambiguous (Appendix¹, Table S1). Finally, Fisher's tests were employed to assess the correlations between diet indicators and isotope ratios (Table 10.5).

	[Mn]		[Fe]		[Cu]		[Zn]	
	p	R ²	p	R ²	p	R ²	p	R ²
$\delta^{65}Cu$	0.97	<0.001	0.67	0.0058	0.19	0.0491	0.22	0.0430
$\delta^{56}Fe$	0.17	0.0412	0.79	0.0016	0.61	0.0059	0.93	0.0002
$\delta^{66}Zn$	0.91	0.0003	0.58	0.0092	0.60	0.0081	0.49	0.0140

TABLE 10.3: Correlation coefficients and associated p values between concentrations and isotopic ratio

Groups	YA-MA			YA-OA		
	$\delta^{65}\text{Cu}$	$\delta^{56}\text{Fe}$	$\delta^{66}\text{Zn}$	$\delta^{65}\text{Cu}$	$\delta^{56}\text{Fe}$	$\delta^{66}\text{Zn}$
All data	0.26	0.40	0.64	0.37	0.97	2.16
Women	0.00	0.02	0.86	0.86	0.15	0.86
Men	0.33	3.57	0.07	1.11	4.72*	2.32
Groups	MA-OA			(YA+MA)-OA		
	$\delta^{65}\text{Cu}$	$\delta^{56}\text{Fe}$	$\delta^{66}\text{Zn}$	$\delta^{65}\text{Cu}$	$\delta^{56}\text{Fe}$	$\delta^{66}\text{Zn}$
All data	0.21	0.21	0.44	0.16	0.66	1.65
Women	0.00	0.00	2.40	0.44	0.07	0.00
Men	1.11	0.30	2.84	1.35	3.94*	2.93

TABLE 10.4: For two populations ($k=1$) and a level of significance of 5% (60.05), χ^2 equals 3.84. OA=Old adults, >45 years old, MA=mature adults, 34–45 years old, YA=young adults, <34 years old. (YA+MA) corresponds to values for individuals classified in the age groups YA, MA and YA/MA. Kruskal Wallis tests are performed for both sexes taken together (All data) and separately (Women, Men). * is for significant results, i.e., when $p < 0.05$.

	$\delta^{65}\text{Cu}$		$\delta^{56}\text{Fe}$		$\delta^{66}\text{Zn}$	
	R^2	p	R^2	p	R^2	p
$\delta^{13}\text{C}$	0.101	0.08	0.017	0.41	0.018	0.47
$\delta^{15}\text{N}$	0.002	0.78	0.004	0.68	0.036	0.31

TABLE 10.5: Correlation coefficients and associated p values between diet indicators and metal isotopes ratio

RESULTS

Mass-dependent isotope fractionation

The isotope and concentration data are reported in Table S2 of the Appendix² and a summary of the statistical results is given in Table 13.3. We checked that isotopic fractionation was mass-dependent for all the samples, i.e., that $\delta^{66}\text{Zn}/2 = \delta^{67}\text{Zn}/3 = \delta^{68}\text{Zn}/4$ and $\delta^{57}\text{Fe}/3 = \delta^{56}\text{Fe}/2$ (Fig. 13.1.1). Different slope values would have indicated instrumental mass-independent fractionation.

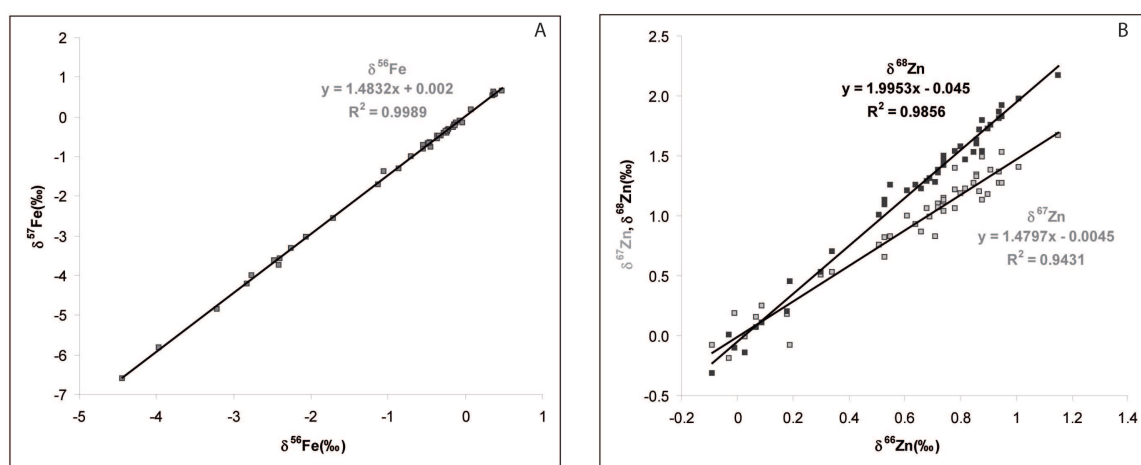


FIGURE 10.2.2: Fractionation lines between different isotopes A : $\delta^{56}\text{Fe}$ vs. $\delta^{57}\text{Fe}$; B : 1. $\delta^{67}\text{Zn}$ vs. $\delta^{66}\text{Zn}$ and $\delta^{68}\text{Zn}$ vs. $\delta^{66}\text{Zn}$. All the samples fall on the theoretical mass-dependent fractionation lines.

Bone diagenesis

The 2-sigma filter led to the exclusion of five data points (Appendix³, Table S2). Once these samples were excluded, the Fe, Cu, and Zn concentration ranges correspond to those observed in fresh bone ($[\text{Cu}] = 1\text{-}50$ ppm, $[\text{Zn}] = 50\text{-}400$ ppm, $[\text{Fe}] = 100\text{-}2000$ ppm) (Lyengar et al., 1978; Martínez-García et al., 2005). Concentrations and isotopic ratios are not significantly correlated regardless of the elements (Table 3). This observation suggests that diagenetic perturbation, either by addition of a diagenetic component or

1. Voir Annexe B
2. Voir Annexe B
3. Voir Annexe B

by selective leaching, were minimal and that isotope compositions of metals in fossil bones reflect the values in the living individuals.

Influence of diet and age

No correlation was found for either sex between $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, on the one hand, and among $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$, and $\delta^{66}\text{Zn}$, on the other hand (Table 10.5). The age at death and the metal stable isotope compositions also seem uncorrelated (Table 4). One exception should be noticed for younger men's values, shows lighter iron isotope compositions. This result could, however, be due to sampling bias : individuals who were younger than the old-age group (YA/MA, Table S1⁴), show iron isotope values similar to the oldest ones. The sex factor The average $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$, and $\delta^{66}\text{Zn}$ values in bones are $-0.30\pm 0.38\text{‰}$, $-0.15\pm 0.11\text{‰}$, and $-0.79\pm 0.11\text{‰}$, respectively. As for blood (Albarède et al., 2011), no significant sex difference is visible in the Zn stable isotope compositions of bones (Fig. 12.2.1). The values of women's bone $\delta^{56}\text{Fe}$ are higher by 0.33‰ than those of men (with respect to 0.14‰ in blood). Women's bone $\delta^{65}\text{Cu}$ values are lower than men's values by 0.09‰ (with respect to 0.16‰ in blood). The differences attributable to sex are statistically significant (bilateral t test, $p < 0.05$ for both elements). The results for bones are illustrated in Fig. 10.2.3A and those for blood (Albarède et al., 2011) in Fig. 10.2.3B for comparison. In each panel, the line is defined by the best fit discrimination between men and women. The difference in $\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{65}\text{Cu}$ between the two groups is statistically significant (Fisher test, $F=4.88$, $p=0.02$). Sex assignment based on a leave-one-out cross validation with $\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{65}\text{Cu}$ values gives consistent results for bones and blood (77% and 81% of successful determinations for bones and whole blood, respectively).

DISCUSSION

Our results show that Fe and Cu stable isotope compositions in bones differ statistically between men and women, with Fe being enriched in ^{56}Fe and copper depleted in ^{65}Cu in women relative to men. The isotopic trend mirrors that of whole blood and erythrocytes (Walczyk and von Blanckenburg, 2002; Albarède et al, 2011) (Fig. 12.2.1 and 10.2.3). The overlap between the isotope compositions of Fe and Cu in male and female samples accounts for occasional errors when sex assignment is made on the basis of the discrimination line. However, accuracy is comparable to that achieved for sex assessment based on isolated bones. For example, morphometric sex assessment for the metacarpals and/or phalanges we analyzed gives correct sex assignment for 74-94% of the samples (Scheuer and Elkington, 1993; Falsetti, 1995; Smith, 1996; Stojanowski, 1999; Case and Ross, 2007). In addition, morphometric data and resulting sex assignment depend on the population group studied (Case and Ross, 2007) and on the observers (Walrath et al., 2004). Although the extent of isotopic variability from one ethnic group to another still remains to be determined, the risk of inter-observer bias is small.

4. Voir Annexe B

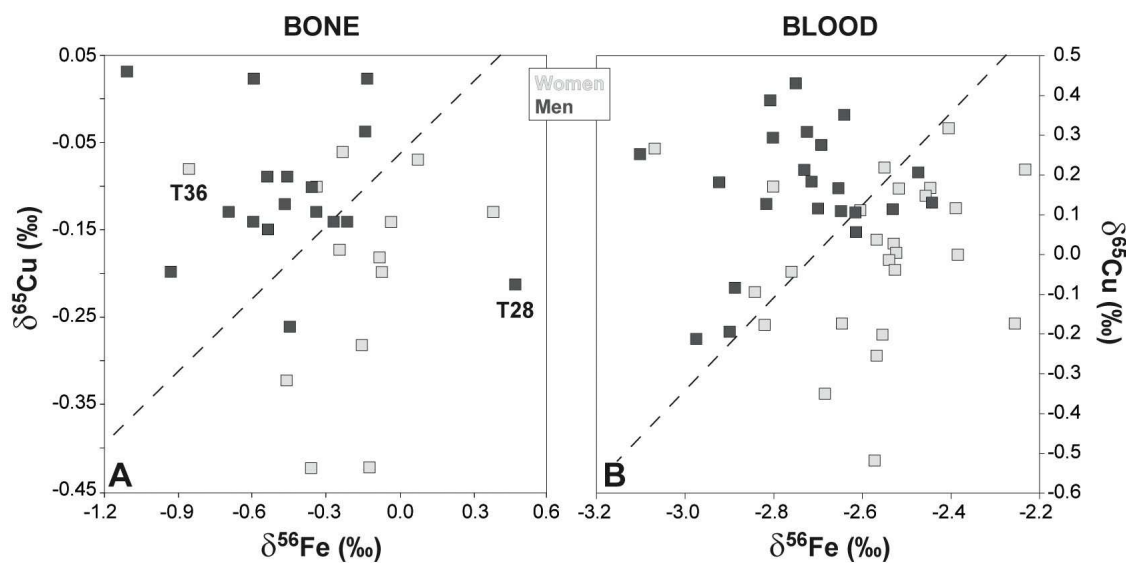


FIGURE 10.2.3: Distribution of blood (B) and bone (A) $\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{65}\text{Cu}$ values for women and men. A discriminant analysis has been used for visually confirming or rejecting the hypothesis that genders are isotopically distinct, which is represented by a discrimination line on the graphs. The percentage of correctly classified items is also given. A : Bone $\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{65}\text{Cu}$ discriminate women and men (Wilks' $\lambda=0.74$; $F = 4.88$; $df=2.28$; $p=0.015$). The dashed line is the discriminant line between women and men and provides a correct gender classification in 24 cases of 31 (77%). B : Blood data come from Albarede et al. (2011). The assignment is correct for 81% of the samples.

Our data do not show Fe isotopic differences in bones between women who apparently died before the age of 45 and those who died after 45 (Table 10.5). The age of menopause, around the 50th year, has not varied much since medieval times (McKinlay et al., 1972; Amundsen and Diers, 1973; Thomas et al., 2001). This implies that either menstrual loss is not a major factor in defining the Fe isotope composition in blood of fertile women or Fe isotope compositions of bones take more than 10 years to reach steady state with diet. The individuals affected by DISH and syphilis do not seem isotopically distinct from the others (Appendix⁵ S2).

Incorrect assignment of sex is observed for both bones and blood (Fig. 10.2.3). Bones of individuals T28 and T36 (Fig. 10.2.3A) clearly are outliers. Whereas investigation based on the Bruzek's (2002) method suggest that the individual T36 was a female, the Murail's (2005) method is not discriminant at 95% confidence level ($p=88$), which highlights the difficulty to do a reliable sex attribution for this individual. In contrast, sex assignment of man T28 is unambiguous. A perturbation of the Fe and Cu status can account for the incorrect assignment of this individual. Indeed, clearly incorrect isotopic-based sex assignment is observed among the blood samples : i.e. woman #15 (Fig. 10.2.3B) is characterized by iron depleted in ^{56}Fe and copper enriched in ^{65}Cu . Because all the samples from this data set were collected from 20-35 year old healthy donors (Albarède et al., 2011), any effect from menopause can be disregarded. Individual T28, a man whose bone isotope compositions of Fe and Cu fall within the range of women's bones, may have suffered from hemochromatosis. This genetic disorder leads to hepatic Fe overload and is known to affect the Fe stable isotope composition of blood (Krayenbuehl et al., 2005; Stenberg et al., 2005), with patient's blood expectedly iron enriched in ^{56}Fe relative to blood of healthy individuals. The cases of the blood of woman #15 and the bone of woman T36 remain more enigmatic. Validation of the present method would benefit from further studies of archaeological series for which sex is unequivocally assigned through DNA sequencing or of recent series for which the identity of the deceased person is well established.

Metal stable isotope compositions are unlikely to be reliable paleodietary indicators because there is no apparent relationship between the measured isotopic abundances of metals, carbon, and nitrogen. In addition, preliminary data on total blood sampled from individuals with a vegetarian diet show no remarkable differences in Fe stable isotope compositions relative to omnivores (Walczyk and von Blanckenburg, 2005). During intestinal uptake, Fe and Zn isotopes are significantly fractionated, but fractionation at this stage seems to overwhelm the isotopic variability of different food sources (Walczyk and von Blanckenburg, 2005; Balter et al., 2010).

Finally, this study illustrates that metal isotope fractionation between bones and whole blood is similar for men and women. $\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{66}\text{Zn}$ are higher in bones relative to blood by about 2.3‰ and 0.39 ‰, respectively. Blood Cu is enriched in ^{65}Cu with respect to bones by 0.25‰. The cause of metal isotope fractionation between blood

5. Voir Annexe B

and bones is unclear. Metals must be supplied to osteoblasts for bone formation via the extracellular matrix in an exchangeable form. As a first approximation, serum is a good representative of extracellular fluids. The average copper isotope composition is thus similar in serum and bones ($\sim -0.11\text{‰}$) (Albarède et al., 2011). Nevertheless, $\delta^{56}\text{Fe}$ (-1.25‰) and $\delta^{66}\text{Zn}$ (-0.62‰) in serum differ from $\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{66}\text{Zn}$ in bones, with apparent serum-bone fractionation of about -0.9‰ and $+1.4\text{‰}$, respectively (Fig. 1). Redox reactions involving Fe and Cu have been invoked as the origin of sex isotopic differences in blood (Albarède et al., 2011), but such reactions clearly do not account for Zn isotope variability. Substitution of the divalent cations Fe^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} with Ca^{2+} in the bioapatite crystal lattice is well documented (Duff, 1975). In the extracellular matrix, Cu bound to ceruloplasmin (Kosman, 2002) is in its divalent form and therefore readily substitutes with Ca^{2+} with no or minor isotopic effect. Iron, in contrast, is bound to transferrin in the 3+ oxidation state and hence must first be reduced to Fe^{2+} prior to uptake by the bioapatite crystal lattice. Partial oxidation of Fe to the 3+ state at this stage may therefore account for the rather large iron isotopic differences between serum and bones while Cu remains essentially unchanged. The isotope fractionation of Zn between blood and bones, with bones being heavier than serum by 1.4‰ , requires a different effect that can only be of configurational origin. This 1.4‰ difference is perfectly consistent with isotope fractionation at ambient temperature between Zn phosphates and Zn^{2+} predicted by ab initio calculations of Fujii et al. (pers. com).

CONCLUSIONS

The present study has shown that bones record the blood isotopic pattern. Iron and copper stable isotopes differ statistically between men and women's bones, but the intra-sex variability seems to be unrelated to age and diet. Zinc isotopes do not show sex difference, which suggests a role of redox reactions in the isotope fractionation process. The Fe and Cu isotopic record in blood from bones of a recent archaeological human series opens up new perspectives for sex assignment in paleoanthropological studies. However, further studies are necessary to strengthen the present results. First, the variability of metal stable isotope compositions in blood must be better documented in living populations in order to define the range of existing isotopic variations. Second, the method developed here should be validated on reference suites of human bones for which the age and the sex are known. This would be of interest for archaeological human remains for which sex has been assigned using fossil DNA, or for historical human remains for which sex was recorded during autopsy. Third, experimental studies using animal models are potentially useful to the understanding of the isotopic fractionation between blood and bones.

Acknowledgments : This work was supported by grants from the Bullukian Foundation and the Biomérieux Research Foundation. We thank Gilles Escarguel for helpful discussions and Jacques Samarut and the late Chantal Rabourdin from the Ecole Normale Supérieure de Lyon for their support despite the risky aspect of the project. We

are also grateful to the two anonymous reviewers for helpful comments and to Janne Blichert-Toft for careful English editing.

LITERATURE CITED

ALBARÈDE F, TELOUK P, Blichert-TOFT J, BOYET M, AGRANIER A, AND NELSON B. 2004. Precise and accurate isotopic measurements using multiple-collector ICPMS. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68 :2725-2744.

ALBARÈDE F, TELOUK P, LAMBOUX A, JAOUEN K, AND BALTER V. 2011. Isotopic evidence of unaccounted for Fe and Cu erythropoietic pathways. *Metallomics* 3 :926-933.

ALBARÈDE F. 1996. *Introduction to Geochemical Modeling*. Cambridge University Press.

AMUNDSEN DW, AND DIERS CJ. 1973. The age of menopause in medieval Europe. *Hum. Biol* 45 :605-612.

BALTER V, SIMON L, FOUILLET H, AND LÉCUYER C. 2005. Box-modeling of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in mammals. *Oecologia* 147 :212-222.

BALTER V, ZAZZO A, MOLONEY AP, MOYNIER F, SCHMIDT O, MONAHAN FJ, AND ALBARÈDE F. 2010. Bodily variability of zinc natural isotope abundances in sheep. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 :605-612.

BARANOWSKA I, CZERNICKI K, AND ALEKSANDROWICZ R. 1995. The analysis of lead, cadmium, zinc, copper and nickel content in human bones from the upper Silesian industrial district. *Sci. Total Environ* 159 :155-162.

BEATTIE JH, AND AVENELL A. 1992. Trace Element Nutrition and Bone Metabolism. *Nutrition Research Reviews* 5 :167-188.

BEHRENSMEYER AK, AND HILL AP. 1988. *Fossils in the Making : Vertebrate Taphonomy and Paleoecology*. University of Chicago Press.

BRUZEK J. 2002. A method for visual determination of sex, using the human hip bone. *Am. J. Phys. Anthropol.* 117 :157-168.

CASE DT, AND ROSS AH. 2007. Sex determination from hand and foot bone lengths. *J. Forensic Sci.* 52 :264-270.

COLARDELLE R. 2008. *La ville et la mort. Saint-Laurent de Grenoble, 2000 ans de tradition funéraire* : Bibliothèque de l'Antiquité Tardive, N°11, Turnhout, Belgium, Brepols Publishers, 413 p.

COUSINS RJ. 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc : special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiological Reviews* 65 :238 -309.

D'HAESE PC, COUTTENYE M-M, LAMBERTS LV, ELSEVIERS MM, GOODMAN WG, SCHROOTEN I, CABRERA WE, AND DE BROE ME. 1999. Aluminum, Iron, Lead, Cadmium, Copper, Zinc, Chromium, Magnesium, Strontium, and Calcium Content in Bone of End-Stage Renal Failure Patients. *Clin Chem* 45 :1548-1556.

DUFF. E, 1975. Interactions of divalent cations with apatites in *Physico-chimie et cristallographie des apatites d'intérêt biologique : colloques internationaux du Centre*

National de la Recherche Scientifique, Paris 10-15 septembre 1973. Centre National de la Recherche Scientifique.

FALSETTI AB. 1995. Sex assessment from metacarpals of the human hand. *J. Forensic Sci.* 40 :774-776.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., AND P. D. RYAN, 2001. PAST : Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1)

HERRSCHER E, AND KATZENBERG MA. 2008. Isotopic variability and health status in a French Historical Population. In : Bennike P, editor. *17th European Meeting of the Paleopathological Association, "Diseases of the Past"*. Copenhagen, Denmark, 25th-27th 2008 : Program et Abstracts. p 46.

HERRSCHER E, AND LE BRAS-GOUDE G. 2010. Southern French Neolithic populations : Isotopic evidence for regional specificities in environment and diet. *American Journal of Physical Anthropology* 141 :259-272.

HERRSCHER E, AND VALENTIN F. 2005. *Biométrie de la croissance et état nutritionnel à Saint Laurent de Grenoble (XIIIe-XVe siècles, France)*. In : Ardagna Y, Boëtsch G, Dutour O, Lalys L, and Signoli M, editors. *L'Homme et ses images : actes du XXVe colloque international du GALF, Marseille (2001)*. Marseille : G.A.L.F. p 74-85.

HERRSCHER E, BOCHERENS H, VALENTIN F, AND COLARDELLE R. 2001. Comportement alimentaire au Moyen-âge à Grenoble : application de la biogéochimie isotopique à la nécropole de Saint-Laurent (XIII-XV siècles Isère France). *Comptes rendus de l'Académie des sciences Série 2, Sciences de la terre et des planètes* 324 :479-487.

HERRSCHER E, COLARDELLE R, AND VALENTIN F. 2006. *Meulières et pathologies humaines : un rapport effectif? Analyse d'une documentation bucco-dentaire entre le XIIIe et le XVIIIe siècle à Grenoble*. In : Belmont A, and Mangartz F, editors. *Les meulières Recherche, protection et mise en valeur d'un patrimoine industriel européen (Antiquité-XXIe siècle)* p. 99-108.

HERRSCHER E, VALENTIN F, BOCHERENS H, AND COLARDELLE R. 2007. *Les squelettes de Saint-Laurent de Grenoble, des témoins de l'alimentation et de la santé au Moyen Age (XIIIe-XVe siècles, France)*. In : Audoin-Rouzeau F, and Sabban F, editors. *Un aliment sain dans un corps sain Perspectives historiques*. Tours : Presses Universitaires François-Rabelais. P. 123-138.

HERRSCHER E. 2003. Alimentation d'une population historique. Analyse des données isotopiques de la nécropole Saint-Laurent de Grenoble (XIIIe-XVe siècle France). *Bulletins et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris* 15(3-4) :149-269.

HERRSCHER E. 2011. *Inferring diet by stable isotope analysis : a case study from the French Alps*. In : Carver M, editor. *The Archaeology of Medieval Europe Vol 2 : The Twelfth to Sixteenth Centuries AD*. Aarhus, Copenhagen : Aarhus University Press.

INDRAYAN. 2006. *Biostatistics for Medical, Nursing and Pharmacy Students*. PHI Learning Pvt. Ltd.

KOHN MJ, SCHOENINGER MJ, AND BARKER WW. 1999. Altered states : effects of diagenesis on fossil tooth chemistry. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63 :2737-2747.

- KOSMAN DJ. 2002. *Copper-Containing Proteins*. Academic Press Inc. San Diego.
- KRAYENBUEHL P-A, WALCZYK T, SCHOENBERG R, VON BLANCKENBURG F, AND SCHULTHESS G. 2005. Hereditary hemochromatosis is reflected in the iron isotope composition of blood. *Blood* 105 :3812-3816.
- LAMBERT JB, VLASAK SM, THOMETZ AC, AND BUIKSTRA JE. 1982. A comparative study of the chemical analysis of ribs and femurs in Woodland populations. *Am. J. Phys. Anthropol* 59 :289-294.
- LYENGAR GV, KOLLMER WE, AND BOWEN HJ. 1978. *The Elemental Composition of Human Tissues And Body Fluids : a Compilation of Values for Adults*. Weinheim : Verlag Chemie.
- MARTÍNEZ-GARCÍA MJ, MORENO JM, MORENO-CLAVEL J, VERGARA N, GARCÍA-SÁNCHEZ A, GUILLAMÓN A, PORTÍ M, AND MORENO-GRAU S. 2005. Heavy metals in human bones in different historical epochs. *Science of The Total Environment* 348 :51-72.
- MARÉCHAL C, AND ALBARÈDE F. 2002. Ion-exchange fractionation of copper and zinc isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66 :1499-1509.
- MCKINLAY S, JEFFERYS M, AND THOMPSON B. 1972. An Investigation of the Age at Menopause. *Journal of Biosocial Science* 4 :161-173.
- MURAIL P, BRUZEK J, HOUËT F, AND CUNHA E. 2005. DSP : A tool for probabilistic sex diagnosis using worldwide variability in hip-bone measurements. *Bulletins et mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris* :167-176.
- OHNO T, SHINOHARA A, CHIBA M, AND HIRATA T. 2005. Precise Zn isotopic ratio measurements of human red blood cell and hair samples by multiple collector-ICP-mass spectrometry. *Anal Sci* 21 :425-428.
- OHNO T, SHINOHARA A, KOHGE I, CHIBA M, AND HIRATA T. 2004. Isotopic analysis of Fe in human red blood cells by multiple collector-ICP-mass spectrometry. *Anal Sci* 20 :617-621.
- SCHEUER JL, AND ELKINGTON NM. 1993. Sex determination from metacarpals and the first proximal phalanx. *J. Forensic Sci.* 38 :769-778.
- SCHMITT A. 2005. Une nouvelle méthode pour estimer l'âge au décès des adultes à partir de la surface sacro-pelvienne iliaque. *Bulletins et mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris* :89-101.
- Smith SL. 1996. Attribution of hand bones to sex and population groups. *J. Forensic Sci.* 41 :469-477.
- SPONHEIMER M, LEE-THORP J, DE RUITER D, CODRON D, CODRON J, BAUGH AT, AND THACKERAY F. 2005. Hominins, sedges, and termites : new carbon isotope data from the Sterkfontein valley and Kruger National Park. *Journal of Human Evolution* 48 :301-312.
- STENBERG A, MALINOVSKY D, ÖHLANDER B, ANDRÉN H, FORSLING W, ENGSTRÖM L-M, WAHLIN A, ENGSTRÖM E, RODUSHKIN I, AND BAXTER DC. 2005. Measurement of iron and zinc isotopes in human whole blood : Preliminary application

10.3 Composition isotopique des os crâniens et l'enregistrement de la différence homme/femme.

to the study of HFE genotypes. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19 :55-60.

STOJANOWSKI CM. 1999. Sexing potential of fragmentary and pathological metacarpals. *American Journal of Physical Anthropology* 109 :245-252.

STONE AC, MILNER GR, PÄÄBO S, AND STONEKING M. 1996. Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *American Journal of Physical Anthropology* 99 :231-238.

THOMAS F, RENAUD F, BENEFICE E, DE MEEÛS T, AND GUEGAN JF. 2001. International variability of ages at menarche and menopause : patterns and main determinants. *Hum. Biol* 73 :271-290.

VUORINEN HS, PIHLMAN S, MUSSALO-RAUHAMAA H, TAPPER U, AND VARRELA T. 1996. Trace and heavy metal analyses of a skeletal population representing the town people in Turku (Abo), Finland in the 16th-17th centuries : with special reference to sex, age and social background. *Sci. Total Environ* 177 :145-160.

WALCZYK T, AND VON BLANCKENBURG F. 2002. Natural Iron Isotope Variations in Human Blood. *Science* 295 :2065-2066.

WALCZYK T, AND VON BLANCKENBURG F. 2005. Deciphering the iron isotope message of the human body. *International Journal of Mass Spectrometry* 242 :117-134.

WALRATH DE, TURNER P, AND BRUZEK J. 2004. Reliability test of the visual assessment of cranial traits for sex determination. *American Journal of Physical Anthropology* 125 :132-137.

10.3 Composition isotopique des os crâniens et l'enregistrement de la différence homme/femme.

L'étude des ossements de Saint-Laurent de Grenoble a démontré l'enregistrement de la signature isotopique du sang dans les os. Cependant, la variabilité de la composition isotopique en fonction des populations et du type d'os n'est pas connue. Afin de vérifier l'enregistrement du dimorphisme sexuel isotopique dans d'autres types d'ossement, nous avons analysé des échantillons n'ayant jamais été ensevelis. Les échantillons sont ceux provenant du Centre de Conservation et d'Etude des Collections de Lyon. Il s'agit de condyles occipitaux qui sont principalement composés d'os spongieux.

10.3.1 Résultats

De façon surprenante, on ne parvient pas à dissocier deux groupes (Figure 10.3.1). Si les os des femmes sont une nouvelle fois enrichis en isotopes légers de façon significative ($p < 0.05$), les compositions isotopiques en fer des hommes ou des femmes ne diffèrent pas en moyenne. D'autre part, les rapports isotopiques des os crâniens se distinguent de ceux de la partie corticale des phalanges de Saint-Laurent de Grenoble (Figure 10.3.1). Cette différence est significative pour les trois éléments (Tableau 10.6).

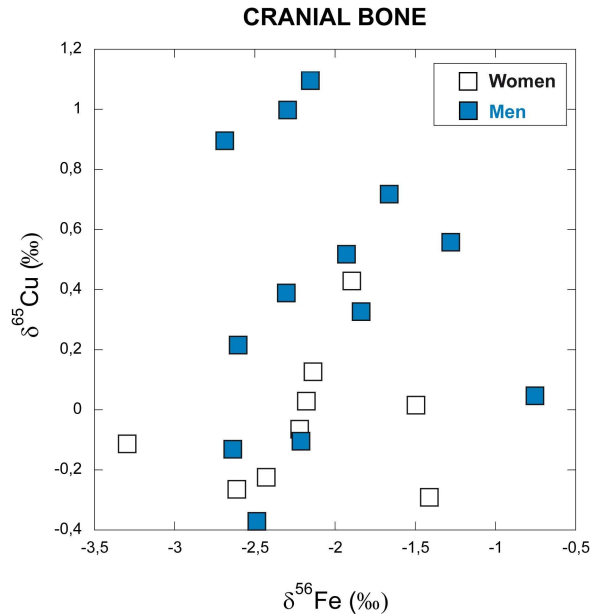


FIGURE 10.3.1: $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ dans des os crâniens d'hommes et de femmes.

10.3.2 Discussion

10.3.2.1 Différences isotopiques entre os cortical et os spongieux

Cas du fer

Rappelons que, du vivant de l'individu, la partie spongieuse de l'os contient la moelle rouge. C'est d'ailleurs dans cette moelle rouge que se déroule l'érythropoïèse. Il est alors intéressant de noter que les valeurs isotopiques des os spongieux occupent une position intermédiaire entre les os corticaux et les érythrocytes du sang (Figure 10.3.3). A partir de la figure 10.3.3, on peut distinguer trois groupes en fonction des compositions isotopiques :

- le groupe « RBC signature » comprenant les érythrocytes et le sang total, avec des valeurs isotopiques s'échelonnant entre -3.3 ‰ et -2 ‰. Le fer du sang total étant présent à 99% dans les érythrocytes, on peut considérer que le $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang total est celui des hématies.

- le groupe « extracellular signature » comprend l'émail dentaire, les os corticaux archéologiques et le plasma sanguin. Le point commun entre ces trois matériaux est le

10.3 Composition isotopique des os crâniens et l'enregistrement de la différence homme/femme.

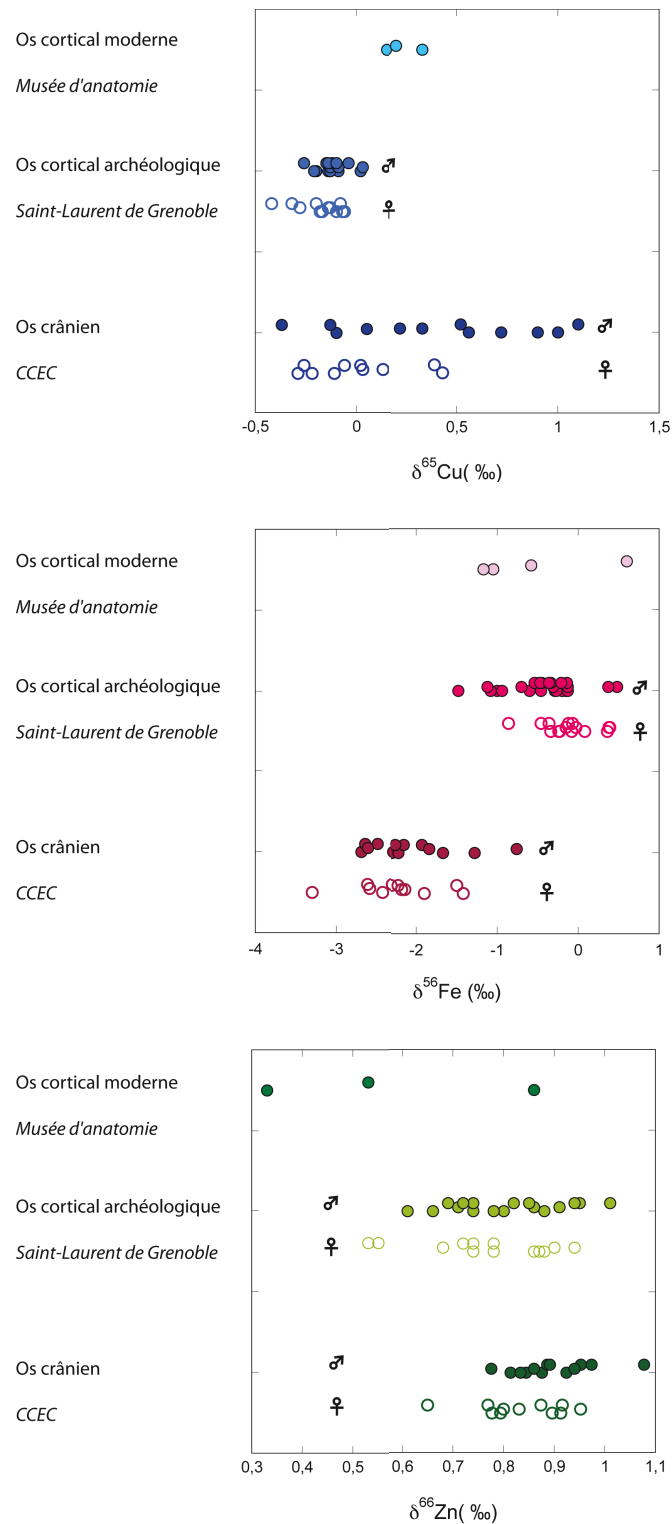


FIGURE 10.3.2: Composition isotopique d'os corticaux et crâniens (essentiellement spongieux), modernes et archéologiques

		Os cortical moderne (MAL)		Os spongieux moderne (CCEC)			
		χ^2	p	t	p	χ^2	p
Os cortical moderne (CCEC)	Fe					9.12	0.003
	Cu					0.14	0.71
	Zn					3.72	0.05
		χ^2	p	t	p	χ^2	p
Os cortical archéologique (SLG)	Fe	1.31	0.25	-13.55	2.10-12	44.13	3.10-11
	Cu	8.0	0.005	3.21	0.005	11.41	7.10-4
	Zn	2.50	0.11	3.25	0.004	5.65	0.02

TABLE 10.6: Résultats des tests statistiques Student (valeurs t) et Kruskal Wallis (valeurs χ^2) appliqués aux valeurs isotopiques des trois ensembles d'ossements. SLG : Saint-Laurent de Grenoble; MAL : musée d'anatomie de Lyon; CCEC Centre de conservation et d'étude des collections.

fait qu'ils appartiennent à un milieu extracellulaire. Le fer est complexé à la transferrine dans le plasma sanguin et probablement substitué au calcium au sein de l'hydroxyapatite de l'os cortical et de l'émail dentaire. Il est alors important de signaler que le fer intégré à l'émail et à l'os lors de leur formation et renouvellement provient du milieu extracellulaire.

- enfin, le troisième groupe est représenté par les os plats crâniens du CCEC. Ces os crâniens sont constitués d'une partie spongieuse et d'une fine partie corticale. La proportion entre cette partie corticale et spongieuse n'est pas la même en fonction des échantillons car la partie du condyle occipital échantillonnée n'était pas toujours la même en fonction des crânes. Rappelons que la partie spongieuse de l'os contient, du vivant des individus, la moelle rouge. L'os possède une surface poreuse qui adsorbe facilement les molécules organiques dans les zones vascularisées [Beebe et Posner, 1975]. Le fer présent dans les os du CCEC résulte probablement d'une combinaison du fer de l'hydroxyapatite et de celui provenant du sang, adsorbé à la surface des parties minéralisées.

Connaissant les concentrations moyennes du fer dans les hématies et les os corticaux, on peut estimer la contamination du sang pour chaque échantillon d'os du CCEC.

Soit x la proportion du fer érythrocytaire dans la signature isotopique des os crâniens du CCEC, on a :

$$x \cdot [\text{Fe}]_{\text{RBC}} \cdot \delta^{56}\text{Fe}_{\text{RBC}} + (1 - x) \cdot [\text{Fe}]_{\text{BioAp}} \cdot \delta^{56}\text{Fe}_{\text{BioAp}} = [\text{Fe}]_{\text{CB}} \cdot \delta^{56}\text{Fe}_{\text{CB}}$$

où $[\text{Fe}]_{\text{RBC}}$ et $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{RBC}}$ correspondent à la concentration et la composition isotopique du fer dans les RBC

$[\text{Fe}]_{\text{BioAp}}$ et $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{BioAp}}$ correspondent à la concentration et la composition isotopique du fer dans la bioapatite

$[\text{Fe}]_{CB}$ et $\delta^{56}\text{Fe}_{CB}$ correspondent à la concentration et la composition isotopique du fer dans les os crâniens du CCEC

D'après les données que nous avons obtenues sur les hématies de l'établissement français du sang, l'émail dentaire et les os, les concentrations en fer sont, en masse sèche, d'un ordre de grandeur respectivement égal à 1000 ppm, 0.01 ppm et 0.1ppm. On estime alors la proportion x entre 0.005% et 0.01% du fer érythrocytaire ayant contaminé les échantillons.

Cas du cuivre et du zinc

A nouveau, on constate que les $\delta^{65}\text{Cu}$ des os crâniens du CCEC occupent une position intermédiaire entre la composition isotopique des RBC et celle du groupe serum/os corticaux (Fig 10.3.3), mais ce n'est pas le cas du zinc. Néanmoins, si l'on reprend le calcul précédent et qu'on l'applique au cuivre, une contribution de 0.01% du cuivre érythrocytaire, présent à une concentration de 1.5 ppm en masse sèche (Annexe C), ne permet pas de modifier la composition isotopique de la bioapatite. Il faudrait en effet une concentration d'au moins 10%. On ne peut alors expliquer l'originalité des $\delta^{65}\text{Cu}_{CB}$ par rapport au $\delta^{65}\text{Cu}_{BioAp}$ par une contribution érythrocytaire. Ce constat est corroboré par les résultats obtenus sur le zinc (Figure 10.3.3). Les compositions isotopiques en cuivre et en zinc des os crâniens trouvent leur explication dans un autre paramètre physiologique qui sera développé au cours de la quatrième partie de cette thèse (chapitre 14).

10.3.2.2 Différences isotopiques entre les os crâniens des hommes et des femmes

Les os crâniens du CCEC se caractérisent par des valeurs similaires, en moyenne, pour le $\delta^{56}\text{Fe}$ des hommes et des femmes (Fig 10.3.1). Cela peut s'expliquer par la variabilité des proportions de fer provenant de l'os et des hématies au sein de cet os. Le « mélange » $\delta^{56}\text{Fe}_{BioAp}$ et $\delta^{56}\text{Fe}_{RBC}$ efface alors la différence liée au sexe. Ce mélange n'affecte pas la composition isotopique en cuivre et la différence isotopique homme/femme est conservée ($p < 0.05$).

10.3.3 Conclusion

Les os crâniens provenant du CCEC sont essentiellement constitués d'os spongieux mais contiennent aussi une enveloppe corticale. Nos prélèvements du condyle occipital concernent ainsi ces deux types d'os dans des proportions variables, même si la partie spongieuse reste majoritaire.

Les compositions isotopiques du fer, cuivre et zinc se distinguent de celles des os corticaux de Saint-Laurent de Grenoble. L'origine de ces variations sera développée dans le prochain chapitre. On peut d'ores et déjà affirmer que la différence isotopique liée au sexe n'est pas conservée pour le $\delta^{56}\text{Fe}$ en raison d'une contamination plus ou moins

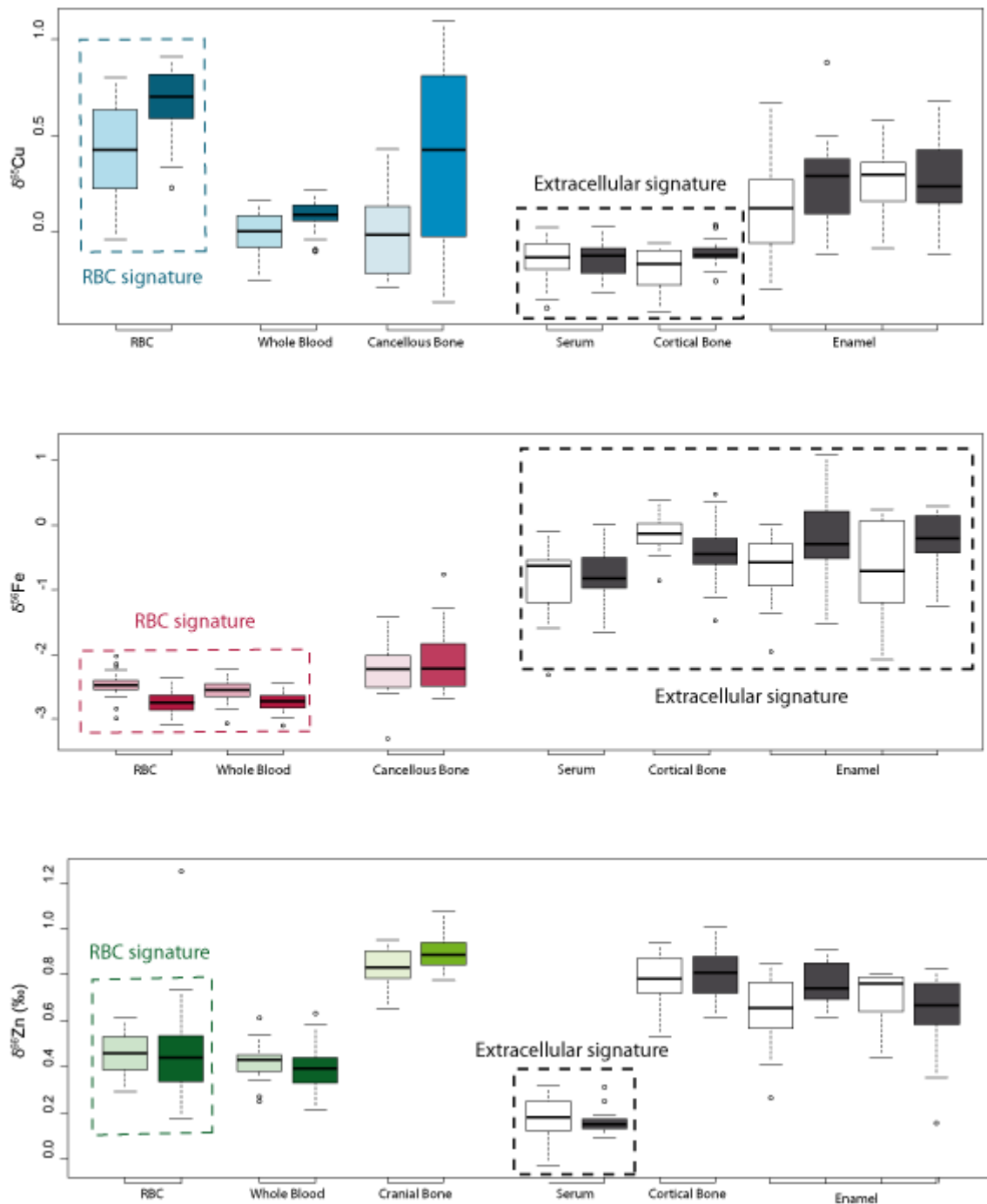


FIGURE 10.3.3: Boîtes de dispersion des valeurs isotopiques du sang, des os et de l'émail dentaire pour le cuivre, fer et zinc pour chaque sexe. Les boîtes de couleur foncées correspondent aux données obtenues pour le sexe masculin, les boîtes claires étant alors associées au sexe féminin. Les données sanguines proviennent de Albarède et al., 2011 (40 individus). Les données associées à la population de Saint-Laurent de Grenoble (SLG) sont celles correspondant aux os corticaux de phalanges (43 individus) et à l'émail dentaire (20 individus). Les données associées à la population du CCEC sont les os crâniens (24 individus) et l'émail dentaire (24 individus).

10.3 Composition isotopique des os crâniens et l'enregistrement de la différence homme/femme.

importante de l'os par le fer érythrocytaire. Cette contamination est faible (0.01% environ) mais le fer est si concentré dans le sang qu'elle suffit à engendrer une modification isotopique significative. Les os des hommes restent cependant enrichis en isotopes lourds du cuivre par comparaison avec ceux des femmes.

Nous estimons dès lors qu'il est important, même pour des os modernes ou momifiés, d'échantillonner la partie corticale des os dans un but de détermination du sexe. Ainsi, on évite la contamination du sang propre à la partie spongieuse.

Chapitre 11

Potentiel de l'émail dentaire pour l'enregistrement du « sexe isotopique ».

11.1 Introduction

L'étape suivante concernant l'établissement des perspectives d'une méthode isotopique de détermination du sexe est l'étude des abondances naturelles de l'émail dentaire. L'émail dentaire est un matériau très peu poreux composé de larges cristaux de bioapatite. Ces particularités le rendent beaucoup moins sensible à la contamination du sol [Tuross *et al.*, 1989, Kohn *et al.*, 1999, Budd *et al.*, 2000]. L'analyse d'ossements archéologiques par Martinez-Garcia *et al.* (2005) révèlent des concentrations en éléments traces bien supérieures à celles d'ossements n'ayant jamais été enterrés. Si la population archéologique que nous avons étudiée, enterrée depuis moins de 300 ans, a été préservée de la contamination post-mortem, cela ne sera pas nécessairement le cas de populations d'autres sites, même d'âges similaires. Il convient alors, dans une perspective de développement d'un outil de détermination de « sexe isotopique », d'étudier l'enregistrement des variations du $\delta^{56}\text{Fe}$ et du $\delta^{65}\text{Cu}$ dans l'émail dentaire. Rappelons néanmoins que l'émail dentaire se forme pendant l'enfance et l'adolescence des individus et n'est pas remanié par la suite. Pour pouvoir détecter des différences liées au sexe, il est alors nécessaire que la différence isotopique en cuivre et en fer entre les femmes et les hommes soit déjà existante pendant leur enfance ou adolescence.

11.1.1 Développement dentaire

Le développement dentaire a été très étudié, autant dans le domaine de l'odontologie que dans le domaine de l'anthropologie et de la médecine légale. Il a en effet rapidement été remarqué que la chronologie de la formation et de l'éruption des dents étaient beaucoup moins affectée par les conditions de vie des individus que ne l'est le développement osseux [Demirjian *et al.*, 1985, Cardoso, 2005]. Au cours des années

60 et 70, un certain nombre d'études basées sur des radiographies d'enfants ont permis d'établir les stades de développement des dents, de leur formation à leur éruption, et ainsi de proposer de nouvelles méthodes de détermination de l'âge des individus [Demirjian *et al.*, 1973, Anderson *et al.*, 1976, Nolla, 1960, Moorrees *et al.*, 1963]. La formation des dents est un processus continu. On peut néanmoins y distinguer plusieurs événements, tels que le début ou la fin de la formation de la couronne. Ces distinctions permettent de réaliser des comparaisons avec des critères normalement insensibles à l'observateur. Certains critères posent éventuellement problème, telle que la fin de la croissance de la racine : la longueur des racines est en effet variable d'un individu à un autre [Liversidge, 2008].

Notre but étant d'analyser l'émail dentaire, nous nous intéresserons uniquement à la chronologie de l'amélogénèse. Moorrees *et al.* (1963) ont proposé de décrire 6 stades pour la formation de la couronne de la dent quand Demirjian *et al.* (1973) et Nolla *et al.* (1960) en proposent quatre. Ces descriptions ont largement été réutilisées par la suite (e.g.[Smith, 1991, Mincer *et al.*, 1993, El-Yazeed *et al.*, 2008, Bala *et al.*, 2010, Liversidge, 2010]). La plupart des couronnes des dents sont complètement formées chez les enfants âgés de plus de 9 ans. Les troisièmes molaires font exception à ce constat. (Tableau 11.1). Pour ces dents, l'amélogénèse se déroule en effet entre 7 et 16 ans [Hillson, 1996]. L'âge moyen de début de formation de la couronne de ces dents est d'environ 9 ans et demi, quelque soit l'étude, et se termine en moyenne autour de 13 ans (Tableau 11.1). Cependant, l'écart-type autour de ces moyennes est assez élevé par comparaison avec les autres molaires, ce qui témoigne d'une mise en place plus aléatoire que celle existant pour les autres dents [El-Yazeed *et al.*, 2008]. Malgré cette variabilité, les âges ne semblent pas significativement varier en fonction des populations à l'exception de la population noire sud-africaine (Tableau 11.1.2). Ces méthodes donnent également de très bons résultats sur des populations médiévales ou de l'époque moderne [Beyer-Olsen et Risnes, 1994, Liversidge, 1999]. Ce dernier constat peut sembler étonnant mais nombre d'études indiquent que les conditions environnementales, dont le régime alimentaire, n'influencent pas la formation des dents [Cardoso, 2005, Cameriere *et al.*, 2007] même si elles peuvent en modifier l'éruption [Alvarez, 1995]. Il doit pourtant être mentionné que certains auteurs observent une accélération du développement dentaire ces quarante dernières années [Holtgrave *et al.*, 1997]. Ce décalage pourrait par ailleurs expliquer pourquoi les études actuelles donnent des temps de formation plus courts que ceux proposés par les études des années 70's. [Liversidge, 1999]¹

Dès lors, on peut soutenir l'hypothèse d'un déroulement du développement dentaire des individus de Saint-Laurent de Grenoble des XVII et XVIII^{ème} siècles ainsi que ceux du CCEC similaire à celui des individus ayant permis d'élaborer les méthodes des années

1. Certains travaux reportent en effet des biais lors de l'application de méthodes à des échantillons actuels (Liversidge *et al.*, 1999, Liversidge *et al.*, 2010) alors que l'application à d'autres populations des années 70's-80's donnent des résultats très satisfaisants (e.g. Nystrom *et al.* , 1986).

70. Mais peut-on réaliser le même constat pour la ménarche ?

Etude	Population	Nature des données	C_i/A		C_{rc}/D	
			M	F	M	F
Schour and Massler (1940)*		Gamme totale	7-10		12-16	
Moorres et al (1963)	Américains (Etats Unis)	Moyenne	9.3	9.6	12.0	12.3
Fanning and Brown (1971)*	Australiens	3ème-97ème percentile	7-11.3	7.7-12.4	10.4-15.2	10.6-17.5
Anderson et al (1976)	Canadiens Caucasiens	Moyenne	9.4	9.4	13.3	12.8
Haavikko (1970)*	Finnoise	Médiane	9.8	9.6	13.7	13.3
Levesque et al (1981)	Canadiens- Français	10ème-90ème percentile	7.9-11.6	8-11.8	11.5-15.5	11.2-15.2
Liversidge et al (2008)	Sud-Africains	Moyenne	7.92	7.88	13.38	12.65
Liversidge et al (2008)	Métis du Cap	Moyenne	9.89	9.54	13.95	13.61
Liversidge et al (2008)	Anglais originaire du Bangladesh	Moyenne	8.92	8.95	13.77	13.42
Liversidge et al (2008)	Anglais Caucasiens	Moyenne	9.69	9.78	14.23	14.21
Mincer et al (1993)	Américains	Moyenne			15.5	16
					M ³ ; 16	
					M ₃	

TABLE 11.1: Age de formation des troisièmes molaires en fonction des études. *données reportées par Hillson (1996)

11.1.2 Age de la puberté et de la ménarche

La ménarche² est un événement impossible à déterminer dans un registre fossile. Cependant, un certain nombre d'études ont permis d'évaluer l'âge moyen de son occurrence et les paramètres susceptibles d'influencer cet âge, comme en témoignent les données publiées rassemblées par Thomas *et al.* en 2001. La ménarche survient lorsqu'un certain nombre de paramètres physiologiques, tels que le taux d'hormones

2. c.f. glossaire

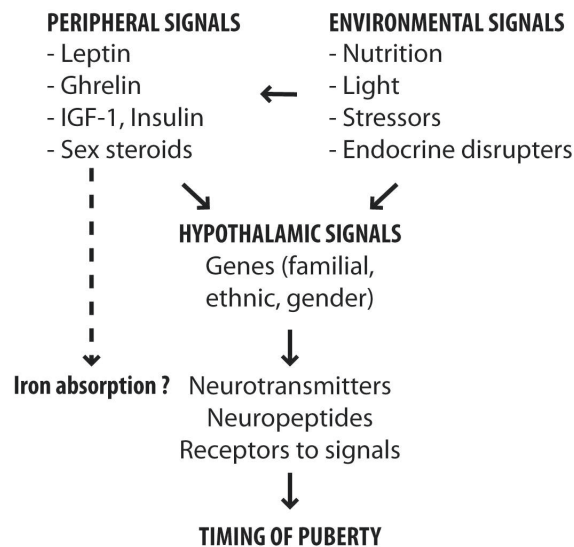


FIGURE 11.1.1: Paramètres biologiques et environnementaux influençant l'âge de la ménarche (D'après Parent *et al.*, 2003 et Woodhead *et al.*, 1991)

sexuelles, sont à un niveau suffisant [Parent *et al.*, 2003]. Néanmoins, ces paramètres physiologiques répondent à la fois à des paramètres génétiques et environnementaux (Figure 11.1.1). Ainsi, il semble qu'une alimentation riche accélère l'arrivée des premières menstruations [Eveleth, 1986, Matkovic *et al.*, 1997, Chowdhury, 2000, Okasha, 2001, Thomas *et al.*, 2001] et qu'une intense activité physique la retarde [Frisch *et al.*, 1980; Frisch *et al.*, 1981]. Le décalage observé entre les pays avec l'âge moyen de ménarche le plus précoce et le plus tardif est de plus de 4 ans. Il a en effet été évalué à 12 ans en Grèce en 1984 et à 16,1 ans au Sénégal en 1997 [Thomas *et al.*, 2001]. La croyance attribuant une ménarche précoce aux pays tropicaux est parfaitement erronée [Zacharias et Wurtman, 1969, Thomas *et al.*, 2001]. Les différences d'âge de ménarche sont donc significatives en fonction des populations, au contraire du développement dentaire.

Les conditions socio-économiques influencent l'âge de la ménarche en modifiant l'accès à la nourriture, le travail des enfants et la santé. Par conséquent, on s'attend à une variation séculaire de cet âge de ménarche dans l'essentiel des pays qui ont connu une amélioration des conditions de vie ces derniers siècles. Cette variation séculaire est bien réelle : elle est rapportée par de nombreux auteurs dans plusieurs pays [Zacharias et Wurtman, 1969, Wyshak, 1983, Eveleth, 1986, Okasha, 2001, Cho et Hwang, 2009]. La France ne fait pas exception à cette règle : à partir des estimations de médecins et des enquêtes en clinique, Shorter (1981) propose un âge moyen des premières règles de 15,9 ans entre 1750 et 1799 pour des femmes appartenant à différentes classes sociales (Figure 11.1.2). Cet âge est, actuellement, estimé de 12,8

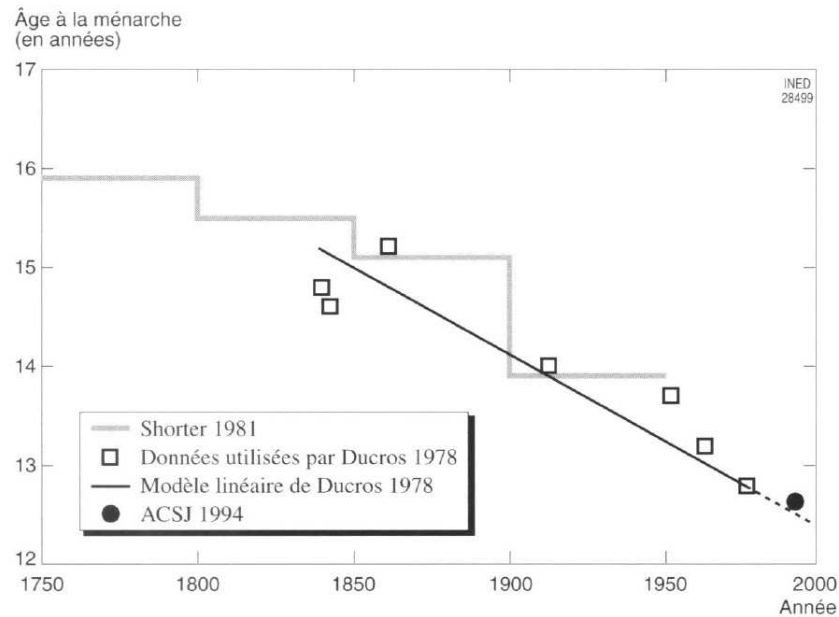


FIGURE 11.1.2: Âge à la ménarche en France au cours des derniers siècles (La Roche Brochard, 1999)

ans en France [Gaudineau *et al.*, 2010]. La décroissance semble remarquablement linéaire au cours des derniers siècles (Figure 11.1.2; De La Rochebrochard, 2000). Cependant on remarque que l'âge moyen actuel équivaut à celui de 1978 : comme dans d'autres pays, on observe actuellement une stabilisation de cet âge entre 12,5 et 13 ans [Vercauteren *et al.*, 1986, Helm et Grønlund, 1998, Whincup *et al.*, 2001]. Cette loi linéaire connaît d'autres exceptions : Clavel Chapelon *et al.* (2002) rapportent une élévation de l'âge à la ménarche pour les femmes nées dans les dix ans précédents la seconde guerre mondiale. Encore une fois, ce sont les conditions socio-économiques qui doivent être incriminées. On soulignera également qu'il existe aussi une stabilisation de l'âge moyen pour les périodes antérieures à 1750. En effet Amundsen and Diers (1970; 1973) reportent des âges de puberté compris entre 13 et 14 ans en Grèce et Rome antique et 12 à 15 ans entre le VI et XV^{ème} siècles (Données reprises par Diers, 1974). Si ces âges sont plus faibles que ceux proposés par Shorter, il ne faut pas oublier que les estimations portent sur des individus de classes sociales élevées ; l'âge est par conséquent sous-estimé [Eveleth, 1986].

Si les paramètres socio-économiques sont capables de modifier la chronologie de la ménarche, c'est parce qu'ils influent sur la sécrétion d'hormones sexuelles. En reprenant l'hypothèse de Woodhead *et al.* (1991), on peut imaginer que pour des mauvaises conditions de nutrition, la différence d'absorption intestinale se met en place plus tardivement dans l'enfance (Figure 11.1.3). Hélas, aucune étude ne permet, à notre connaissance,

d'étayer ce propos. Cependant, compte tenu des données que nous venons d'évoquer sur la chronologie de la puberté, de la ménarche et du développement des troisièmes molaires, on peut espérer voir un enregistrement de la différence isotopique dans l'émail dentaire pour n'importe quelle population si l'absorption intestinale est le facteur de différence isotopique. Le cas échéant, on peut espérer voir un décalage isotopique en $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ pour des populations où la ménarche se déroule autour de 12 ans en échantillonnant l'émail dentaire le plus récemment formé.

11.1.3 Origine de la différence isotopique en cuivre/fer chez les adultes

Très peu d'étude portent sur le stade d'avancement du développement dentaire au moment de la ménarche. Cho et Hwang démontrent en 2009 que parmi les filles menstruées, 80% d'entre elles sont au stade de développement dentaire compris entre A et D selon la description de Demirjian *et al.* (1973). La figure 11.1.3 recense les gammes d'âge et âge moyen pour lesquels se déroulent ces événements, d'après les données de la littérature citées plus haut. On y retrouve aussi la gamme d'âge proposée par Klein *et al.*, 1994 et Mitomura *et al.*, 2000 pour l'augmentation des hormones sexuelles dans le sang, susceptibles d'engendrer une différence d'absorption intestinale des métaux [Woodhead *et al.*, 1991, Johnson *et al.*, 1992]. Cette gamme a été déterminée pour des Nord-Américains. Etant donné que les conditions environnementales influent sur l'âge de la ménarche et que cet événement est déclenché lorsque les hormones sexuelles dépassent un seuil critique, on peut raisonnablement supposer que ces conditions retardent l'augmentation de la sécrétion d'hormones sexuelles (Figure 11.1.3).

Sachant que le corps d'une femme contient environ 3 g de fer et 80 mg de cuivre [Hunt *et al.*, 2009, Linder et Hazegh-Azam, 1996] et que l'apport journalier de ces éléments est respectivement de 1 mg et 1,6 mg [Johnson *et al.*, 1992, Linder et Hazegh-Azam, 1996, Hunt *et al.*, 2009], le renouvellement total du cuivre prend une cinquantaine de jours quand celui du fer est de 8 ans. L'ensemble de ces données nous permet de dresser les scénarios susceptibles d'être observés dans l'émail dentaire pour les valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ selon le mécanisme de différenciation isotopique des sexes.

11.1.3.1 Absorption intestinale comme origine de la différence isotopique homme/femme

Actuellement, l'absorption intestinale du fer diffère significativement entre les garçons et les filles âgés de 7 à 11 ans. Pour le cuivre, aucune étude ne porte sur les préadolescents, mais les hormones sexuelles sont à cette période à un niveau suffisant pour stimuler

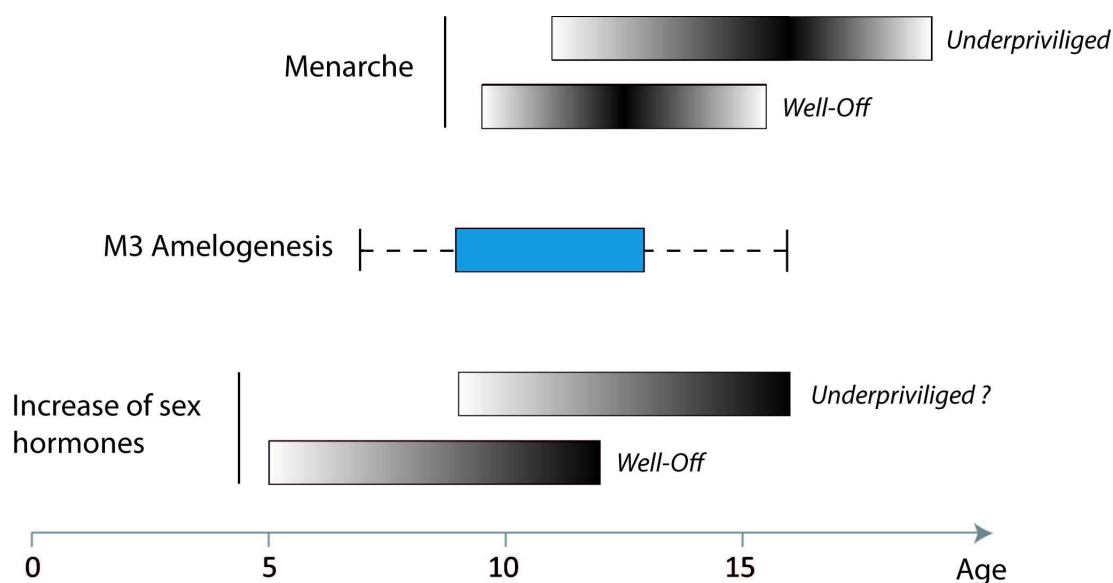


FIGURE 11.1.3: Chronologie de la ménarche, l'amélogénèse des troisièmes molaires et de l'augmentation des hormones sexuelles dans le temps en fonction des conditions socio-économiques.

chez les jeunes filles l'absorption du cuivre. Le décalage isotopique devrait débuter au moment où les hormones sexuelles commencent à augmenter. D'après nos estimations de temps de renouvellement du fer, ce décalage devrait s'étaler sur une durée de 8 ans alors qu'il prendrait moins de 2 mois pour le cuivre. Ainsi, pour le cuivre, les valeurs du sang des filles de 9 ans devraient différer de celles des garçons et pourraient même s'en distinguer dès l'âge de 6-7 ans. Dans des conditions socio-économique moins favorables, on peut s'attendre à ne voir cette différence apparaître qu'entre 10 et 11 ans. Sachant que dans la majorité des cas, l'amélogénèse des troisièmes molaires se déroule entre 9 et 13 ans, on devrait pouvoir enregistrer une différence isotopique en cuivre entre filles et garçons pour une population favorisée. Dans le cas d'une population subissant une pression environnementale, cette différence apparaîtrait lorsque l'émail proche du collet est prélevé. Concernant la différence isotopique en fer, elle ne pourrait être observée que pour des prélèvements proches du collet dans le cas d'une population favorisée.

11.1.3.2 Répartition différentielle des réserves de fer et cuivre entre organes comme origine de la différence isotopique homme/femme

Dans un contexte socio-économique défavorable, on observe un âge moyen de ménarche autour de 16 ans. A cet âge, l'émail dentaire des troisièmes molaires est complètement formé. Il n'y a donc aucune chance d'enregistrer une différence isotopique homme/femme. Par contre, dans des populations où l'âge moyen se situe autour de 12 ans, on peut espérer enregistrer une différence en cuivre si les prélèvements sont ciblés au niveau du collet.

11.1.4 But de l'étude et hypothèses de travail

Nous avons cherché à déterminer les compositions isotopiques de dents de sagesse pour des populations présentant des âges de ménarche théoriquement distincts : la population de Saint-Laurent de Grenoble pour laquelle nous avons étudié les phalanges (XVII-XVIII^{ème} siècles), des dents provenant des crânes que nous avons analysés (fin XIX^{ème}) et des dents actuelles extraites chez des dentistes entre 2009 et 2011. La comparaison de la population de Saint-Laurent de Grenoble aux deux autres populations permettra d'évaluer l'influence de la contamination post-mortem. Pour cela, nous emploierons les mêmes méthodes que celles développées dans l'annexe D, c'est à dire les tests de corrélation entre rapports isotopiques et concentration ainsi que la comparaison des données archéologiques avec les données modernes issues de ce travail et de la littérature, pour les concentrations comme pour les abondances isotopiques. La mise en évidence ou l'absence de différence isotopique permettront de conclure sur les perspectives de l'émail dentaire comme outil de sexage et d'évaluer l'origine de la différence isotopique homme/femme.

11.1.5 Analyse de l'émail dentaire des trois populations

Les troisièmes molaires de la population de Saint-Laurent de Grenoble et du CCEC proviennent des mêmes individus sur lesquels les phalanges et les os crâniens avaient été prélevés. Sur certains squelettes ne présentant pas de M3, des M2 ont été échantillonnées (Annexe C). Au regard des estimations de Shorter (1981), l'âge à la ménarche se situe autour de 16 ans pour la population de Saint-Laurent de Grenoble. En reprenant le modèle linéaire de Ducros (1978) et les données de Shorter (1981), cet âge doit se situer autour de 14.5 pour les femmes décédées dans les hôpitaux civils de Lyon. Enfin, pour les échantillons actuels, il a été demandé aux patientes de communiquer leur âge à la ménarche, reporté ici dans le tableau 11.2.

Id	Année de naissance	Ménarche
E2	1948	11
E3	1958	NA
E6	1981	12
E8	1964	13.5

TABLE 11.2: Année de naissance et âge à la ménarche et année de naissance des patientes ayant fourni une troisième molaire entre 2009 et 2011. N.A. : Absence de donnée.

L'émail dentaire se dépose en couches successives (Chapitre 4, Fig 4.1.4). Les derniers dépôts sont réalisés au niveau de la jonction cémento-énamélique, également appelée

collet. Par conséquent, nous avons cherché à échantillonner cette région, afin d'augmenter les chances d'enregistrer un signal énamélique post-pubertaire. Cela n'a été possible que pour des dents suffisamment larges pour permettre un prélèvement de matière d'au moins 25 mg (Annexe C). On ne peut en effet descendre en dessous de cette quantité de matière sans quoi la concentration en cuivre passe sous la limite de détection du MC-ICP-MS de 50 ppb.

11.1.6 Résultats

11.1.6.1 Diagenèse

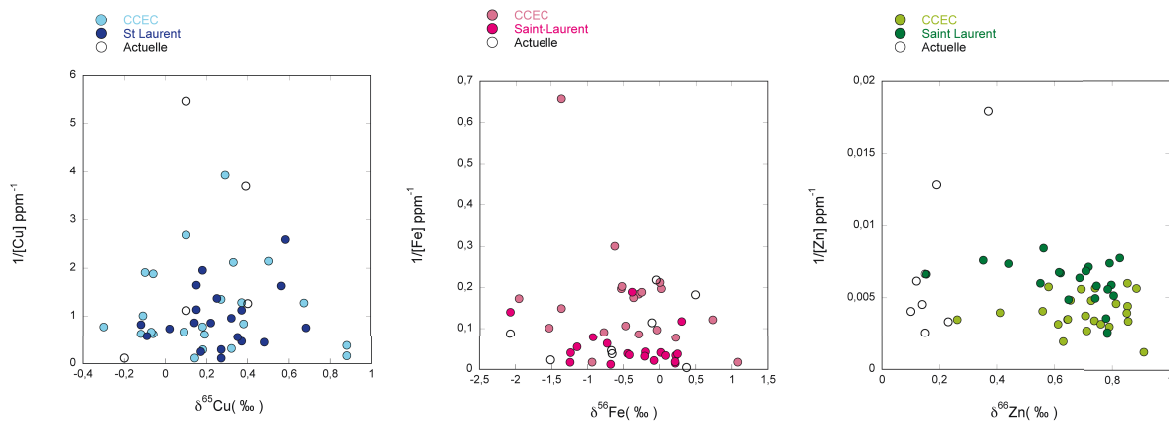


FIGURE 11.1.4: Relation entre données isotopiques et élémentaires pour les populations actuelle, du CCEC et de Saint-Laurent de Grenoble.

Les données isotopiques et élémentaires obtenues sur l'émail dentaire des dents des populations de Saint-Laurent de Grenoble, du CCEC et de patients contemporains sont données Annexe C. Elles sont également résumées dans le tableau 14.1 par des statistiques descriptives. Les gammes de concentrations sont identiques pour chaque élément pour les trois populations. Elles correspondent également à l'ordre de grandeur signalé dans la littérature [Nixon *et al.*, 1967, Young, 1975, Whittaker et Stack, 1984, Blanuša *et al.*, 1990, Gross et Berndt, 2002]. De même, les abondances isotopiques du fer, cuivre et zinc montrent la même gamme de variabilité dans les échantillons archéologiques et anatomiques, à l'exception des $\delta^{66}Zn$ des échantillons actuels, significativement appauvris en zinc lourd par rapport aux autres dents (Tableau 14.1). Il n'existe pas de corrélation entre rapports isotopiques et concentrations pour la population de Saint-Laurent de Grenoble, comme pour les deux autres populations.

StL	Cuivre						Fer						Zinc					
	$\delta^{65}\text{Cu}$			Cu ppm			$\delta^{56}\text{Fe}$			Fe ppm			$\delta^{66}\text{Zn}$			Zn ppm		
	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n
F	0.26	0.20	8	1.96	1.22	8	-0.69	0.80	8	31.08	22.94	8	0.70	0.13	8	173.34	50.18	8
H	0.27	0.23	12	1.68	2.23	12	-0.25	0.47	12	30.05	19.28	12	0.62	0.20	12	175.18	71.34	12
F+H	0.27	0.21	20	1.79	1.86	20	-0.42	0.64	20	31.79	20.23	20	0.65	0.17	20	174.44	62.25	20
CCEC	$\delta^{65}\text{Cu}$			Cu ppm			$\delta^{56}\text{Fe}$			Fe ppm			$\delta^{66}\text{Zn}$			Zn ppm		
	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n
F	0.12	0.27	10	1.92	2.31	11	-0.70	0.61	10	12.06	15.09	11	0.64	0.18	11	275	93	11
H	0.29	0.33	13	1.67	1.61	13	-0.25	0.86	9	10.54	14.28	12	0.76	0.10	13	293	162	13
F+H	0.22	0.31	23	1.79	1.92	24	-0.49	0.75	19	11.24	14.35	24	0.70	0.15	24	285	132	24
Actuels	$\delta^{65}\text{Cu}$			Cu ppm			$\delta^{56}\text{Fe}$			Fe ppm			$\delta^{66}\text{Zn}$			Zn ppm		
	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n
F	0.10	0.24	4	2.77	3.93	4	-0.10	0.55	5	55.15	91.13	5	0.20	0.1	5	177	90	5
H	0.10	0.42	2	5.3	7.72	3	-1.24	1.02	3	21.18	19.25	3	0.15	0.05	3	238	157	3
F+H	0.10	0.27	6	3.86	5.42	7	-0.53	0.9	8	42.41	71.97	8	0.18	0.09	8	200	112	8

TABLE 11.3: Statistiques descriptives pour l'émail dentaire (M3 et éventuellement M2 pour les hommes) des trois populations étudiées : moyenne, écart-type et nombre d'échantillons des données isotopiques et élémentaires par sexe et par population, résultats des tests de student testant les différences liées au sexe.

Population	Actuelle						Saint-Laurent					
	$\delta^{65}\text{Cu}$		$\delta^{56}\text{Fe}$		$\delta^{66}\text{Zn}$		$\delta^{65}\text{Cu}$		$\delta^{56}\text{Fe}$		$\delta^{66}\text{Zn}$	
	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
Actuelle							1.80	0.18	0.58	0.44	14.94*	1.1 10 ⁻⁴
CCEC	0.41	0.52	0.13	0.71	17.09*	3.6 10 ⁻⁵	0.66	0.41	0.47	0.49	0.40	0.72

TABLE 11.4: Valeurs des χ^2 pour les tests de Kruskal-Wallis portant sur les $\delta^{66}\text{Zn}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{56}\text{Fe}$ de l'émail dentaire de trois populations. Le symbole * indique une différence significative $p < 0.05$.

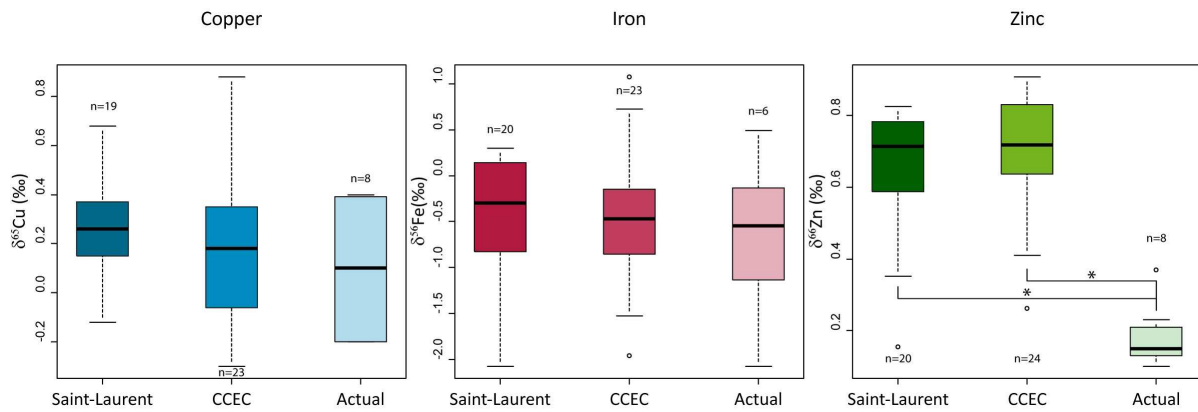


FIGURE 11.1.5: $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$ de l'émail dentaire de troisièmes molaires de Saint-Laurent de Grenoble, du CCEC et de patients de cabinets dentaires.

11.1.6.2 Sexe isotopique

Les $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ de l'émail dentaire sont, en moyenne, identiques entre les hommes et les femmes (Fig 11.1.6). Les $\delta^{66}\text{Zn}$ sont identiques entre hommes et femmes pour la population de Saint-Laurent de Grenoble et pour les dents actuelles. Les $\delta^{66}\text{Zn}$ des dents des individus du CCEC diffèrent par contre de façon significative en fonction du sexe (t test $p < 0.05$).

11.1.6.3 Incertitude sur les données de cuivre et de fer

Lors de la mesure du $\delta^{65}\text{Cu}$ de l'émail dentaire, 9 échantillons contenaient moins de 50 ppb. Or, l'étude sur les standards évoquée chapitre 9 révèle des incertitudes sur les mesures en dessous de cette concentration. On se situe en effet très près de la limite de détection du MC-ICP-MS. C'est pour cette raison que la mesure de l'échantillon J76 n'a pas été possible (Annexe C). Pour ces échantillons, les résultats sont sensiblement les mêmes quel que soit le rapport isotopique du zinc utilisé pour la correction, à l'exception du J76 qui a été écarté. Leurs valeurs ne diffèrent pas de celles des échantillons plus concentrés. S'ils ne sont pas pris en compte, les tendances isotopiques entre hommes et femmes pour le cuivre et fer restent les mêmes.

Pour le fer, le problème est différent. Les échantillons sont suffisamment concentrés pour pouvoir être analysés dans des conditions optimales. Cependant, il subsiste des traces de calcium dans certains échantillons qui génère une instabilité de la machine. Certains échantillons sont alors déterminés avec une incertitude relativement élevée alors qu'ils ne peuvent pas être analysés une deuxième fois (Annexe C). Cependant, qu'ils soient ou non pris en compte, les résultats statistiques restent similaires.

11.1.6.4 Impact du prélèvement au niveau du collet

Sur les 24 dents échantillonnées, celles pour lesquelles le prélèvement a été réalisé au niveau du collet sont au nombre de 7, dont 4 ayant appartenu à des femmes. Nous avons donc réalisé un test non paramétrique, le test de Kruskal-Wallis, afin d'évaluer la significativité des différences entre les valeurs obtenues pour l'ensemble de la couronne et celles obtenues pour l'émail proche du collet. Les résultats de ces tests sont donnés Tableau 11.5. On s'aperçoit ainsi que les $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$ ne diffèrent pas en fonction du lieu de prélèvement. Pour le fer, on observe une différence significative, mais celle-ci concerne les deux sexes.

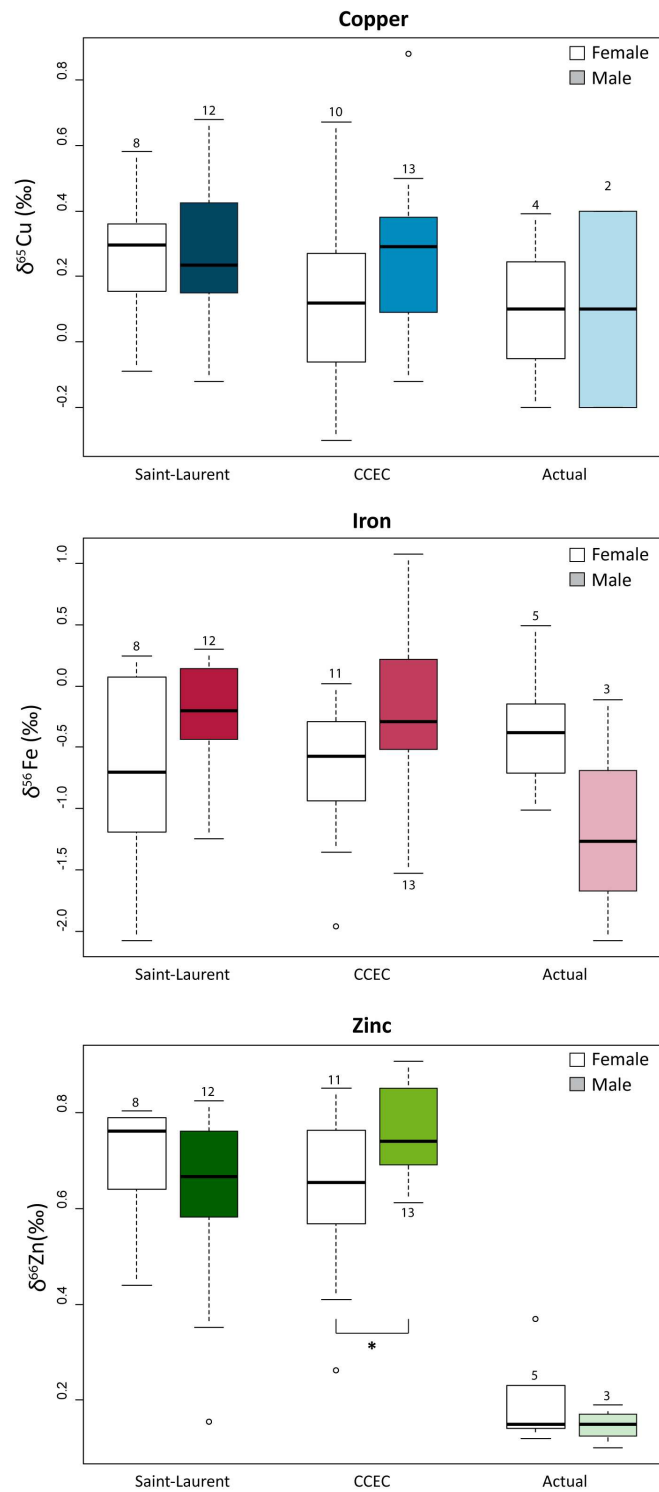


FIGURE 11.1.6: $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$ de l'émail dentaire de troisième molaires de trois populations pour chaque sexe.

	$\delta^{65}\text{Cu}$		$\delta^{56}\text{Fe}$		$\delta^{66}\text{Zn}$	
	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
Hommes et Femmes	2.27	0.13	6.02	0.01	0.29	0.59
Femmes	1.31	0.25	4.55	0.03	1.20	0.25

TABLE 11.5: Valeurs de χ^2 et de p pour les tests de Kruskal-Wallis visant à identifier les différences isotopiques entre l'émail prélevé au niveau du collet et celui de l'ensemble de la couronne.

11.1.7 Discussion

11.1.7.1 Absence de diagénèse

L'absence de corrélation entre données isotopiques et élémentaires pour les dents archéologiques ainsi que la similarité des gammes de valeurs isotopiques et élémentaires obtenues pour ces échantillons avec celles de ceux n'ayant jamais été enterrés permet de conclure à une préservation parfaite du fer, cuivre et zinc biologique de l'émail dentaire des individus de Saint-Laurent de Grenoble (Tableau 14.1, Figure 11.1.6, Figure 11.1.4). Les valeurs isotopiques mesurées dans ces échantillons peuvent donc être interprétées comme des données physiologiques.

11.1.7.2 Variabilité isotopique entre les populations

L'efficacité d'une méthode de détermination du sexe des restes humains repose en grande partie sur son indépendance vis-à-vis de la population considérée. Ici, on remarque que les éléments marqueurs du sexe, le fer et le cuivre, montrent les mêmes gammes isotopiques quelle que soit la population et l'époque (Fig 11.1.6). Ce n'est cependant pas le cas du zinc, qui montre un enrichissement très important en isotopes légers par comparaison avec les populations du CCEC et de Saint-Laurent. Afin de déterminer le facteur ayant engendré cette originalité isotopique, nous avons rassemblé quelques informations à l'aide de questionnaires proposés aux volontaires, dont les résultats sont synthétisés dans le tableau 11.6.

Les participants vivent dans deux régions différentes, la Normandie et la région Rhône-Alpes. Ce lieu de résidence n'influe pas sur $\delta^{66}\text{Zn}$. Il n'y a pas de corrélation avec le régime alimentaire global dont bénéficiait les participants pendant le développement de leurs molaires. Les seuls paramètres qui les distinguent des autres populations est leur époque et leur accès potentiel à des plombages dentaires. Tous les patients pour lesquels ont été prélevées ces dents ont effectivement tous eu un plombage métallique au cours de leur vie. Il est à savoir que les plombages contiennent généralement entre 0.5 et 1% de zinc [de Freitas, 1979] susceptible d'être partiellement libéré dans la salive [Gjerdet et Berge, 1983]. La composition isotopique des éléments sous forme d'oxyde est souvent proche de 0 per mil [Pokrovsky *et al.*, 2005]. Il se peut ainsi que le zinc

Id	$\delta^{66}\text{Zn}$	A.N.	Dpt	Consommation pendant l'enfance et l'adolescence			Plombage
				Viande	Poisson	Légume	
E1	0.19	1948	76	Faible	Faible	Moyenne	autre dent
E2	0.37	1948	76	Moyenne	Faible	Faible	autre dent
E3	0.14	1958	76	Faible	Faible	Faible	M3
E4	0.15	1964	76	Moyenne	Faible	Moyenne	autre dent
E5	0.23	1948	76	Faible	Faible	Elevée	autre dent
E6	0.12	1981	76	Elevée	Moyenne	Très élevée	autre dent
E7	0.10	1985	69	Elevée	Moyenne	Très élevée	dent déciduale
E8	0.15	1965	69	Moyenne	Moyenne	Moyenne	autre dent

TABLE 11.6: Informations relatives aux patients pour lesquels ont été extraites une troisième molaire. A.N. : année de naissance, Dpt : département de résidence. La dernière colonne signale pour quelle dent les patients ont du subir un plombage métallique.

libéré par l'amalgame dentaire se soit incorporé à l'émail dentaire lors des processus de minéralisation/reminéralisation qui font suite à l'absorption du bol alimentaire. L'autre hypothèse permettant d'expliquer cette originalité isotopique met en jeu une accélération du développement dentaire qui sera discutée chapitre 14.

11.1.7.3 Absence de sexe isotopique dans l'émail dentaire

Les valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ de l'émail dentaire ne révèlent pas de différence significative entre hommes et femmes, quelle que soit la population considérée (Figure 11.1.5). On constate même une amorce de tendance inverse pour les populations les plus anciennes (Saint-Laurent et CCEC). L'émail dentaire ne peut donc pas être utilisé comme outil géochimique de détermination du sexe, du moins pour l'espèce humaine. On remarque cependant pour le CCEC une différence significative entre hommes et femmes pour le $\delta^{66}\text{Zn}$ (Figure 11.1.5). Etant donné qu'elle est absente pour les deux autres populations, elle ne peut être généralisée. L'origine de cette différence sera elle aussi discutée chapitre 14.

11.1.7.4 Origine de la différence isotopique en cuivre/fer chez les adultes

Le développement dentaire et la puberté sont deux événements qui varient indépendamment et répondent avec une sensibilité très différentes aux paramètres socio-économiques (Figure 11.1.3). La population de Saint-Laurent de Grenoble habitait un quartier populaire et insalubre, où les enfants n'étaient pas scolarisés. L'âge moyen de la ménarche devait se situer autour de 16 ans [Shorter, 1981], ce qui confirme un contexte socio-économique défavorable. La population du CCEC devait connaître des conditions de vie intermédiaires entre celles du quartier de Saint-Laurent et celles des patients ac-

tuels pour lesquels une M3 a été extraite. Pourtant, dans les trois cas, on n'observe aucun enregistrement d'une différence isotopique en cuivre ou en fer (Figure 11.1.5). Selon les hypothèses développées dans l'introduction, cette observation va à l'encontre de l'idée d'une absorption intestinale différentielle comme mécanisme de variation isotopique. Ainsi, on aurait du observer un enrichissement en isotopes légers du cuivre dans l'émail dentaire des femmes, quel que soit le contexte de vie des individus. Les données que nous avons recueillies pour l'émail dentaire de ces trois populations sont donc un argument fort pour le rôle des menstruations dans la différenciation isotopique. Dès lors, une différence isotopique entre les sexes n'est possible que pour des populations dont l'âge à la ménarche est précoce et pour lesquelles les prélèvements d'émaux dentaires ont été réalisés au niveau du collet. Concernant les échantillons de cette étude, on recense pour la population actuelle des âges de ménarche antérieurs à la fin de la formation de l'émail des troisièmes molaires. Cependant, l'émail a été prélevé sur diverses zones de la couronne. Ceci, ajouté au faible nombre d'échantillons, explique l'absence de différence homme/femme pour le $\delta^{65}\text{Cu}$ de ces individus.

11.1.7.5 Vers un traceur de l'âge de ménarche ?

Si aucune différence significative n'est observée entre l'émail dentaire des hommes et des femmes, on peut tout de même observer des « tendances ». Ainsi, pour la population de Saint-Laurent de Grenoble, les $\delta^{65}\text{Cu}$ sont strictement identiques entre hommes et femmes ($\delta^{65}\text{Cu}_m = 0.27 \text{ ‰}$, $\delta^{65}\text{Cu}_f = 0.26 \text{ ‰}$). Dans la population du CCEC, qui connaît un âge de ménarche plus précoce (environ 1,5 ans), on retrouve les mêmes valeurs pour les hommes ($\delta^{65}\text{Cu}_m = 0.29 \text{ ‰}$) alors que les valeurs pour les femmes sont enrichies en isotopes légers ($\delta^{65}\text{Cu}_f = 0.12 \text{ ‰}$). Concernant la population actuelle, il est intéressant de noter qu'on retrouve à nouveau un $\delta^{65}\text{Cu}_f$ d'environ 0.1‰. Pour les hommes, il n'y a pas d'interprétation possible sachant que seulement deux valeurs ont été obtenues. Ces constats suggèrent un certain potentiel des mesures du $\delta^{65}\text{Cu}$ de l'émail dentaire pour l'identification de l'âge moyen de la ménarche d'une population. En effet, la tendance évoquée en cuivre pour l'émail dentaire des individus du CCEC pourrait se révéler significative avec un plus large échantillonnage ciblant systématiquement le collet de la dent. Une comparaison entre l'émail dentaire prélevé sur les cuspidés³ et celui du collet pourrait également apporter des informations cruciales sur une éventuelle dérive isotopique. On pourrait alors estimer si la ménarche est intervenue au cours de l'amélogénèse de la M3. Un tel outil serait d'une grande utilité pour les reconstitutions démographiques des populations passées.

3. c.f. glossaire

Chapitre 12

Impact de la ménopause sur le $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ des érythrocytes

12.1 Introduction

Dans les populations modernes, l'âge moyen à la ménopause est évaluée entre 44 et 52 ans [Thomas *et al.*, 2001], selon le pays étudié et des paramètres individuels tels que l'âge à la première naissance [Westendorp et Kirkwood, 1998, Thomas *et al.*, 2000]. Cependant, il n'existe aucun critère direct pour estimer cet âge dans les populations anciennes. Pourtant, cette estimation a des implications importantes pour les reconstructions paléodémographiques et l'anthropologie sociale (théorie « grandmotherhood »). L'existence d'une signature isotopique de la ménopause serait d'un intérêt majeur pour les questions anthropologiques.

Dans la littérature, on trouve deux hypothèses pour expliquer l'origine de la différence isotopique homme/femme. Elles mettent en cause une absorption intestinale différentielle [Walczyk et Von Blanckenburg, 2002, Krayenbuehl *et al.*, 2005] ou une sollicitation différentielle des réserves hépatiques [Albarède *et al.*, 2011, Jaouen *et al.*, 2011, Hotz *et al.*, 2012]. Dans les deux cas, la ménopause devrait faire disparaître ces différences métaboliques entre hommes et femmes. Dès lors, on s'attend à observer une similitude des compositions isotopiques du fer et du cuivre entre les hommes et les femmes ménopausées.

Les analyses réalisées sur des ossements au cours de cette thèse portaient sur des femmes a priori non ménopausées, à deux exceptions près. Il n'a donc pas été observé d'effet lié à la ménopause, mais celui-ci, s'il existe, aurait un impact majeur sur le potentiel d'utilisation des isotopes du fer et du cuivre comme outil de sexage.

Jusqu'à présent, les seules analyses isotopiques obtenues dans le sang d'individus de plus de 50 ans concernent le $\delta^{56}\text{Fe}$ d'une dizaine de personnes [Walczyk et Von Blanckenburg, 2002, Walczyk et von Blanckenburg, 2005, Albarède *et al.*, 2011]. Dès lors, l'influence du vieillissement et de la ménopause est in-

connu. Par conséquent, nous avons mesuré les concentrations et les rapports isotopiques du sang d'hommes et de femmes âgés de plus de 50 ans, a priori en bonne santé. Ce travail a fait l'objet d'un article actuellement en cours de préparation, destiné à être soumis en août 2012 au journal *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

Le terme préménopause désigne dans le langage courant ce que la gynécologie obstétrique appelle périménopause, c'est à dire la période précédant la ménopause où apparaissent les premiers signes de la cessation du cycle menstruel. Au cours de ce travail de thèse, l'adjectif « préménopausée » désignera le groupe de femmes menstruées, par opposition au terme de « postménopausée ».

12.2 Article « *Iron and copper isotope budgets at menopause* »

Résumé :

La variabilité naturelle des rapports isotopiques du fer et du cuivre dans le sang ($\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$, respectivement) comprend un effet lié au sexe encore inexpliqué. Les éléments sanguins du sang (sang total, serum et globules rouges) sont enrichis en ^{56}Fe et appauvris en ^{65}Cu comparés à ceux des hommes. La composition isotopique de chaque organe humain résulte d'un simple mélange entre un réservoir de métaux réduits, caractérisé par le Fe^{2+} de l'hémoglobine et le Cu^+ de la superoxyde dismutase, et un réservoir de métaux oxydés, représenté par le Fe^{3+} de la ferritine hépatique et le Cu^{2+} de la céruloplasmine. Dans ce contexte, le facteur sexe résulte probablement des pertes menstruelles composées de métaux réduits et d'une compensation par les métaux oxydés des réserves hépatiques. A ce jour, seuls les jeunes adultes ont été recrutés dans des études, ce qui empêche l'observation d'un effet potentiel de la ménopause. Nous mesurons ici les valeurs du $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ dans le foie et les érythrocytes d'hommes et de femmes âgés de plus de 55 ans. Les valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{65}\text{Cu}$ des érythrocytes masculins sont constantes au cours du temps. Contrairement aux jeunes femmes adultes, les femmes âgées possèdent des érythrocytes dont les valeurs de $\delta^{65}\text{Cu}$ sont similaires à celles des hommes alors que les $\delta^{56}\text{Fe}$ de leurs érythrocytes sont intermédiaires entre ceux des hommes et des jeunes femmes adultes. Les calculs du temps de résidence du cuivre et du fer dans le corps humain semble expliquer pourquoi seul le $\delta^{65}\text{Cu}$ du sang des femmes âgées est similaire à celui des hommes. Ainsi, les analyses couplées des rapports isotopiques du fer et du cuivre sont un outil potentiel d'estimation de l'équilibrage métabolique des métaux suite à des perturbations redox.

IRON AND COPPER ISOTOPE BUDGETS AT MENOPAUSE

*Klervia Jaouen¹ and Vincent Balter¹.*¹ ENS Lyon, CNRS, and Université Lyon I, 46 allée d'Italie, 69007 Lyon, France**Abstract**

The natural variability of Fe and Cu isotopic compositions ($\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{65}\text{Cu}$, respectively) in blood includes a sex effect, which still awaits a biological explanation. Women exhibit ^{56}Fe -enriched and ^{65}Cu -depleted blood components (whole blood, serum and red blood cells) compared to men. In the body, $\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{65}\text{Cu}$ compositions of organs are accounted by a simple binary mixture between a reduced metal reservoir, represented by blood Fe^{2+} -hemoglobin and Cu^+ -superoxide dismutase, and an oxidized metal reservoir represented by liver Fe^{3+} -ferritin and Cu^{2+} -ceruloplasmin. It has been suggested that the observed sex effect results from menstrual blood losses composed of reduced metals and a correlative solicitation of hepatic stores formed by oxidized ones. Here we investigate the effects of menopause by comparing the $\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{65}\text{Cu}$ values in liver and red blood cells of men and women older than 55. Men have constant red blood cells $\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{65}\text{Cu}$ values throughout their lifetime. Contrary to young adult women, aging women exhibit red blood cells $\delta^{65}\text{Cu}$ values similar to men, and red blood cells $\delta^{56}\text{Fe}$ values intermediate between men and young adult women. Calculation of residence time of copper and iron in the body likely explains why the blood $\delta^{65}\text{Cu}$ value, but not the $\delta^{56}\text{Fe}$ value, of aging women resembles that of men. Coupled analysis of iron and copper isotopic ratios is a potential tool to assess metabolic imbalances linked to pathological redox perturbations.

The stable isotopes of elements behave slightly differently in biochemical processes. Isotopic fractionation attests to differences in bond energies and hence is influenced by ligand configuration, redox conditions, and kinetics (1, 2). In 2002, Walczyk and von Blanckenburg (3) demonstrated that Fe women's blood is isotopically heavy relative to that of men, a result confirmed by further studies (4, 5). Such an isotopic sex effect has been described for copper isotopes also, but in this case, Cu of women's blood is isotopically lighter relative to that of men (5). Taken together, these results emphasize the role of metabolic crossroads between Fe and Cu (6) and suggest that redox equilibria likely control the Fe and Cu isotope compositions in the body. Conversely, Fe and Cu isotope compositions can be used to trace, and eventually quantify, pathological redox metabolic imbalance. The potential use of stable isotope compositions in biomedicine has been applied for the first time to study the effect of hemochromatosis on the isotopic composition of Fe (4). Patients suffering of hemochromatosis were found to exhibit blood ^{56}Fe -depleted compositions relative to controls, a symptom attributed to the hyper-absorption of ^{56}Fe -depleted dietary Fe (4). However, Hotz et al. (7) recently

challenged this hypothesis by studying the effect of phlebotomy on the blood Fe isotope composition of patient suffering of hemochromatosis. These authors suggest upon bloodletting ^{56}Fe -depleted blood is replaced by ^{56}Fe -enriched hepatic Fe which eventually, led to an enrichment of blood isotopically heavy Fe. The reason is that hepatic Fe, the storage reservoir, is enriched in ^{56}Fe ($\delta^{56}\text{Fe} \sim -1.5\text{‰}$; Fig. 12.2.1) relative to blood Fe, the circulating reservoir ($\delta^{56}\text{Fe} \sim -2.7\text{‰}$; Fig. 12.2.1). Biomedical applications of stable isotope compositions of metals in blood therefore look promising, but require a better understanding of the physiological mechanisms that may lead to isotope fractionation. So far, isotopic studies have been conducted on young adults only, so the effect of age and menopause are still undocumented. It has been suspected that the isotopic sex effect is related to menstrual blood losses, which generate higher Cu and Fe needs (3, 5, 7, 8). In this case, metal isotope compositions in women's blood would be expected to shift after menopause toward men's values. It is well established that Cu blood concentrations decrease at menopause as a result of estrogen mediating expression of ceruloplasmin, which is a major Cu transporter (9, 10). Likewise, iron metabolism is affected by menopause because the size of hepatic store progressively increases after menses cessation (11, 12). We here present Fe and Cu concentrations and isotopic ratios of red blood cells (RBC) from 19 postmenopausal women aged from 55 to 66 and from 15 men aged from 60 to 65, and Fe and Cu concentrations and isotopic compositions of liver biopsies for one woman and seven men.

Results

Concentrations

Iron contents in RBC range from 1.8 to 5.6 mg/g with a mean value of 3.3 ± 1.1 mg/g in women and from 1.8 to 4.6 mg/g with a mean value of 3.1 ± 0.8 mg/g in men (Table 12.1). There is no significant difference between premenopausal and postmenopausal women and between men and women (Table 12.2). The Cu contents in RBC ranges from 0.95 to 2.47 $\mu\text{g/g}$ with a mean value of 1.75 ± 0.41 $\mu\text{g/g}$ in women and from 1.22 to 2.44 $\mu\text{g/g}$ with a mean value of 1.74 ± 0.40 $\mu\text{g/g}$ in men (Table 12.1). As previously reported, young women exhibit the highest Cu concentrations in RBC (13), whereas postmenopausal women and men have similar copper contents. In liver, Fe concentrations range from 83 to 2005 $\mu\text{g/g}$ with a mean value of 491 ± 643 $\mu\text{g/g}$ (Table 12.1). These numbers are typical of Fe hepatic concentration (14) and variability (15). Liver Cu concentrations range from 12 to 109 $\mu\text{g/g}$ with a mean value of 43 ± 32 $\mu\text{g/g}$ (Table 12.1). These numbers are typical of normal Cu hepatic concentration (16).

Isotope compositions

The mean $\delta^{56}\text{Fe}$ value of postmenopausal women RBC is $-2.59 \pm 0.21\text{‰}$ (Table 12.1) and falls between premenopausal women and men (Table 12.1; Fig 12.2.1). A t-test shows that Fe isotopic ratios of postmenopausal women differ significantly from those of

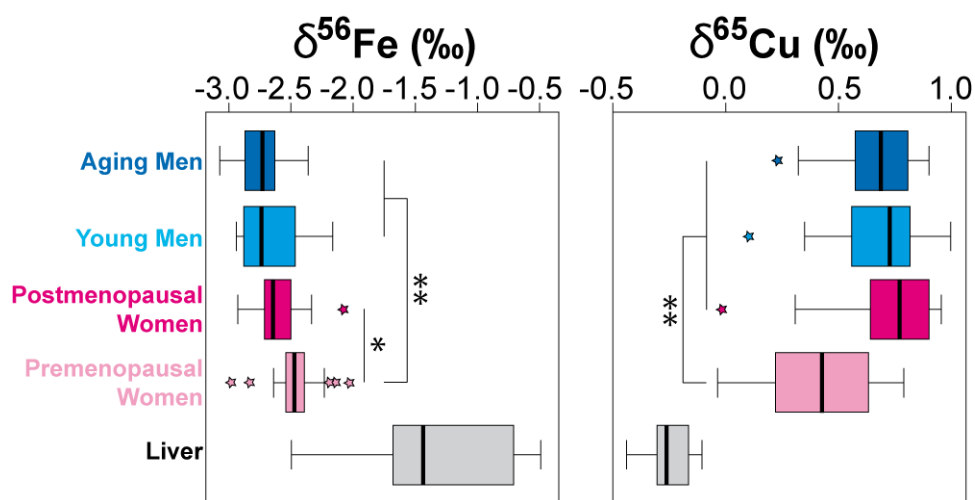


FIGURE 12.2.1: Fe, Cu and Zn isotope variations of erythrocytes and liver are discussed in the text. The delta annotations are given by : $\delta^x\text{Fe} = [({}^x\text{Fe}/{}^{54}\text{Fe})_{\text{sample}}/({}^x\text{Fe}/{}^{54}\text{Fe})_{\text{standard}} - 1] \cdot 10^3$ with $x=56$ or 57 . The "IRMM14" solution stands for the Fe isotope standard. $\delta^{65}\text{Cu} = [({}^{65}\text{Cu}/{}^{63}\text{Cu})_{\text{sample}}/({}^{65}\text{Cu}/{}^{63}\text{Cu})_{\text{standard}} - 1] \cdot 10^3$. The "NIST-SRM 976" solution was used as Cu isotope standard. The box represents the 25th-75th percentiles (with the median as a bold vertical line) and the whiskers show the 10th-90th percentiles. Numbers in brackets corresponds to references. Young men and Premenopausal women isotopic data are from Albarede et al. (2011). Other isotopic data are from this study except for the $\delta^{56}\text{Fe}$ values for liver, which combined the ones of this study and Walczyk and von Blanckenburg). ** corresponds to significant difference between isotopic values of age and sex groups (t test, $p < 0.05$). * corresponds to significant difference (t test, $p < 0.05$) between premenopausal and postmenopausal women when « Postmenopausal women < 5 years » are not taking into account.

young men (Table 12.2). The difference between Fe isotope compositions of pre- women and post-menopausal women values becomes significant only 5 years into menopause (Fig 12.2.1, $p < 0.002$). The Fe and Cu isotope compositions of old and young men are not significantly different (Fig 12.2.1, Table 12.2). The mean $\delta^{65}\text{Cu}$ of postmenopausal women RBC of $0.68 \pm 0.27\text{‰}$ (Table 12.1) is significantly higher than that of premenopausal women ($\delta^{65}\text{Cu} = 0.46\text{‰} \pm 0.47\text{‰}$, Table 12.2). $\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{65}\text{Cu}$ values in blood do not correlate between themselves ($R^2 = 0.008$; $p = 0.635$) nor with concentrations ($\delta^{56}\text{Fe}$ vs $1/[\text{Fe}]$: $R^2 = 0.106$; $p = 0.064$; $\delta^{65}\text{Cu}$ vs $1/[\text{Cu}]$: $R^2 = 0.156$; $p = 0.034$). Iron and copper concentrations in blood are however correlated ($R^2 = 0.242$; $p = 0.003$).

	Mean	SD	n	Mean	SD	n
<i>Isotopic data</i>	$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰)			$\delta^{56}\text{Fe}$ (‰)		
Premenopausal women (YW)*	0.46	0.47	28	-2.49	0.39	28
Men < 40 y.o. (YM)*	0.67	0.36	21	-2.72	0.36	21
Men > 50 y.o. (OM)	0.71	0.25	13	-2.65	0.27	15
Postmenopausal women (OW)	0.68	0.27	14	-2.59	0.21	19
Liver	-0,26	0,11	9	-1,33	0,67	9
<i>Concentrations (dried RBC)</i>	[Cu]ppm			[Fe]ppm		
Premenopausal women (YW)	2.15	0.61	20	3193	668	20
Men < 40 y.o. (YM)	1.76	0.33	20	3112	464	20
Postmenopausal women (OW)	1.75	0.4	19	3226	1068	18
Men > 50 y.o. (OM)	1.74	0.4	15	3061	777	15
Liver	43	32	8	491	643	8

TABLE 12.1: Average isotope compositions in delta units (permil or ‰) and 95% range (2SD) for the isotope compositions and concentrations of Zn, Cu, and Fe in the liver and erythrocytes. Typical analytical uncertainties are 0.05 ‰. *Data from Albarede et al., 2011.

Liver mean $\delta^{56}\text{Fe}$ (-1.33 ± 0.67) (Table 12.1; Fig 12.2.1) is consistent with the data reported by Walczyk and von Blanckenburg (3, 8), while the mean $\delta^{65}\text{Cu}$ for the liver is $-0.26 \pm 0.11\text{‰}$. The differences of $\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{65}\text{Cu}$ between RBC and liver are therefore very significant (Fe : $\sim 1.3\text{‰}$ and Cu : $\sim 1.0\text{‰}$, respectively), as previously pointed by Albarède et al. (5).

Discussion

The distribution of Fe and Cu between liver and blood varies among individuals and reflects sex characteristics. The Fe cycle in the human body involves only few major reservoirs, hemoglobin (Hb) in erythrocytes and myoglobin in muscle, both largely composed of Fe(II), and hepatocytes, which store Fe(III) as ferritin (Ft, (17)). Serum

Isotopic data	$\delta^{65}\text{Cu}$		$\delta^{56}\text{Fe}$	
	Kruskal-Wallis		T test	
	χ^2	p	t value	p
OM-OW	0,27	0,6	-0,86	0,4
OM-YM ¹	0,06	0,81	1,62	0,13
OM-YW ¹	8,7	3.10-3**	-1,95	0,07
OW-YW ¹	11,49	6.10-4**	1,61	0,12
OW-YM ¹	1,14	0,29	-2,2	0,04*

Concentrations	[Cu]		[Fe]	
	Kruskal Wallis		Kruskal Wallis	
	χ^2	p	χ^2	p
OM-OW	0.41	0.52	0.29	0.59
OM-YM ¹	0.12	0.73	0.4	0.52
OM-YW ¹	4.07	0.04*	0.4	0.53
OW-YW ¹	3.81	0.05	9.10-4	0.98
OW-YM ¹	0.003	0.96	0.25	0.62
YW-YM ¹	4.4	0.04*	0.16	0.68

TABLE 12.2: T and χ^2 results for Student and Kruskal-Wallis test performed for Cu, Fe and Zn isotope compositions and concentrations between pairs of age and sex groups. T test were performed when values follow a normal distribution. For two populations (k-1) and a level of significance of 5% (± 0.05), χ^2 equals 3.84. For significant results, * is when $p < 0.05$. ; ** is when $p < 0.005$. OM : Old men, OW : Postmenopausal women ; YM : Young men, YW : Premenopausal women. 1. Young isotope values were previously published in Albarede et al., 2011.

Fe is essentially bound to transferrin (Tf) and, to a minor extent, to Ft as Fe(III). Extracellular Cu is hosted at 70–80% by ceruloplasmin (Cp) as Cu(II) (18). In contrast, intracellular Cu is mainly bound to superoxide dismutase (SOD) as Cu(I) (19), but is also found as residue of Cp in the liver (20). We disregarded metallothionein as a major Cu repository. The position of each biological component in the $\delta^{56}\text{Fe}$ - $\delta^{65}\text{Cu}$ diagram reflects a number of factors including the oxidation state of Fe and Cu of the predominant metal carrier protein (5). Whole blood, liver and serum Fe and Cu isotopic values can be accounted for by a simple binary mixture of (i) erythrocytes reservoir low- $\delta^{56}\text{Fe}$ Fe²⁺-laden Hb and high- $\delta^{65}\text{Cu}$ Cu⁺-laden SOD, i.e. the reduced metals pool, and (ii) a reservoir with high- $\delta^{56}\text{Fe}$ and low- $\delta^{65}\text{Cu}$, presumably serum Fe³⁺-laden Ft and Cu²⁺-laden Cp, respectively, i.e. oxidized metals pool (Fig 12.2.2A). The mass balance equation reads, for Fe :

$$\delta^{56}\text{Fe}_{mix} = [x \cdot M^{\text{Fe}}_{Hb} \cdot \delta^{56}\text{Fe}_{Hb} + (1-x) \cdot M^{\text{Fe}}_{Ft} \cdot \delta^{56}\text{Fe}_{Ft}] / [x \cdot M^{\text{Fe}}_{Hb} + (1-x) \cdot M^{\text{Fe}}_{Ft}] \quad (1)$$

where $\delta^{56}\text{Fe}_{mix}$ is the Fe isotopic composition resulting from the mixing between the reduced and the oxidized metal pools, RMP and OMP, respectively, with proportions of x and (1-x), respectively, M^{Fe}_{Hb} and M^{Fe}_{Ft} , the concentration of Fe in hemoglobin and ferritin, respectively, and $\delta^{56}\text{Fe}_{Hb}$ and $\delta^{56}\text{Fe}_{Ft}$, the Fe isotopic composition of hemoglobin and ferritin, respectively (Table 12.3). Similarly, it reads, for Cu :

$$\delta^{65}\text{Cu}_{mix} = [x \cdot M^{\text{Cu}}_{SOD} \cdot \delta^{65}\text{Cu}_{SOD} + (1-x) \cdot M^{\text{Cu}}_{Cp} \cdot \delta^{65}\text{Cu}_{Cp}] / [x \cdot M^{\text{Cu}}_{SOD} + (1-x) \cdot M^{\text{Cu}}_{Cp}] \quad (1)$$

where $\delta^{65}\text{Cu}_{mix}$ is the Cu isotopic composition resulting from the mixing between the RMP and OMP pools with proportions of x and (1-x), respectively, M^{Cu}_{SOD} and M^{Cu}_{Cp} , the concentration of Cu in superoxide dismutase and ceruloplasmin, respectively, and $\delta^{65}\text{Cu}_{SOD}$ and $\delta^{65}\text{Cu}_{Cp}$, the Cu isotopic composition of superoxide dismutase and ceruloplasmin, respectively (Table 12.1).

Because the Fe/Cu ratios of interacting reservoirs vary by three orders of magnitude (Table 12.3), combining blood components does not produce linear trends in $\delta^{65}\text{Cu}$ vs $\delta^{56}\text{Fe}$ plot by hyperbolae. It is expected that an oxidized metal species, which has a smaller ionic radius and a higher charge than a corresponding reduced species, should form stronger bonds and therefore attract preferentially the heavier isotopes (5). Experimental data (21, 22) indeed shows that the $\delta^{56}\text{Fe}$ of reduced Fe²⁺-laden Hb is lower than that of oxidized Fe³⁺-laden Tf or Fe³⁺-laden Ft. This prediction also holds for the Cu isotopes ratio with Cu(II) being 0.3‰ heavier than Cu(I) in CuS (23) and a whopping 4‰ heavier in Cu(I) (24). Copper isotopic fractionation is therefore predicted to result in ⁶⁵Cu-depleted composition for reduced Cu(I) relative to oxidized Cu(II). Here, the Cu⁺-laden SOD of RBC exhibit $\delta^{65}\text{Cu}$ value up to +0.9‰, while the Cu²⁺-laden Cp of serum and liver does not exceed 0‰ (5). The maturation of SOD in the mitochondria is

a complex process that requires a disulphide relay system (25) which notably involves the incorporation of Cu in SOD by Ccs1, the SOD Cu chaperone. The expected ^{65}Cu -depletion during the conversion of Cu(II) to Cu(I) probably occurs in the mitochondria cytosol prior to the final stages of the SOD maturation and its translocation into the cytoplasm. Whatever the origin of the high $\delta^{65}\text{Cu}$ values of the reduced SOD pool, the position of the men and women RBC and liver Fe and Cu isotopic values in the ^{56}Fe - ^{65}Cu diagram calls for an explanation about the origin of the so-called isotopic sex effect.

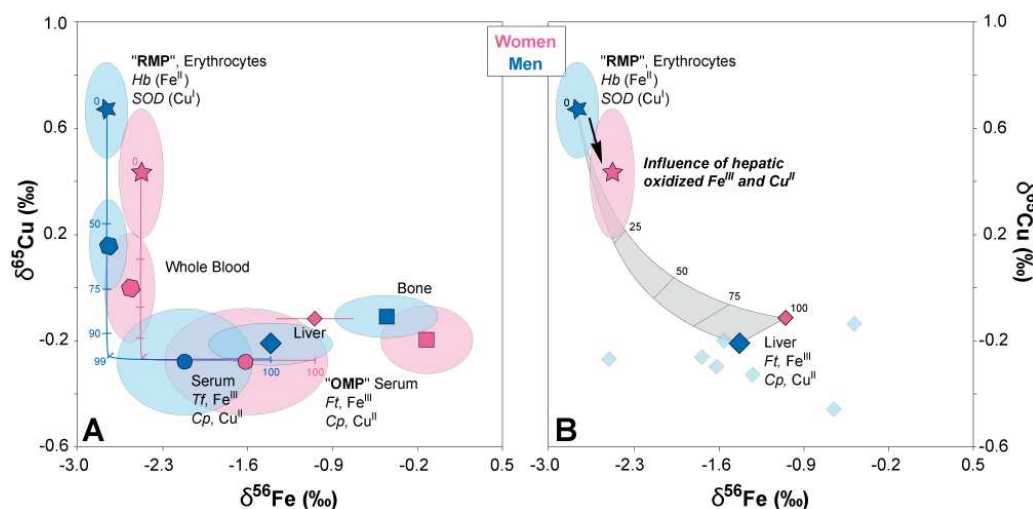


FIGURE 12.2.2: A : Distribution of erythrocytes, whole blood, serum, liver, and bone $\delta^{65}\text{Cu}$ and $\delta^{56}\text{Fe}$ average values for women and men. The lines representing the combination of Fe and Cu from the reduced metals pool (RMP) (erythrocytes hemoglobin and superoxide dismutase) and the oxidized metals pool (OMP, serum ferritin and ceruloplasmin) are shown for women and men with the mass proportions of the OMP end-member. The isotope compositions and concentrations are given in Table 12.1. B : Women draw on liver Fe and Cu more than men to compensate for menstrual blood loss. A line is shown that represents addition of Fe and Cu from the liver and labelled with proportions calculated with data reported in Table 1. Mass balance calculations allow estimating that about 10-15% of the Fe in RBC in menstruating women have an hepatic origin (Fig 12.1.2 B). Abbreviations : Hb, hemoglobin ; SOD, superoxide dismutase ; Tf, transferrin ; Cp, ceruloplasmin ; Ft, ferritin.

Iron loss over a menstrual cycle (~ 15 mg) corresponds to 40 percent of the monthly dietary uptake (~ 35 mg). Circulating Fe, which is composed by reduced and isotopically light Fe^{2+} -laden Hb, mainly constitutes menstrual blood losses. This overall Fe deficit must be compensated by release of storage Fe from the liver, which can only originate in oxidized, isotopically heavy Fe^{3+} -laden Ft. However, efficient Fe release from hepato-

	Fe-ligand	$N^{\text{Fe}\dagger}$	$M^{\text{Fe}}(\text{mg})\dagger\dagger$	$\delta^{56}\text{Fe}$ (‰)		Cu-ligand	$N^{\text{Cu}\dagger}$	$M^{\text{Cu}}(\text{mg})\dagger\dagger$	$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰)	
				Women	Men				Women	Men
Erythrocytes	Hb	$5 \cdot 10^{18}$	1800*	-2.47 ± 0.19	-2.76 ± 0.18	SOD	$6 \cdot 10^{15}$	2	0.43 ± 0.24	0.67 ± 0.18
Serum	Tf	$2 \cdot 10^{16}$	3*	-1.61 ± 0.65	-2.12 ± 0.53	Cp	$8 \cdot 10^{15}$	3	-0.28 ± 0.20	-0.28 ± 0.20
	Ft	$3 \cdot 10^{14}$	0.1	$\sim -1.00\text{§}$	$\sim -1.40\text{§}$					
Hepatocytes	Ft		1600*	-1.04	-1.41 ± 0.68	Cp		10#	-0.11	-0.28 ± 0.08
Whole Blood	\sim Hb	$5 \cdot 10^{18}$	1800*	-2.57 ± 0.19	-2.74 ± 0.16	\sim SOD+Cp		6#	0.00 ± 0.20	0.16 ± 0.17
Bioapatite			3200‡	-0.12 ± 0.33	-0.45 ± 0.43			500‡	-0.20 ± 0.13	-0.11 ± 0.08

TABLE 12.3: Biochemistrial data on iron and copper metabolism. † atoms contents in 1 mL of blood is calculated using a concentration of 160, 0.16, 5, $3 \cdot 10^{-4}$, and 0.35 mg/ml, and an average content of atoms by molecule of 4, 2, 0.6, 4 and 6 for hemoglobin (Hb), superoxide dismutase (SOD, transferrin (Tf), ferritin (Ft) and ceruloplasmin (Cp), respectively. †† : unless specified, the body mass content of Fe and Cu is calculated using ratios of atoms content relative to hemoglobin * Ref 24. Note that Fe content of the reticulo endothelial macrophages (600mg) has been added to that of hepatocyte (1000 mg) § Ft isotopic values are deduced from those of bulk liver # Ref. 25 ‡ calculated using an average Fe and Cu concentration of 160 $\mu\text{g/g}$ and 25 $\mu\text{g/g}$, respectively, and a mass skeleton of 20 Kg for a body mass of 70 Kg.

cytes requires Cp because it catalyzes the oxidation of Fe(II) to Fe(III) (20). The role of Cp is well illustrated by the effect of the defective Cp gene expression known as aceruloplasminemia, which leads to Fe overload (19). Higher Fe fluxes through the body of women predict an enhanced redox Cp activity, which is the case : Cp activity is known to be more elevated in women than in men (12). The fast Fe and Cu turnover for women kinetically reduces the differences between $\delta^{56}\text{Fe}_{Ft}$ and $\delta^{56}\text{Fe}_{Hb}$ on the one hand, and between $\delta^{65}\text{Cu}_{SOD}$ and $\delta^{65}\text{Cu}_{Cp}$ on the other hand (5). The Fe and Cu isotope composition of women's RBC therefore reflects a higher proportion of hepatic high- $\delta^{56}\text{Fe}_{Ft}$ and low- $\delta^{65}\text{Cu}_{Cp}$ relative to men (Fig 12.2.2B). We surmise that this is the origin of the sex effect visible in the isotope compositions of Fe and Cu in blood.

The cessation of menses is therefore expected to affect the sex isotopic effect. At menopause, the Cu concentrations and isotope compositions of women's blood become indistinguishable from those of men (Fig 12.2.1, Table 12.2). Compared to premenopausal women, Cu in the blood of postmenopausal women becomes less concentrated and isotopically heavier (Fig 12.2.1, Table 12.2). In contrast, there is no response of Fe concentration to menopause, but, although newly postmenopausal women are still similar to premenopausal individuals, an isotopic shift becomes visible five years after the menopause (Fig 12.2.3). Woman's body contains about 3g of iron and 80 mg of copper (26, 27) . After menopause, the daily requirements for Fe and Cu are 1 mg and 1.6 mg respectively (12, 27). We assume steady-state and that the residence times of Fe and Cu in the body can be approximated by the ratio between metal burden and daily requirement. Iron is replaced in about 8 years and Cu in only 50 days. However imprecise these estimates may be, they explain why, immediately after menopause, the $\delta^{65}\text{Cu}$ in women's blood becomes similar to that of men, whereas the $\delta^{56}\text{Fe}$ difference lags for years. These results highlight the importance of the interactions between Fe and Cu pathways on the blood isotope compositions of metals in blood because they exchange electrons at several crucial points of their respective homeostasis (6). For instance, the function of Cp is to oxidize Fe(II) into Fe(III) (28), and a defect in the Cp gene expression (aceruloplasminemia) lead to Fe overload (29). Our results emphasize the potential of metal isotopes with multiple oxidation states, as a tracer of redox perturbations associated with metabolic disorders.

Conclusion

The present study shows that Fe and Cu isotopes are differentially distributed in the body and reflect the vagaries of their the redox state. A reduced metal pool is hosted by red blood cells, where Fe(II) and Cu(I) are bound to hemoglobin and superoxide dismutase, respectively. The oxidized metal pool accumulates in the liver, where Fe(III) and Cu(II) are bound to ferritin and ceruloplasmin, respectively. The respective position of red blood cells and livers of men and women in the $\delta^{56}\text{Fe}$ vs $\delta^{65}\text{Cu}$ diagram, suggest that part of the Fe and Cu in the blood of premenopausal women is of hepatic origin. The residence times of Fe and Cu in the body being different by three orders of magnitude,

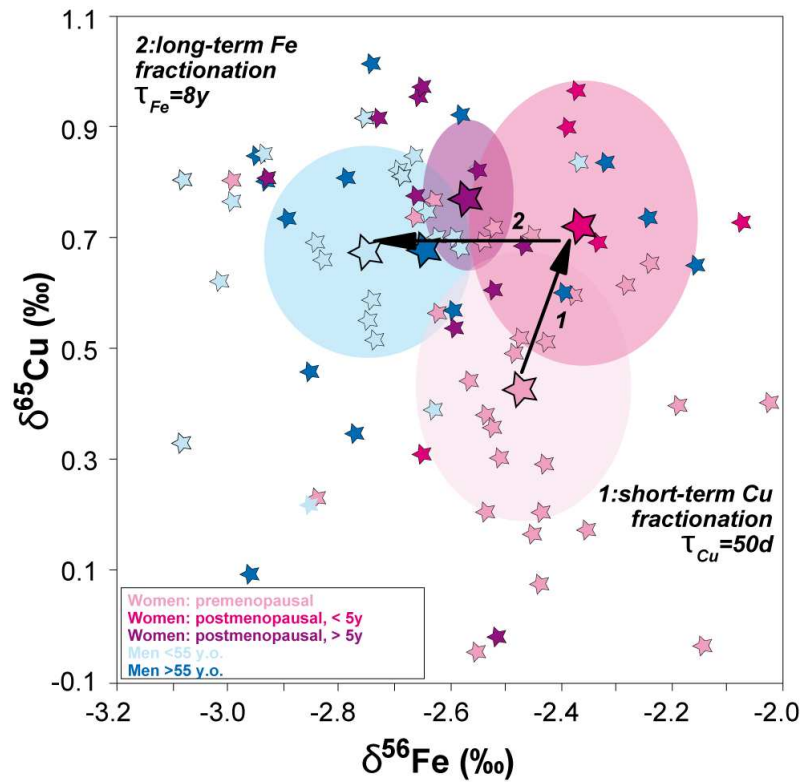


FIGURE 12.2.3: $\delta^{65}\text{Cu}$ and $\delta^{56}\text{Fe}$ in erythrocytes. Values for young men and young women are from Albarède et al, 2011. The arrow indicated the assumed evolution of the erythrocyte isotopic composition through women life.

the isotopic sex effect persists for years after menopause in the case of Fe, but only for weeks in the case of Cu. These findings emphasize the potential of coupled Fe and Cu isotopic ratios as a tracer of metabolic redox perturbations. Moreover, since blood Fe and Cu isotopic signatures can be recorded in bones (30), it is also likely that the present results will find perspectives in paleoanthropology to determine the age at menopause in ancient populations, which is important in regard to the grandmotherhood theory (31).

Material and methods

The Etablissement Français du Sang in Lyon provided blood samples fully documented for sex, age, and age at menopause. All experiments were performed in compliance with the relevant laws and the ethical committee of the Etablissement Français du Sang.

Blood samples were first freeze-dried and then homogenized. Blood powders and liver samples were dissolved by a mixture of HNO₃ 15N and H₂O₂. Dissolved samples were then evaporated, re-dissolved in 1mL of 7 N HCl + 0.001% H₂O₂ and evaporated again in order to remove any traces of remaining nitric acid. Finally, samples were taken up in 1 mL of 7 N HCl + 0.001% H₂O₂, a 50 μl aliquot taken for elemental concentration measurements, and the remaining solution processed for isotope analysis according to the technique of Maréchal et al. (32). Metals were then purified using the same protocol for Fe and Cu and using an adapted one from Moynier et al. (33) for zinc, which is less time-consuming. Cu and Zn isotope compositions were determined on a Nu-HR multiple-collector inductively-coupled plasma mass spectrometer (MC-ICP-MS) using a wet plasma, while Fe was run on a large-radius Nu-1700 operated at a resolution of 4500 as dry plasma. The samples were introduced by free aspiration in 0.05 N sub-boiled distilled HNO₃. For Cu and Zn, instrumental mass fractionation was corrected using elemental-doping and standard sample bracketing following the recommendations provided in Albarède et al. (2004). The precision on isotopic ratios is 0.05 permil. Samples were randomized and duplicated. Concentrations of Fe, Cu and Zn were determined on an Agilent 7500 CX quadrupole ICP-MS. Liver concentrations were converted from wet weight to dry weight according the permutation factor of Wimmer et al. (34).

1. BIGELEISEN J, MAYER MG (1947) Calculation of equilibrium constants for isotopic exchange reactions. *The Journal of Chemical Physics* 15 :261.

2. BIGELEISEN J (1949) The relative reaction velocities of isotopic molecules. *The journal of Chemical Physics* 17 :675.

3. WALCZYK T, VON BLANCKENBURG F (2002) Natural Iron Isotope Variations in Human Blood. *Science* 295 :2065-2066.

4. KRAYENBUEHL P-A, WALCZYK T, SCHOENBERG R, VON BLANCKENBURG F, SCHULTHESS G (2005) Hereditary Hemochromatosis Is Reflected in the Iron Isotope Composition of Blood. *Blood* 105 :3812-3816.

5. ALBARÈDE F, TELOUK P, LAMBOUX A, JAOUEN K, BALTER V (2011) Isotopic evidence of unaccounted for Fe and Cu erythropoietic pathways. *Metallomics* 3 :926-933.
6. COLLINS JF, PROHASKA JR, KNUTSON MD (2010) Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutr. Rev* 68 :133-147.
7. HOTZ K, KRAYENBUEHL PA, WALCZYK T (2012) Mobilization of storage iron is reflected in the iron isotopic composition of blood in humans. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* :1-9.
8. WALCZYK T, VON BLANCKENBURG F (2005) Deciphering the iron isotope message of the human body. *International Journal of Mass Spectrometry* 242 :117-134.
9. MIDDLETON RB, LINDER MC (1993) Synthesis and Turnover of Ceruloplasmin in Rats Treated with 17 [beta]-Estradiol. *Archives of biochemistry and biophysics* 302 :362-368.
10. JOHNSON P, MILNE D, LYKKEN G (1992) Effects of age and sex on copper absorption, biological half-life, and status in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 56 :917-925.
11. WHITFIELD JB, TRELOAR S, ZHU G, POWELL LW, MARTIN NG (2003) Relative importance of female-specific and non-female-specific effects on variation in iron stores between women. *British Journal of Haematology* 120 :860-866.
12. HUNT JR, ZITO CA, JOHNSON LK (2009) Body Iron Excretion by Healthy Men and Women. *Am J Clin Nutr* 89 :1792-1798.
13. LAHEY ME, GUBLER CJ, CARTWRIGHT GE, WINTROBE MM (1953) Studies on copper metabolism. VI. Blood copper in normal human subjects 1. *J Clin Invest* 32 :322-328.
14. EMOND MJ ET AL. (1999) Quantitative study of the variability of hepatic iron concentrations. *Clinical chemistry* 45 :340-346.
15. PIERRE TGS ET AL. (2005) Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance. *Blood* 105 :855-861.
16. SMALLWOOD RA, WILLIAMS HA, ROSENOER VM, SHERLOCK S (1968) Liver-copper levels in liver disease : studies using neutron activation analysis. *The Lancet* 292 :1310-1313.
17. ANDREWS NC (2005) Understanding Heme Transport. *New England Journal of Medicine* 353 :2508-2509.
18. HELLMAN NE ET AL. (2002) Mechanisms of Copper Incorporation into Human Ceruloplasmin. *Journal of Biological Chemistry* 277 :46632-46638.
19. HARRIS ZL, DURLEY AP, MAN TK, GITLIN JD (1999) Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 :10812-10817.
20. TAVASSOLI M, KISHIMOTO T, KATAOKA M (1986) Liver endothelium mediates the hepatocyte's uptake of ceruloplasmin. *The Journal of Cell Biology* 102 :1298-1303.
21. ANBAR AD (2004) Iron stable isotopes : beyond biosignatures. *Earth and Planetary Science Letters* 217 :223-236.
22. BEARD BL ET AL. (1999) Iron isotope biosignatures. *Science* 285 :1889-1892.

23. EHRLICH S ET AL. (2004) Experimental study of the copper isotope fractionation between aqueous Cu (II) and covellite, CuS. *Chemical geology* 209 :259–269.
24. ZHU XK ET AL. (2002) Mass fractionation processes of transition metal isotopes. *Earth and Planetary Science Letters* 200 :47–62.
25. GROSS DP ET AL. (2011) Mitochondrial Ccs1 contains a structural disulfide bond crucial for the import of this unconventional substrate by the disulfide relay system. *Mol Biol Cell* 22 :3758-3767.
26. ANDREWS NC (1999) Disorders of Iron Metabolism. *New England Journal of Medicine* 341 :1986-1995.
27. LINDER M, HAZEGH-AZAM M (1996) Copper biochemistry and molecular biology. *The American Journal of Clinical Nutrition* 63 :797S -811S.
28. YANG FM ET AL. (1990) Human ceruloplasmin. Tissue-specific expression of transcripts produced by alternative splicing. *Journal of Biological Chemistry* 265 :10780–10785.
29. HARRIS ZL ET AL. (1995) Aceruloplasminemia : molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 :2539.
30. JAOUEN K ET AL. (2012) Fe and Cu stable isotopes in archeological human bones and their relationship to sex. *American Journal of Physical Anthropology*.
31. HAWKES K, O'CONNELL JF, JONES NG, ALVAREZ H, CHARNOV EL (1998) Grandmothering, menopause, and the evolution of human life histories. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 :1336.
32. MARÉCHAL CN, TÉLOUK P, ALBARÈDE F (1999) Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chemical Geology* 156 :251-273.
33. MOYNIER F, ALBARÈDE F, HERZOG GF (2006) Isotopic composition of zinc, copper, and iron in lunar samples. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70 :6103-6117.
34. WIMMER M, WILMERING B, SASSE D (1985) The relation of rat liver wet weight to dry weight. *Histochemistry* 83 :571-572.

Conclusion

Cette partie nous a permis d'illustrer le potentiel des métaux de transition pour le sexage des restes humains. Nous avons pu mettre en évidence une différence significative du $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ entre hommes et femmes dans la partie corticale des os. Cependant cette différence n'est pas enregistrée dans l'émail dentaire. Les perspectives de cet outil isotopique ne concerne donc que les os préservés de la diagenèse. Il peut s'agir de restes archéologiques récents, tels que la population de Saint-Laurent de Grenoble que nous avons analysée. Les applications pourraient également concerner les momies, qu'elles soient préservées de façon naturelle (pergélisol, absence de circulation d'eau, recouvrement par des cendres, tourbières) ou par des techniques humaines (Egypte Antique, Chine, Incas etc ...).

Au cours de cette partie, nous avons également montré que la ménopause engendrait un bouleversement isotopique, en particulier pour le cuivre. On a alors trois signatures isotopiques en fonction du sexe et du statut hormonal : les hommes possèdent un sang avec des valeurs élevées de $\delta^{65}\text{Cu}$ et faibles de $\delta^{56}\text{Fe}$, celui des femmes préménopausées se caractérise par la tendance inverse et celui des femmes postménopausées par des $\delta^{65}\text{Cu}$ « masculins » et des $\delta^{56}\text{Fe}$ intermédiaires. Dès lors, l'utilisation d'un outil de sexage isotopique doit s'accompagner d'une détermination de l'âge au décès. Cependant, on entrevoit ici le potentiel des isotopes du cuivre et du fer comme outil de détermination du statut ménopausal d'une femme décédée, ce qu'aucun outil squelettique ne permet de manière directe.

Si nous n'avons pas mis en évidence de différence isotopique en fer ou en cuivre pour l'émail dentaire de trois populations, nous pensons tout de même qu'un enrichissement en isotopes légers du cuivre pourrait être détectable pour des populations pour lesquelles la ménarche arrive précocement. Ce type d'information serait très utile pour les reconstitutions paléodémographique et permettrait également de déduire que les individus bénéficiaient d'un contexte de vie optimal (ressources alimentaires abondantes, faible travail physique des enfants. Si cette prédiction est confirmée, il serait alors très intéressant d'étudier l'enregistrement potentiel de cette différence en cuivre pour des hominidés fossiles.

Cependant, avant d'en arriver à de telles applications, il est nécessaire de mieux comprendre la variabilité isotopique propre à chaque sexe. En effet, si les gammes de valeurs du $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ diffèrent entre les sexes pour les ossements, on observe tout de même

un grande marge de recouvrement. Comprendre quels sont les paramètres environnementaux ou physiologiques à l'origine de cette variabilité permettrait de mieux cerner le champ des applications anthropologiques de l'étude des métaux de transition dans les restes humains. Il s'agit de l'objectif du prochain chapitre.

Métaux de transition : facteurs de variabilité isotopique

Introduction

Les premières études sur les métaux de transition dans le vivant, que ce soient celles venant d'être évoquées dans le précédent chapitre ou celles réalisées par d'autres auteurs, ont mis en évidence un lien entre les abondances naturelles de leurs isotopes et le sexe des individus [Walczyk et Von Blanckenburg, 2002, Walczyk et von Blanckenburg, 2005, Albarède *et al.*, 2011]. Ce lien est également détectable dans les ossements [Jaouen *et al.*, 2012] ce qui ouvre la voie au développement d'un outil isotopique de sexage des fossiles. Cependant, si le sang et les os des femmes sont caractérisés par des valeurs moyennes plus élevées de $\delta^{56}\text{Fe}$ et plus basses de $\delta^{65}\text{Cu}$ que ceux des hommes, il existe une gamme de recoupement entre les valeurs des deux sexes. L'erreur standard liée au protocole chimique et aux mesures spectrométriques ne suffit pas pour expliquer la dispersion de valeurs observée. La compréhension de l'origine de cette variabilité permettrait de mieux appréhender les perspectives d'application de l'étude des métaux de transition dans les restes humains.

Les variations isotopiques des éléments traditionnellement étudiés en anthropologie (C, N, O, S, Sr) sont généralement contraintes par l'alimentation. Les isotopes du carbone, du soufre et de l'azote sont, par ailleurs, un outil classique de reconstitution du régime alimentaire des populations passées (e.g. Buikstra et Cook, 1980, Price *et al.*, 1985, DeNiro, 1987, Richards *et al.*, 1998). De même, les isotopes de l'oxygène des os des organismes dépendent de la composition de l'eau bue par l'individu [Longinelli, 1984, Lécuyer *et al.*, 1996] et ceux du strontium de la composition isotopique du terrain d'où proviennent les aliments [Dasch, 1969, Hurst et Davis, 1981]. Les isotopes d'un élément ne possèdent pas exactement les mêmes propriétés cinétiques et thermodynamiques en raison de leur nombre inégal de neutrons au sein du noyau atomique. La différence de masse est importante pour les éléments légers, mais négligeable pour les éléments lourds. Ainsi, les isotopes d'éléments légers réagissent de façon très différente vis-à-vis des réactions chimiques alors que ceux des éléments lourds ne seront pas nécessairement affectés par un fractionnement au cours des mêmes réactions. C'est la raison pour laquelle les isotopes stables du strontium, qui possèdent des masses comprises entre 84 et 88, ne fractionnent pas lors de l'absorption intestinale. Au contraire, les rapports du carbone, l'oxygène, le soufre ou l'azote s'écartent des abondances naturelles au cours de ce processus [Minson *et al.*, 1975, DeNiro et Epstein, 1978, Bender *et al.*, 1981]. Les métaux de transition occupent des positions intermédiaires dans la classification péri-

dique entre le soufre qui fractionne lors de l'absorption intestinale et le strontium qui ne le fait pas (Figure 12.2.4). On peut donc légitimement s'interroger sur l'influence de l'alimentation sur les compositions isotopiques du cuivre, zinc et fer du corps humain.

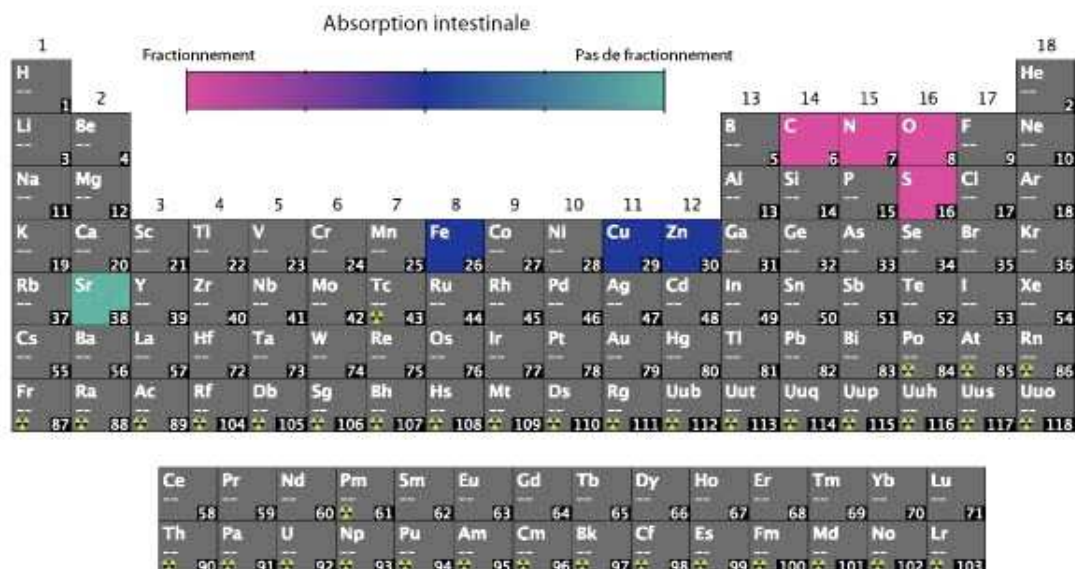


FIGURE 12.2.4: Eléments de la classification périodique dont les isotopes sont étudiés pour la reconstitution des régimes alimentaires.

La variabilité isotopique peut également être liée à l'âge des individus. En effet, deux publications récentes prédisent une accumulation de d'isotopes légers du cuivre et lourds du zinc au cours de la vie des mammifères [Balter *et al.*, 2010 ; Balter *et al.*, en préparation]. Rappelons que l'identification de l'âge au décès est un problème majeur de l'anthropologie actuelle, notamment chez les adultes. L'existence d'un outil complémentaire d'évaluation de cet âge pourrait se révéler très utile.

D'autre part, il a été vu dans la partie précédente que les os des femmes et des hommes diffèrent en moyenne pour les valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$, ce qui n'est pas le cas de l'émail dentaire. Nous avons interprété ce constat comme résultant de la faible proportion de jeunes filles menstruées au cours de l'amélogénèse des troisièmes molaires. En effet, les menstruations accroissent les besoins en fer et en cuivre des femmes et le *turnover* de ces éléments dans le corps humain s'en trouve accéléré. Le foie, qui est un réservoir en fer lourd et cuivre léger, est davantage sollicité. Cette différence de *turnover* entre hommes et femmes a été par ailleurs proposée comme origine de leurs différences isotopiques [Albarède *et al.*, 2011, Jaouen *et al.*, 2011, Hotz *et al.*, 2012]. Dès lors, le métabolisme individuel semble interférer dans les compositions isotopiques en métaux du corps hu-

main. Le métabolisme de base représente le nombre de calories minimum consommées par jour nécessaires à la survie de l'organisme. Il correspond donc à l'énergie nécessaire pour faire fonctionner l'organisme au repos en maintenant les activités métaboliques incompressibles (température du corps, respiration, battements cardiaques etc.). En anglais, il est abrégé BMR pour *basal metabolism rate*. Nous utiliserons fréquemment cette abréviation dans la suite du chapitre.

L'objectif de cette partie est de déterminer les facteurs de variabilité isotopiques du fer, cuivre et zinc chez les mammifères et en particulier, chez l'Homme. Pour cela, nous nous intéresserons en premier lieu à l'importance du métabolisme de base et du vieillissement sur la composition isotopique du corps humain. Jusqu'ici, la majorité des études portant sur la composition isotopique des métaux chez l'Homme ont été réalisées à partir de sang [Walczyk et von Blanckenburg, 2005, Walczyk et Von Blanckenburg, 2002, Stenberg *et al.*, 2005, Krayenbuehl *et al.*, 2005, Ohno *et al.*, 2004, Ohno *et al.*, 2005]. Afin de faciliter les comparaisons et d'écartier des interprétations l'influence de la minéralisation, nous présenterons des données obtenues à partir de sang total et d'érythrocytes de deux populations, l'une de Lyon, en France, et l'autre de Viliouïsk, en République Sakha (ancienne Yakoutie, en Russie). Ce travail de thèse s'inscrivant dans une perspective d'application aux questions anthropologiques, nous évaluerons dans un deuxième chapitre si les restes humains corroborent les observations obtenues dans les tissus du vivant. Les conclusions concernant les facteurs de variabilité isotopique chez l'humain seront discutées vis à vis des premières données chez les Grands Singes afin de déterminer si elles sont applicables à l'ensemble des hominidés. Enfin, nous discuterons de l'impact de l'alimentation sur les $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$ à partir des données rassemblées au cours de cette thèse.

Chapitre 13

Influence de l'âge et de la BMR sur les compositions isotopiques du sang

L'étude portant sur les individus âgés de plus de 50 ans (Chapitre 12) a permis de mettre en évidence une nette influence de la ménopause sur les valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ et de $\delta^{65}\text{Cu}$ du sang des femmes. Cependant, cette influence ne permet pas d'expliquer la dispersion des valeurs chez les hommes et chez les deux groupes de femmes (préménopausée/postménopausée) pris séparément. Dès lors, il convient d'évaluer quels sont les autres types de facteurs susceptibles d'influencer la composition isotopique du sang. Nous allons ici nous intéresser à l'influence du métabolisme de base.

Le métabolisme de base (BMR) est influencé par plusieurs facteurs, le principal étant celui de la masse corporelle [Hayssen et Lacy, 1985] et plus précisément la masse maigre, c'est à dire la masse du corps sans la masse de graisse [Weinsier *et al.*, 1992, Johnstone *et al.*, 2005]. La BMR est également très élevée lors de la croissance des enfants et adolescents [Butte *et al.*, 1995, Kashiwazaki *et al.*, 1995]. Si l'on ajuste le métabolisme en fonction de la masse maigre et en ne tenant compte que des adultes, les facteurs influençant la $\text{BMR}_{\text{ajustée}}$ ¹ sont le climat, la croissance et éventuellement l'âge :

- Plusieurs études montrent que les populations circumpolaires ont des métabolismes de base plus élevés que les populations de zones tempérées et tropicales [Rode et Shephard, 1995, Leonard *et al.*, 2002, Snodgrass *et al.*, 2005]. Les Européens brûlent également plus de calories au repos que les populations des tropiques [Henry et Rees, 1991], ce qui n'est pas le cas des Nord-Américains et Australiens [Valencia *et al.*, 1994, Piers *et al.*, 1997, Soares *et al.*, 1993, van der Ploeg et Withers, 2002].

- L'âge est un paramètre discuté. Beaucoup d'études montrent une diminution du métabolisme de base avec l'âge (e.g. Vaughan *et al.*, 1991, Benedek *et al.*, 1995, Piers *et al.*, 1998, Hunter *et al.*, 2001) mais on compte autant de travaux montrant l'absence de

1. La $\text{BMR}_{\text{ajustée}}$ correspond donc à la valeur du métabolisme de base après une correction tenant compte de la masse de graisse

corrélation, notamment chez les Yakoutes [Snodgrass *et al.*, 2005].

Lors des calculs de métabolisme de base classiques (BMR), les équations tiennent compte du sexe de l'individu [Roza et Shizgal, 1984]. Cependant, ces différences métaboliques résultent dans la variabilité de la masse de graisse individuelle. La $BMR_{ajustée}$, qui résulte d'une correction liée à la masse de graisse, est identique entre les hommes et les femmes (e.g. Owen, 1988, Piers *et al.*, 1998, Froehle et Schoeninger, 2006).

L'objectif de ce chapitre est d'identifier un lien entre composition isotopique des métaux de transition et métabolisme de base. Pour cela, on étudiera deux populations dont l'âge des volontaires est compris entre 18 et 75 ans. Par conséquent, nous discuterons par la même occasion d'un éventuel vieillissement isotopique.

13.1 Exemple de la population yakoute

Etant donné les facteurs influençant la BMR, nous avons analysé le sang de 39 hommes et femmes vivant à Viliouïsk. Cette ville est située à une latitude de 63°N. Elle est donc très proche du cercle polaire arctique et la température moyenne en hiver est aux alentours de -35°C (www.pogoda.ru.net). Il s'agit d'une zone circumpolaire, où le métabolisme de base des autochtones est élevé [Snodgrass *et al.*, 2005]. Ainsi, l'étude de la population yakoute devrait nous permettre d'envisager l'influence du métabolisme de base sur les $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$ du sang.

De plus, Viliouïsk est remarquablement isolée. La République de Sakha (ex-Yakoutie) représente environ un cinquième du territoire russe mais regroupe moins d'un million d'habitants. L'essentiel du peuplement se trouve dans ou autour de Iakoutsk, qui compte à elle seule 210 000 habitants. Viliouïsk, qui compte 10 000 habitants, est située à 600 km au nord est de Iakoutsk, dans une zone où le pergélisol est omniprésent. Les produits alimentaires sont donc majoritairement importés et assez peu diversifiés. Théoriquement, l'alimentation des habitants de cette ville est donc relativement uniforme. Si le régime alimentaire est à l'origine de la dispersion des valeurs isotopiques des métaux dans le sang, les Yakoutes devraient présenter de faibles gammes de variation du $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$. Dans tous les cas, il est possible d'obtenir un aperçu de l'influence du métabolisme de base en s'affranchissant de l'alimentation.

Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise au journal *American Journal of Physical Anthropology* en juillet 2012.

13.1.1 Article « *Basal metabolic rate, aging, and the Cu and Zn stable isotope compositions in blood of a remote Yakut population.* »

Résumé

Récemment, des différences isotopiques entre les sexes pour le fer (Fe) et le cuivre (Cu) ont été mises en évidence dans le sang et les os humains. L'origine de ces particularités isotopiques du fer et du cuivre entre hommes et femmes est attribuée à des besoins différentiels en métaux à l'âge adulte. Par conséquent, on s'attend à la disparition de cette différence sexuelle isotopique après la ménopause. Cependant, les habitudes alimentaires peuvent influencer la composition et engendrer une source de variation isotopique supplémentaire entre les individus quelque soit leur groupe d'âge. Dans le but de réduire cette source de variation potentielle, nous avons choisi une population vivant dans une région isolée de la République de Sakha, en Russie, où l'accès à des sources alimentaires variées est limité. Nous avons échantillonné le sang de volontaires yakoutes (8 hommes et 31 femmes) d'âge compris entre 18 et 74 ans. Les métaux ont été purifiés par chromatographie en phase liquide avec résine échangeuse d'ions et les compositions isotopiques ont été mesurées par spectrométrie de masse à multicollection et source plasma. Contrairement à notre hypothèse, la composition en isotopes stables des métaux du sang des femmes n'est pas influencé par la ménopause. Cependant, les compositions isotopiques en Cu et Zn décroissent et croissent, respectivement, avec l'âge. De plus, les compositions isotopiques en Cu et Zn du sang des Yakoutes sont significativement appauvries en ^{65}Cu et enrichies en ^{66}Zn par rapport aux données obtenues à partir du sang d'Européen et de Japonais. les Yakoutes sont une population circumpolaire et possèdent un métabolisme de base (BMR) élevé en réponse au stress thermique. Une forte BMR entraîne probablement un fractionnement isotopique du Cu et Zn en accélérant le renouvellement des réserves de cuivre et zinc, ce qui pourrait expliquer la signature isotopique caractéristique du sang des Yakoutes.

BASAL METABOLIC RATE, AGING, AND THE CU AND ZN STABLE ISOTOPE COMPOSITIONS IN BLOOD OF A REMOTE YAKUT POPULATION.

Klervia Jaouen^{1}, Vincent Balter¹, Morgane Gibert², Aline Lamboux¹, Philippe Telouk¹, François Fourel¹, Anatoly N. Alekseev³, Eric Crubézy²*

¹ Laboratoire de Géologie de Lyon, UMR 5276 CNRS, ENS Lyon/Université Lyon I. 46, allée d'Italie. 69007 Lyon, France.

² Laboratoire d'Anthropologie Moléculaire et Imagerie de Synthèse AMIS. UMR 5288 CNRS, Université de Toulouse III. 37, Allées Jules Guesde. 31000 Toulouse, France

³ North-Eastern Federal University, Yakutsk, Sakha (Yakutia) Republic, Russian Federation.

ABSTRACT

Recently, isotopic sex differences for iron (Fe) and copper (Cu) have been reported for human blood and bones. The origin of the Fe and Cu isotopic peculiarities between men and women is thought to be linked to their distinctive metal requirements during adulthood. The disappearance of the isotopic sex difference is therefore expected after the menopause. However, dietary habits can influence blood metal isotope compositions, being an additional source of isotopic variation within and between young and aging women. In order to reduce this putative source of variations, we selected a population living in a remote area (Sakha Republic, Russia) where the food diversity is of limited access, and sampled blood from 8 men and 31 women Yakut volunteers between the age of 18 and 74. Metals were purified by liquid chromatography on ion exchange resin and isotope compositions were measured by multiple-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. Contrary to our hypothesis, metal stable isotope compositions in women's blood are not linked to menopause. However, Cu and Zn isotope compositions decrease and increase, respectively, with age. In addition, the Cu and Zn isotope compositions of the Yakut's blood are significantly ⁶⁵Cu-depleted and ⁶⁶Zn-enriched relative to data obtained on European and Japanese blood donors. Yakut are a circumpolar population and have an elevated basal metabolic rate (BMR) in response to cold stress. Elevated BMR probably enhances Cu and Zn isotopic fractionation by accelerating the turnover of Cu and Zn stores, which could explain the characteristic isotopic signatures of the Yakut's blood.

INTRODUCTION

The assessment of age is still a major challenge in sciences because of its implications for anthropology and forensic medicine; The age at death methods are mostly based

on morphological parameters such as dental development (Novotny, 1993) and aging (Gustafson, 1950, Lamendin, 1992), morphological changes to joints (Todd and Lyon, 1925, Martin, 1958, Lovejoy et al, 1985) or ossification (Mc Kern and Stewart, 1957). However, these methods are unreliable, firstly because of the variability of aging and values of bone indicators (Hershkovitz et al, 1997; Schmitt, 2002). If multifactorial and probabilistic studies show better accuracy, they only can suggest large chronological ranges (Meindl and Lovejoy, 1985; Schmitt, 2002). As well, there is currently a try of biochemical or genetic method development, based on DNA rearrangement and T-cells (Meissner et al, 2010; Zubakov et al, 2010) but still with an imprecision around ten years for best case scenarios.

Recently, it has been demonstrated that ^{66}Zn is preferentially retained relative to ^{64}Zn in the body of experimental animals (sheep and mice), resulting in a constant ^{66}Zn -enrichment of the Zn stores throughout the life (Balter et al., 2010, Balter et al., in prep; Moynier et al, in prep). Similarly, a possible Cu isotopic drift of the Cu stores is expected to occur throughout the life of these experimental animals because they preferentially retained ^{63}Cu relative to ^{65}Cu (Balter in prep). However, this assumption has never been tested neither in aging animals nor humans. Another line of evidence that metal isotope compositions may vary during the lifespan comes from the iron (Fe) stable isotope compositions in human blood and bones. The blood and bones Fe isotope compositions, and also Cu isotope compositions, are different between men and women (Walczyk and von Blanckenburg, 2002; Albarede et al, 2011; Jaouen et al, 2012). It has been suggested that the origin of the isotopic sex differences is linked either to differential intestinal absorption between men and women (Walczyk and von Blanckenburg, 2002; 2005; Krayenbuehl et al, 2005) or Fe and Cu isotope differential reallocation among organs due to unlike Fe and Cu requirements between men and women (Albarede et al, 2011). The different Fe and Cu requirements between men and women are primarily due to menstrual blood losses, which account up each month to 1 % of the Fe and Cu blood stores. Whatever the origin of the isotopic sex difference is, an isotopic shift of women isotopic values towards men values should be expected after the menopause. Preliminary results on blood Fe isotopes for elderly women fall in the range between isotopic values of men and women without being statistically different (Walczyk and von Blanckenburg, 2005).

Beside possible "age effect" and "sex effect" on the metal stable isotope compositions of human blood, diet is likely to produce additional isotopic variations for a given sex and age. The $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ isotopic ratio of animal products is ^{56}Fe -depleted relative to plant foodstuffs due to a marked preference for light Fe isotopes during intestinal absorption (Walczyk and von Blanckenburg, 2005). The picture is more complicated for Cu and Zn isotopes because, 1) the isotopic fractionation that occurs during intestinal absorption are more subtle than for Fe and, 2) the bodily isotopic fractionation among organs are more pronounced than for Fe (Balter, 2010; Balter in prep). Nevertheless, a significant "diet effect" is expected to influence the isotopic composition of Cu and Zn of human blood.

Studies on the variations of metal stable isotope ratios in human blood are still at an early stage. Over about a hundred of published isotopic results, most of them (>95 %) are documented for young healthy Europeans (Walczyk and von Blanckenburg, 2002; Stenberg et al, 2005; Albarede et al, 2011), the remaining ~5 % being individuals from Japan (Ohno et al, 2004; 2005). The present work represents an effort to document the metal isotopic variations in blood for a group of people of varying ages, and for which the access to diversified food items is limited. We therefore sampled blood for 39 volunteers from Vilyuysk (Sakha Republic, Russia). We focused mostly on women (~3/4 of the sampling) in order to well describe the influence of the menopause on the metal isotope compositions of the blood. The contribution of any "diet effect" on the Fe, Cu, and Zn isotope compositions was identified by measuring the carbon and nitrogen isotope compositions ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, respectively).

MATERIAL

The human blood material for this study was collected on 8 men and 31 women at Vilyuysk (Sakha Republic, Russia). Vilyuysk is located on the Vilyuy River, a Lena's tributary (63°45'N, 121°37'E). The blood was collected in Vacuette sampling tubes (Trace Elements grade) after collection of an informal consent. Blood from 5 French people were also sampled in order to allow comparisons with literature data and Yakut's values. The volunteers were residents of Lyon (Rhône Alpes, France), a city on the Rhone River. The blood was collected in Vacuette sampling tubes (Trace Elements grade) after collection of a written informed consent. A questionnaire comprising the age of the volunteer and for women, the menopausal status, was systematically collected. In both cases, the blood collection was anonymous, and was performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines.

METHODS

The metals analyzed were separated on quartz columns containing 3 mL macroporous anion-exchange resin following the technique of Maréchal and Albarède (2002). Samples were loaded onto the columns in 7 N HCl and rinsed in 10 mL 7 N HCl + H₂O₂ 0.001 %. Copper was eluted by 20 mL 7 N HCl + H₂O₂ 0.001 %, Fe by 10 mL 2 N HCl + H₂O₂ 0.001 %, and Zn by 10 mL 0.5 N HNO₃. The Fe and Cu fractions were purified using the same method. The Zn fraction was purified using the protocol developed by Moynier et al (2006). For carbon and nitrogen analyses, 1 ml of blood were sampled and freeze-dried. About 300 µg were weighed into tin reaction capsules and loaded into the autosampler of the elemental analyzer.

Isotopic ratios of copper and zinc were determined on a Nu-HR multiple-collector inductively-coupled plasma mass spectrometer (MC-ICPMS) using wet plasma. Instrumental mass fractionation was corrected using elemental-doping and standard sample bracketing following the recommendations provided by Albarède *et al.* (2004). Iron stable

isotopes were run on a large-radius high resolution Nu-1700 MC-ICPMS operated at a resolution of 4500 as dry plasma. For both mass spectrometers, samples were introduced by free aspiration in 0.05 N sub-boiled distilled HNO_3 . Samples were randomized and duplicates were produced to avoid systematic errors. However, no mass spectrometer replicate has been measured for copper isotopes because samples do not contain enough copper. The external reproducibility based on the repeated measurement of in-house standards is given in Table 1. Iron, copper and zinc concentrations were determined using inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Agilent 7500 CX). For carbon and nitrogen, isotopic measurements were performed by EA-pyrolysis (PyroCube analyzer, Purge and trap mode) using a system interfaced in continuous flow mode to an IRMS (GVI IsoPrime). Each sample has been measured three times and average value is given Table S1. The reproducibility on isotopic ratios is 0.2 ‰ for carbon, 0.1 ‰ for nitrogen, 0.07 ‰ for Cu and Zn and 0.15 for Fe ‰.

Shapiro-Wilk's tests were used in order to assess if data follow normal distributions. Bilateral Student's t tests for each isotopic ratio were conducted between men and women. Concerning statistical tests involving data per age group, Kruskal Wallis tests were performed because these do not require normal distributions. The δ notation indicates the deviation in parts permil of a particular isotopic ratio relative to a specific standard. Here, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$ and $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$, are used throughout. We adopted PDB C standard, AIR N standard, NIST Cu standard SRM 976, JMC Lyon Zn standard, and IRMM-14 Fe standard.

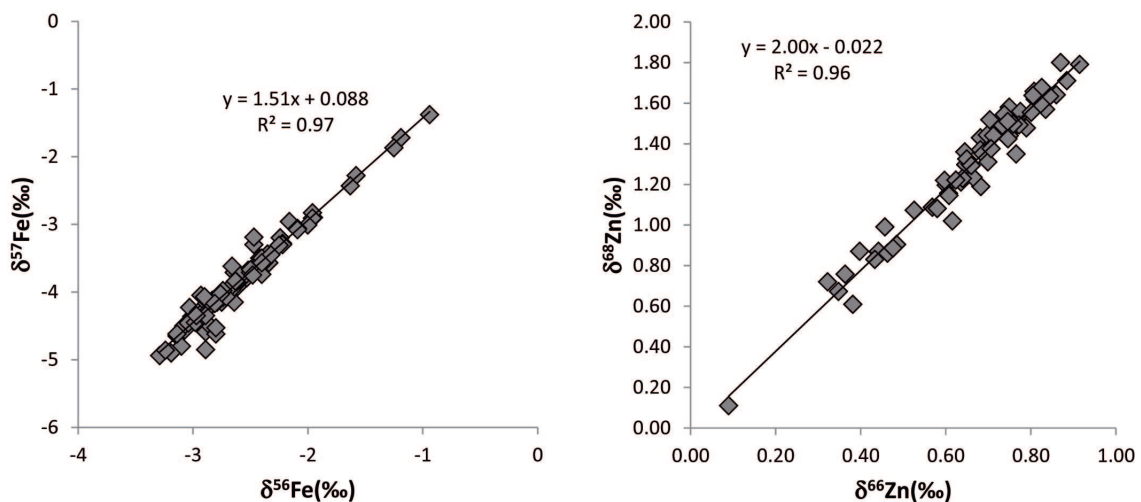


FIGURE 13.1.1: Fractionation lines between different isotopes. A $\delta^{56}\text{Fe}$ vs $\delta^{57}\text{Fe}$; B $\delta^{66}\text{Zn}$ vs $\delta^{68}\text{Zn}$. All the samples fall on the theoretical mass-dependent fractionation lines.

Sample name	Mean	Range (‰)		SD	n
	$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰)	min	max		
GB9	0.13	-0.02	0.23	0.05	20
Cu49n	-0.4	-0.46	-0.33	0.04	11
Cu49o	-0.29	-0.36	-0.22	0.04	9
	$\delta^{56}\text{Fe}$ (‰)	min	max		
L1	-2.88	-2.97	-2.77	0.06	20
3H	-1.91	-1.93	-1.9	0.01	5
	$\delta^{66}\text{Zn}$ (‰)	min	max		
Zn9	0.02	-0.06	0.07	0.05	6
ZnST9	0.25	0.15	0.35	0.06	10
	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	min	max		
stdAA	-6.48	-6.51	-6.47	0.01	10
	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	min	max		
stdAA	-24.79	-24.96	-24.54	0.01	0.10

TABLE 13.1: Variability of the isotopic measurements for 9 samples : SD : standard deviation of the mean n=number of analyses.

	$\delta^{65}\text{Cu}$		$\delta^{56}\text{Fe}$		$\delta^{66}\text{Zn}$	
	R ²	p	R ²	p	R ²	p
$\delta^{13}\text{C}$	0.03	0.28	0.004	0.67	0.01	0.54
$\delta^{15}\text{N}$	0.01	0.6	0.04	0.22	0.02	0.45

TABLE 13.2: Correlation coefficient and associated p value for fisher test between diet isotopic proxies and metal stable isotopes.

RESULTS

The complete dataset of blood isotopic results is reported in the Appendix²(Table S1 and S2), and a synthetic overview containing statistical results is given in Table 3. The range of values between duplicates is lower than the two standard deviation calculated on the appropriate standard (Appendix, Table S1). We checked that isotopic fractionation is mass-dependent for all the samples, i.e. $\delta^{67}\text{Zn}$ and $\delta^{68}\text{Zn}$ equal $1.5*\delta^{66}\text{Zn}$ and $2.0*\delta^{66}\text{Zn}$, respectively. For $\delta^{57}\text{Fe}$, a slope of $1.5*\delta^{56}\text{Fe}$ is expected. Different slopes values would indicate an instrumental mass-independent fractionation. All the data exhibit normal mass-dependent fractionation (Fig. 13.1.1).

No correlation is found between the isotopic diet proxies ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) and the metal isotope compositions (Table 13.2), while $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ seem to be weakly correlated ($R^2=0.23$, $p=0.002$). A significant difference for $\delta^{66}\text{Zn}$ exists between premenopausal and postmenopausal women (t test, $p<0.05$). For Cu, despite the fact that the $\delta^{65}\text{Cu}$ values of postmenopausal women cover the entire range of the observed isotopic variations, premenopausal and postmenopausal women are significantly different (t test, $p<0.005$). Surprisingly, we do not notice any $\delta^{56}\text{Fe}$ - $\delta^{65}\text{Cu}$ sex difference even when only premenopausal women were taken into account (Table 13.3). This is probably due to the weak number of men that were recruited in the study. The $\delta^{65}\text{Cu}$ and $\delta^{66}\text{Zn}$ values are correlated negatively and positively, respectively, to age (Fig 13.1.2) while the $\delta^{56}\text{Fe}$ values are insensible to age ($R^2=0.008$; $p=0.59$). The dependence of the $\delta^{65}\text{Cu}$ and $\delta^{66}\text{Zn}$ values to age is more significant when women are considered without men ($R^2=0.29$, $p=0.004$; $R^2=0.32$, $p=0.001$, respectively). For Zn, examination of the isotopic variations between three age groups : "young" (18-39 years old, 10 women, 3 men), "mature" (40-59 years old, 17 women, 4 men) and "old" (60-79 years old, 4 women, 1 man), reveals statistical significant differences between each age groups (Table 13.5). For Cu, the isotopic values were different between "young" and "old" groups but not between "young" and "mature" groups (Table 13.5). Concerning other elements, we did not find statistical differences between the groups except for nitrogen, between young and mature individuals, when men were taking into account.

An unexpected result is the clear differences between the Yakut $\delta^{65}\text{Cu}$ and $\delta^{66}\text{Zn}$ blood values and those from the reference panel (Fig 13.1.3). The $\delta^{56}\text{Fe}$ values in Yakut's blood are, however, similar to those of the reference panel. Results of the statistical tests performed between population groups for $\delta^{65}\text{Cu}$, $\delta^{66}\text{Zn}$ and $\delta^{56}\text{Fe}$ are given Table . These tests were not possible for ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ data as only one other study has been conducted on human blood and detailed tables of results were not available (Kraft et al, 2008). Moreover, we here analyzed whole blood whereas Kraft et al worked on clot and serum. Knowing that clot represents 45 % of the whole blood and that clot and serum

2. disponible Annexe B dans ce manuscrit

	n	$\delta^{56}\text{Fe}(\text{‰})$	SD	min	max
Premenopausal women	14	-2.65	0.33	-3.14	-1.74
Postmenopausal women	17	-2.60	0.48	-3.16	-1.13
Men	8	-2.63	0.44	-3.12	-1.96
p1		0.75			
p2		0.9			
		$\delta^{65}\text{Cu}(\text{‰})$	SD		
Premenopausal women	14	-0.52	0.22	-0.92	-0.22
Postmenopausal women	17	-0.84	0.34	-1.37	-0.31
Men	8	-0.74	0.30	-1.14	-0.32
p1		0.003			
p2		0.04			
		$\delta^{66}\text{Zn}(\text{‰})$	SD		
Premenopausal women	14	0.64	0.15	0.2	0.86
Postmenopausal women	17	0.76	0.14	0.36	0.91
Men	7	0.74	0.03	0.7	0.78
p1		0.03			
p2		0.08			
	n	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	SD	min	max
Premenopausal women	14	-24.03	0.42	-24.81	-23.25
Postmenopausal women	17	-24.20	0.66	-25.09	-22.6
Men	8	-23.88	0.56	-24.53	-23.17
p1		0.41			
p2		0.45			
	n	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	SD	min	max
Premenopausal women	14	9.74	0.45	9.18	11.02
Postmenopausal women	17	9.93	0.43	9.18	10.57
Men	8	9.77	0.47	9.07	10.58
p1	0.25				
p2	0.86				

TABLE 13.3: Average isotope compositions in delta units (permil or ‰) and 95 % range (2SD) for the isotope compositions of Fe, Cu, Zn, C and N in blood. Typical analytical uncertainties are 0.07 ‰ for Fe, Cu and Zn ‰ and 0.1 for C and N.

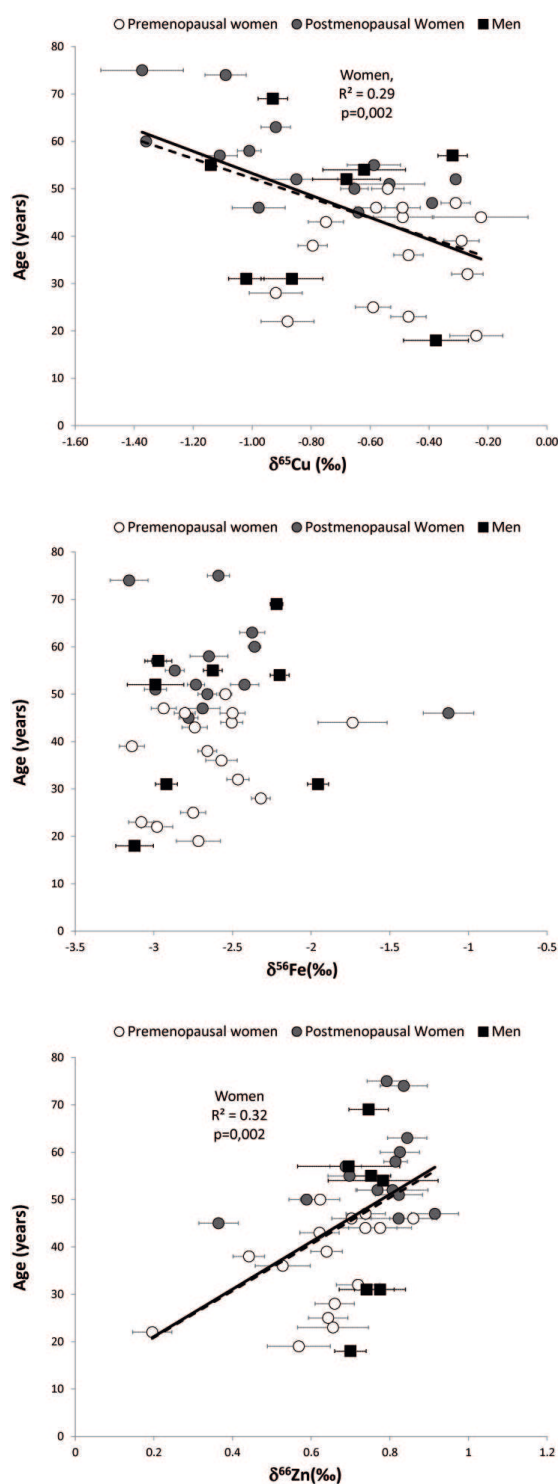


FIGURE 13.1.2: Relationship between $\delta^{65}\text{Cu}$, $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{66}\text{Zn}$ and age for Yakut population. Error bars represent the highest value between standard deviation of sample replicates (SD_{sample}) and the one of standard replicates (SD_{std}). Dashed line represents the correlation between isotopic values and age for both sex and the solid line only concerns women.

Women			All data		
$\delta^{65}\text{Cu}(\text{‰})$			$\delta^{65}\text{Cu}(\text{‰})$		
	Young	Mature		Young	Mature
Mature	0.77		Mature	0.32	
Old	7.64**	7.23**	Old	8.76**	7.65**
$\delta^{66}\text{Zn}(\text{‰})$			$\delta^{66}\text{Zn}(\text{‰})$		
	Young	Mature		Young	Mature
Mature	6.81*		Mature	5.74*	
Old	8.00**	3.88*	Old	9.64**	3.61
$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$			$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$		
	Young	Mature		Young	Mature
Mature	3.0025	0.65	Mature	6.16*	
Old	0.4059		Old	0.97	1.22

TABLE 13.4: Chi-2 results for a Kruskal-Wallis test performed for Cu, Fe and Zn isotope composition between pairs of age groups. For two populations (k-1) and a level of significance of 5 % (± 0.05), χ^2 equals 3.84. * is for significant results, i.e. when $p < 0.05$. OA= Old adults, >59 years old, MA= mature adults, 40-59 years old, YA= young adults, <29 years old. (YA+MA) corresponds to values for individuals classified in the age groups YA, MA and YA/MA. Kruskal Wallis test are performed for both sexes taken together (All data) and separately (Women).

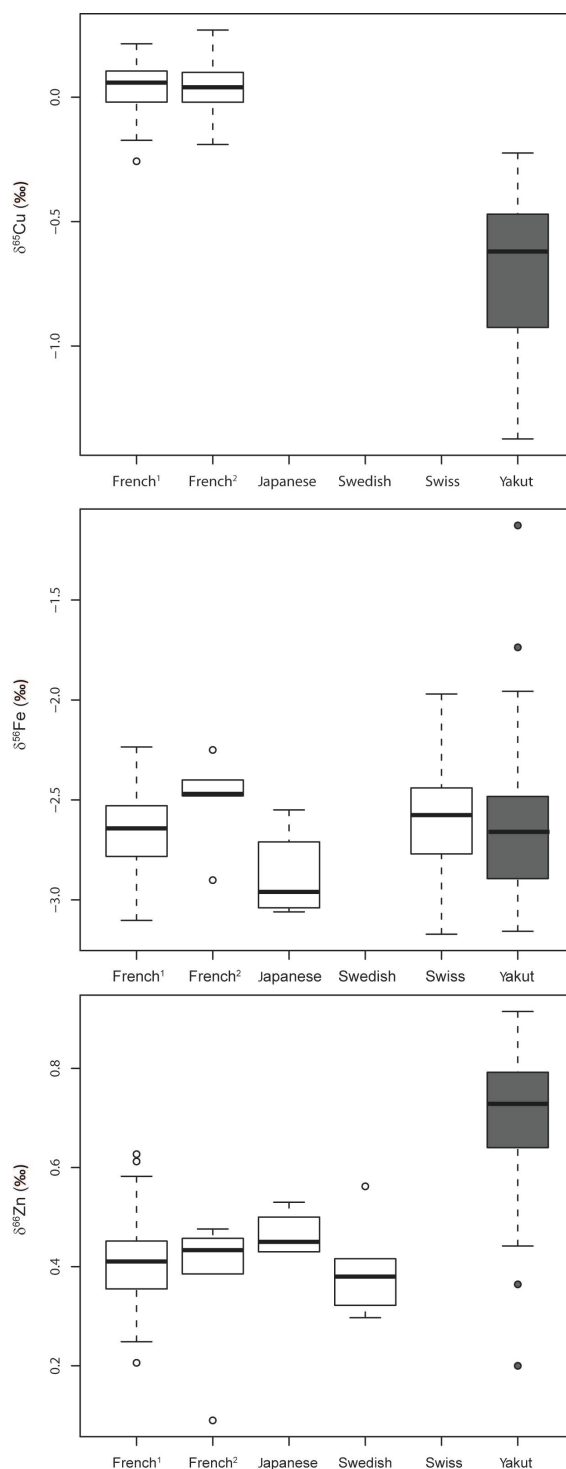


FIGURE 13.1.3: Fe, Cu, and Zn isotope variations of blood for 6 populations. Data are from this study (French2, Yakut), Albarede et al, 2011 (French1), Ohno et al, 2004 (Japanese), Ohno et al, 2005 (Japanese), Stenberg et al, 2005 (Swedish), Walczyk and von Blanckenburg, 2002 (Swiss). The box represents the 25th-75th percentiles (with the median as a bold vertical line) and the whiskers show the 10th-90th percentiles.

isotopic values are correlated (Kraft et al, 2008), we can predict the range existing in whole blood for North American individuals with the simple equation :

$$\delta^x E_{whole\ blood} = \delta^x E_{clot} * 0.45 + \delta^x E_{serum}$$

where E is the name of the element and x the mass of the heavier isotope. Results give a range of -16.07 to -23.29 ‰ for $\delta^{13}C$ and 7.07 to 9.54 ‰ for $\delta^{15}N$ (Fig 13.1.4). Yakut values are thus distinct from those obtained in North American blood, but also from the ratio we obtained for a French individual (Table 13.1, Fig 13.1.4).

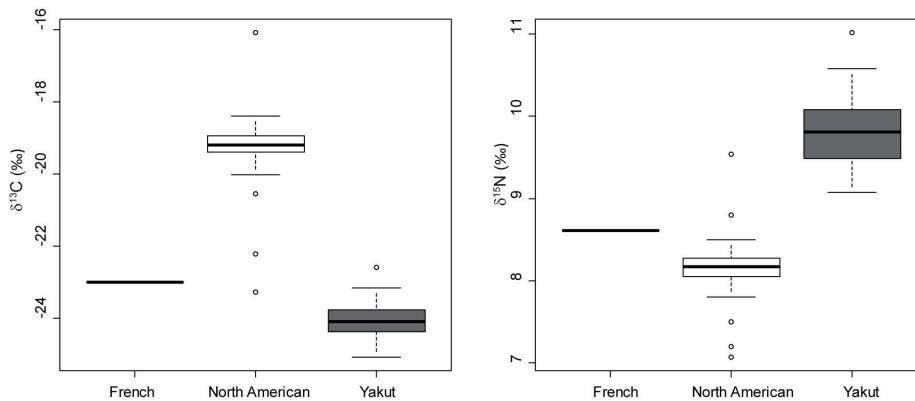


FIGURE 13.1.4: N and C isotope variations of blood for 2 populations and an individual from a third one. Data are from this study (French, Yakut) and Kraft et al, 2008 (North American). As no table of results was available for whole blood in Kraft et al, 2008, we used the equations developed in the text in order to predict the mean, the standard deviation and the extreme values of the North American for $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$. We then choose random values which fit with the predicted parameters. The box represents the 25th-75th percentiles (with the median as a bold vertical line) of this assumed distribution and the whiskers show the 10th-90th percentiles.

DISCUSSION

Influence of menopause on blood metal stable isotope compositions.

We surmised initially that the cessation at the menopause of the differential body turnover and/or intestinal absorption, which are thought to produce the Fe and Cu isotopic sex differences observed in blood, would led aging postmenopausal women isotopic values to be closer to men's ones. Unfortunately, this assumption cannot be tested here

	$\delta^{56}\text{Fe}(\text{‰})$				
	Mean	SD	n	p1	p2
Yakuts	-2.62	0.4	39	-	1.82
French (this study)	-2.5	0.24	5	1.82	-
French (1)	-2.65	0.19	47	0.22	2.75
Japanese (2)	-2.91	0.23	6	3.50	5.63*
Swedish (3)	-	-	-	-	-
Swiss (4)	-2.59	0.25	44	1.72	1.09
	$\delta^{65}\text{Cu}(\text{‰})$				
	Mean	SD	n	p1	p2
Yakut	-0.7	0.32	39	-	13***
French (this study)	0.04	0.17	5	13***	-
French (1)	0.04	0.1	47	62.93*****	0.02
Japanese (2)	-	-	-	-	-
Swedish (3)	-	-	-	-	-
Swiss (4)	-	-	-	-	-
	$\delta^{66}\text{Zn}(\text{‰})$				
	Mean	SD	n	p1	p2
Yakut	0.68	0.31	39	-	10.37**
French (this study)	0.37	0.16	5	10.37**	-
French (1)	0.41	0.09	47	48.27***	0.02
Japanese (2)	0.45	0.05	5	9.65**	0.27
Swedish (3)	0.4	0.1	5	10.37**	0.27
Swiss (4)	-	-	-	-	-

TABLE 13.5: Mean, standard deviation and Chi-2 results for a Kruskal-Wallis test performed for Cu, Fe and Zn isotope composition between population from different studies (1) Albarede et al, 2011; (2) Ohno et al 2004 and 2005; (3) Stenberg et al, 2005; (4) Walczyk and von Blanckenburg (2002). P1= p values for test performed between Yakut values and the one from another population. P2=p value for test performed between French values from this study and the ones from other population. For two populations (k-1) and a level of significance of 5 % (± 0.05), χ^2 equals 3.84. * is for significant results, i.e. when $p < 0.05$. * corresponds to $p < 0.05$; ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 10^{-10}$

due to the weak number of men volunteers. However, significant differences of the Cu isotope compositions, but not of the Fe isotope compositions, exist between postmenopausal and premenopausal women's values. Therefore, little evidence exists that the Fe and Cu isotope compositions are relevant proxies for tracking metabolic changes around menopause.

Influence of age on blood metal stable isotope compositions.

We report significant correlations between blood Cu and Zn isotope compositions and age (Fig 13.1.3). It is noteworthy that such a correlation is likely to explain the $\delta^{65}\text{Cu}$ difference between postmenopausal and premenopausal women, because the formers are older than the latter. The correlations between blood Cu and Zn isotope compositions and age convey a noticeable dispersion, as suggested by the weak correlation coefficients ($R^2 \approx 0.30$ for both elements). This is particularly true for the Cu isotope compositions, for which no statistical difference can be seen between "young" and "mature" groups (Table 13.4). Nevertheless, these results constitute the first demonstration that monotonous Zn heavy isotopes enrichment and Cu heavy isotopes depletion are observed in human blood throughout lifespan, and are consistent with Balter et al (2010) predictions based on sheep and mice experimentations. Taken together, these lines of evidence argue for a common mechanism of Cu and Zn isotopic fractionation amongst mice, sheep and humans, i.e. amongst mammals. The origin of the Cu and Zn isotopic fractionation could be unraveled using further experiments using the mouse model, which is the easiest to handle. This would represent an opportunity to test whether the blood Cu and Zn isotope compositions are recorded in bones. In such a case, the bone Cu and Zn isotope compositions could be an interesting tool to evaluate the age at death in past human populations.

Influence of diet on blood metal stable isotope compositions.

The average $\delta^{65}\text{Cu}$ and $\delta^{66}\text{Zn}$ values in Yakut's blood are very different to that of the reference panel, which is composed of French, Swedish, Swiss and Japanese people (Fig. 13.1.3). Two explanations can account for these effects. The first explanation is linked to a possible specific diet for Yakut. This hypothesis is supported by the Yakut's blood C and N isotope compositions, which are very different to that of North American people and the French individual we analyzed in this study (Kraft et al, 2008). Taking an average value of $<1\text{‰}$ and $\sim 1\text{‰}$ for the ^{13}C - and the ^{15}N -enrichments, respectively, between diet and blood (Dalerum et al, 2005), the $\delta^{13}\text{C}$ and the $\delta^{15}\text{N}$ values of the Yakut's diet must lie around -23‰ and 11‰ , respectively. The reconstructed diet is typical of a C3 environment protein-rich diet, and can include a large fraction of fish products (Dufour et al, 1999; Katzenberg et al, 2010). This diet is in accordance with the local dietary habits for the C3 plants consumption but individual diets exhibit very different proportion of fish products (Gibert, Pers. Comm.). By comparison, the North American diet, which

generates average blood $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of -19 ‰ and 8 ‰ (Kraft et al, 2008), respectively, is mainly based on C4-based dietary foodstuffs and is composed partly by half products of animal origin (<http://www.usda.gov/factbook/chapter2.pdf>). Animal experiments Cu and Zn isotopic data (Balter et al, 2010, in prep) support the hypothesis of a very high proportion of animal products in the diet of the Yakuts, because the muscles of mice and sheep are systematically ^{65}Cu -depleted and ^{66}Zn -enriched relative to the diet. Stating that the Cu and Zn isotopes compositions in meat are not fractionated during intestinal absorption, and that the European and North American diets are comparable, an important and enduring consumption of meat is likely to explain why the blood $\delta^{65}\text{Cu}$ and $\delta^{66}\text{Zn}$ values of Yakuts are ^{65}Cu -depleted and ^{66}Zn -enriched relative to Europeans. However, this explanation fails to explain the absence of correlation between $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ and metal isotopic ratios.

Influence of basal metabolic rate (BMR) on blood metal stable isotope compositions.

Another possibility lies in a metabolic difference of the Yakut compared to Japanese and Europeans. Indigenous circumpolar populations, including Yakut, exhibit elevated body metabolic rate (BMR) (Leonard et al, 2002; Snodgrass et al, 2005; Rode and Shepard, 2010). This metabolic particularity is attributed to a physiological adaptation to cold stress (Roberts, 1952), by up-regulation of thyroid hormones (Leonard et al 2002). If the BMR is elevated, it conveys a higher turnover of nutriment, metals included. A higher turnover of Fe has been suggested as the origin of isotopic differences between men and women, with an enrichment of ^{56}Fe in women's blood (Jaouen et al, 2011, Albarede et al, 2011). Because the Fe and Cu metabolisms are intimately linked (Collins et al, 2010), the turnover of Cu is also higher in women than in men, leading to a ^{63}Cu enrichment in women's blood (Jaouen et al, 2011, Albarede et al, 2011). If this holds for to Zn, a higher turnover should generate higher $\delta^{66}\text{Zn}$ in blood because ^{66}Zn is preferentially absorbed and retained in body (Balter et al, 2010). It can be objected that Scandinavians (Uema) are also a circumpolar population although their blood Zn isotope composition is similar to that of French and Japanese (Stenberg et al, 2005). Still, the cold stress is certainly higher in Vilyuysk than in Umea with temperature often reaching -50°C in winter (Ferret et al, 1998).

Whatever is the origin of the blood Cu and Zn isotopic differences between Yakuts and Europeans, this can have potential implications for paleoanthropology and paleoecology. If confirmed by studies aimed at describing the fractionation of the metal isotope compositions in trophic chains, the $\delta^{65}\text{Cu}$ and $\delta^{66}\text{Zn}$ values of fossil bones could be used for paleoecological and paleodietary purposes. These could also be used, in addition to the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ proxies, to decipher cold stress adaptation and high protein diet consumption in Neanderthals and Anatomically Modern Humans.

CONCLUSION

The present study shows Cu and Zn isotopic specificities in Yakut blood, which are probably linked to the more elevated BMRs of circumpolar populations. We also show that a relationship exists between age and blood $\delta^{65}\text{Cu}$ and $\delta^{66}\text{Zn}$ values, with an enrichment in light Cu isotopes and heavy Zn isotopes in elderly women's blood. We suggest that this observation could be due to the preferential retention of light Cu isotopes and heavy Zn isotopes by the body. In order to confirm this assumption, the correlation should be tested in men's blood and other population groups. The relationship between age and blood $\delta^{65}\text{Cu}$ and $\delta^{66}\text{Zn}$ values should be tested for bones for potential applications of age at death assessment in anthropology and forensic sciences. This is the first time that an isotopic drift through age is reported. We do not know yet the molecular effects of the evolution of the isotopic ratios with age, but we believe that this is an avenue to explore in biomedical sciences.

Acknowledgments :

This work was supported by grants from the Bullukian Foundation and the Biomérieux Research Foundation. The French archaeological Mission in Oriental Siberia (Ministère des Affaires Etrangères et Européennes, France), the North-Eastern Federal University (Yakutsk, Sakha Republic), the program HUMAD from IPEV (Institut Polaire Français Paul Emile Victor) also funded the program. Administrative and research works of this project were permitted through the program of the France Russia Associated International Laboratory (LIA COSIE number 1029), associating the North-Eastern Federal University (Yakutsk, Sakha Republic), the State medical University of Krasnoyarsk, the Russia Foundation for the Fundamental Research (Moscow, Russia), the University of Paul Sabatier Toulouse III (France), the University of Strasbourg I (France) and the National Centre of Scientific Research (Paris, France).

REFERENCES

- ALBARÈDE F, TELOUK P, Blichert-Toft J, Boyet M, AGRANIER A, AND NELSON B. 2004. Precise and accurate isotopic measurements using multiple-collector ICPMS. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68 :2725-2744.
- ALBARÈDE F, TELOUK P, LAMBOUX A, JAOUEN K, AND BALTER V. 2011. Isotopic evidence of unaccounted for Fe and Cu erythropoietic pathways. *Metallomics* 3 :926-933
- BALTER V, ZAZZO A, MOLONEY AP, MOYNIER F, SCHMIDT O, MONAHAN FJ, AND ALBARÈDE F. 2010. Bodily variability of zinc natural isotope abundances in sheep. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 :605-612.
- COLLINS JF, PROHASKA JR, AND KNUTSON MD. 2010. Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutr. Rev* 68 :133-147.
- DALERUM F, AND ANGERBJÖRN A. 2005. Resolving temporal variation in vertebrate diets using naturally occurring stable isotopes. *Oecologia* 144 :647-658.

DUFOUR E, BOCHERENS H, AND MARIOTTI A. 1999. Palaeodietary Implications of Isotopic Variability in Eurasian Lacustrine Fish. *Journal of Archaeological Science* 26 :617-627

EZZATI M, MARTIN H, SKJOLD S, HOORN SV, AND MURRAY CJL. 2006. Trends in National and State-Level Obesity in the USA After Correction for Self-Report Bias : Analysis of Health Surveys. *JRSM* 99 :250-257.

FULLER BT, FULLER JL, SAGE NE, HARRIS DA, O'CONNELL TC, AND HEDGES REM. 2004. Nitrogen balance and $\delta^{15}\text{N}$: why you're not what you eat during pregnancy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18 :2889-2896.

GUSTAFSON G. 1950. Age determination on teeth. *Journal of the American Dental Association* (1939) 41 :45.

GALLOWAY VA, LEONARD WR, AND IVAKINE E. 1999. Basal metabolic adaptation of the Evenki reindeer herders of Central Siberia. *American Journal of Human Biology* 12 :75-87.

HERSHKOVITZ I, LATIMER B, DUTOUR O, JELLEMA LM, WISH-BARATZ S, ROTH-SCHILD C, AND ROTHSCHILD BM. 1998. Why do we fail in aging the skull from the sagittal suture? *American Journal of Physical Anthropology* 103 :393-399.

JAOUEN K, BALTER V, LAMBOUX A, HERRSCHER E, TELOUK P, ALBARÈDE F. 2011. Sexing human blood and bones with metal stable isotopes. *American Journal of Physical Anthropology* 144 :177-177.

JAOUEN K, BALTER V, LAMBOUX A, TELOUK P, HERRSCHER E, AND ALBARÈDE F. 2012. Fe and Cu stable isotopes in archeological human bones and their relationship to sex. *American Journal of Physical Anthropology*.

KATZENBERG MA, MCKENZIE HG, LOSEY RJ, GORIUNOVA OI, AND WEBER A. Prehistoric dietary adaptations among hunter-fisher-gatherers from the Little Sea of Lake Baikal, Siberia, Russian Federation. *Journal of Archaeological Science*

KRAFT RA, JAHREN AH, AND SAUDEK CD. 2008. Clinical scale investigation of stable isotopes in human blood : $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ from 406 patients at the Johns Hopkins Medical Institutions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22 :3683-3692.

KRAYENBUEHL P-A, WALCZYK T, SCHOENBERG R, VON BLANCKENBURG F, AND SCHULTHESS G. 2005. Hereditary hemochromatosis is reflected in the iron isotope composition of blood. *Blood* 105 :3812-3816.

LAMENDIN H, E B, JF H, JC T, RM N, AND A Z. 1992. A simple technique for age estimation in adult corpses : the two criteria dental method. *Journal of forensic sciences* 37 :1373.

LEE-THORP JA, SEALY JC, AND VAN DER MERWE NJ. 1989. Stable carbon isotope ratio differences between bone collagen and bone apatite, and their relationship to diet. *Journal of Archaeological Science* 16 :585-599.

LEONARD WR, SORENSEN MV, GALLOWAY VA, SPENCER GJ, MOSHER MJ, OSIPOVA L, AND SPITSYN VA. 2002. Climatic influences on basal metabolic rates among circumpolar populations. *American Journal of Human Biology* 14 :609-620.

LOVEJOY CO, MEINDL RS, MENSFORTH RP, AND BARTON TJ. 1985a. Multifactorial determination of skeletal age at death : A method and blind tests of its accuracy. *Am. J. Phys. Anthropol.* 68 :1-14.

LOVEJOY CO, MEINDL RS, PRYZBECK TR, AND MENSFORTH RP. 1985b. Chronological metamorphosis of the auricular surface of the ilium : A new method for the determination of adult skeletal age at death. *American Journal of Physical Anthropology* 68 :15-28.

MARTIN R. 1928. *Lehrbuch der Anthropologie in systematischer Darstellung mit besonderer Berücksichtigung der anthropologischen Methoden für Studierende Ärzte und Forschungsreisende* : Bd. Bibliographie, Literaturverzeichnis, Sachregister, Autorenregister. G.

FISCHER. MARÉCHAL C, AND ALBARÈDE F. 2002. Ion-exchange fractionation of copper and zinc isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66 :1499-1509.

MCKERN TW, AND STEWART TD. 1957. Skeletal age changes in young American males analysed from the standpoint of age identification. DTIC Document. Meissner C, and Ritz-Timme S. 2010. Molecular pathology and age estimation. *Forensic Sci. Int.* 203 :34-43.

MEKOTA A, GRUPE G, UFER S, AND CUNTZ U. 2006. Serial analysis of stable nitrogen and carbon isotopes in hair : monitoring starvation and recovery phases of patients suffering from anorexia nervosa. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20 :1604-1610.

MOYNIER F, ALBARÈDE F, AND HERZOG GF. 2006. Isotopic composition of zinc, copper, and iron in lunar samples. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70 :6103-6117.

NOVOTNY V, ISCAN MY, AND LOTH SR. 1993. Morphologic and osteometric assessment of age, sex, and race from the skull. *Forensic Analysis of the Skull* :71-88.

OHNO T, SHINOHARA A, CHIBA M, AND HIRATA T. 2005. Precise Zn isotopic ratio measurements of human red blood cell and hair samples by multiple collector-ICP-mass spectrometry. *Anal Sci* 21 :425-428.

OHNO T, SHINOHARA A, KOHGE I, CHIBA M, AND HIRATA T. 2004. Isotopic analysis of Fe in human red blood cells by multiple collector-ICP-mass spectrometry. *Anal Sci* 20 :617-621.

POLITO A, FABBRI A, FERRO-LUZZI A, CUZZOLARO M, CENSI L, CIARAPICA D, FABBRINI E, AND GIANNINI D. 2000. Basal Metabolic Rate in Anorexia Nervosa : Relation to Body Composition and Leptin Concentrations. *Am J Clin Nutr* 71 :1495-1502.

VAN RAAIJ JM, SCHONK CM, VERMAAT-MIEDEMA SH, PEEK ME, AND HAUTVAST JG. 1989. Body Fat Mass and Basal Metabolic Rate in Dutch Women Before, During, and After Pregnancy : A Reappraisal of Energy Cost of Pregnancy. *Am J Clin Nutr* 49 :765-772.

ROBERTS DF. 1952. Basal Metabolism, Race and Climate. *The Journal of the Royal Anthropological Institute of Great Britain and Ireland* 82 :169-183.

RODE A, AND SHEPHARD R.J. 2005. Basal metabolic rate of inuit. *American Journal of Human Biology* 7 :723-729.

SCALFI L, MARRA M, DE FILIPPO E, CASO G, PASANISI F, AND CONTALDO F. 2001. The prediction of basal metabolic rate in female patients with anorexia nervosa. *International Journal of Obesity* 25 :359-364.

SCHMITT A. 2002. Estimation de l'âge au décès des sujets adultes à partir du squelette : des raisons d'espérer. *Bulletins et mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris*

SCHMITT A. 2005. Une nouvelle méthode pour estimer l'âge au décès des adultes à partir de la surface sacro-pelvienne iliaque. *Bulletins et mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris* :89-101.

SNODGRASS JJ, LEONARD WR, SORENSEN MV, TARSKAIA LA, ALEKSEEV VP, AND KRIVOSHAPKIN V. 2006. The Emergence of Obesity among Indigenous Siberians. *Journal of physiological anthropology* 25 :75-84.

SNODGRASS JJ, LEONARD WR, TARSKAIA LA, ALEKSEEV VP, AND KRIVOSHAPKIN VG. 2005. Basal metabolic rate in the Yakut (Sakha) of Siberia. *American Journal of Human Biology* 17 :155-172.

STENBERG A, MALINOVSKY D, ÖHLANDER B, ANDRÉN H, FORSLING W, ENGSTRÖM L-M, WAHLIN A, ENGSTRÖM E, RODUSHKIN I, AND BAXTER DC. 2005. Measurement of iron and zinc isotopes in human whole blood : Preliminary application to the study of HFE genotypes. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19 :55-60.

TODD TW, AND LYON DW. 1925. Cranial suture closure. Its progress and age relationship. Part II.—Ectocranial closure in adult males of white stock. *American Journal of Physical Anthropology* 8 :23-45.

WALCZYK T, AND VON BLANCKENBURG F. 2002. Natural Iron Isotope Variations in Human Blood. *Science* 295 :2065 -2066.

WALCZYK T, AND VON BLANCKENBURG F. 2005. Deciphering the iron isotope message of the human body. *International Journal of Mass Spectrometry* 242 :117-134.

ZUBAKOV D, LIU F, VAN ZELM MC, VERMEULEN J, OOSTRA BA, VAN DUIJN CM, DRIESSEN GJ, VAN DONGEN JJM, KAYSER M, AND LANGERAK AW. 2010. Estimating human age from T-cell DNA rearrangements. *Curr. Biol.* 20 :R970-971.

13.2 Comparaison avec la population française.

Récemment, il a été proposé qu'il existait une dérive isotopique en zinc dans le corps d'ovidés au cours du temps étant donné que les isotopes lourds du zinc sont préférentiellement absorbés et retenus au sein de l'organisme [Balter *et al.*, 2010]. Un travail en cours démontre qu'une tendance à un enrichissement en ^{63}Cu est également attendue, alors qu'il ne semble pas exister de rétention préférentielle des isotopes du fer [Balter *et al.*, en préparation]. Ces prédictions reposent sur le fait que la composition isotopique

des fèces de mouton est enrichie en isotopes lourds du cuivre et légers du zinc par rapport à l'alimentation (Figure 13.2.1). Chez les Yakoutes, nous avons mis en évidence une corrélation entre âge et $\delta^{66}\text{Zn}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ alors qu'aucune tendance significative ne se dessine pour les isotopes du fer (Fig 1.6). Ainsi, l'absorption et la rétention fonctionnerait de manière similaire chez le mouton et l'Homme. Pourtant, cette tendance semble absolument absente pour le cuivre dans la population française que nous avons étudiée. Comment expliquer ce constat ? Qu'en est-il de l'accumulation des isotopes lourds du zinc ? Comment expliquer ces différences ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons analysé les compositions isotopiques en zinc des érythrocytes de Français de plus de 50 ans pour lesquels nous avons analysé le $\delta^{65}\text{Cu}$ et le $\delta^{56}\text{Fe}$. Nous présentons également les $\delta^{66}\text{Zn}$ des foies étudiés au cours de la même étude. Ces données seront comparées à celles obtenues par notre équipe en 2011 sur des individus âgés de 18 à 40 ans, dont des échantillons de sang avaient également été fournis par l'Établissement Français du Sang.

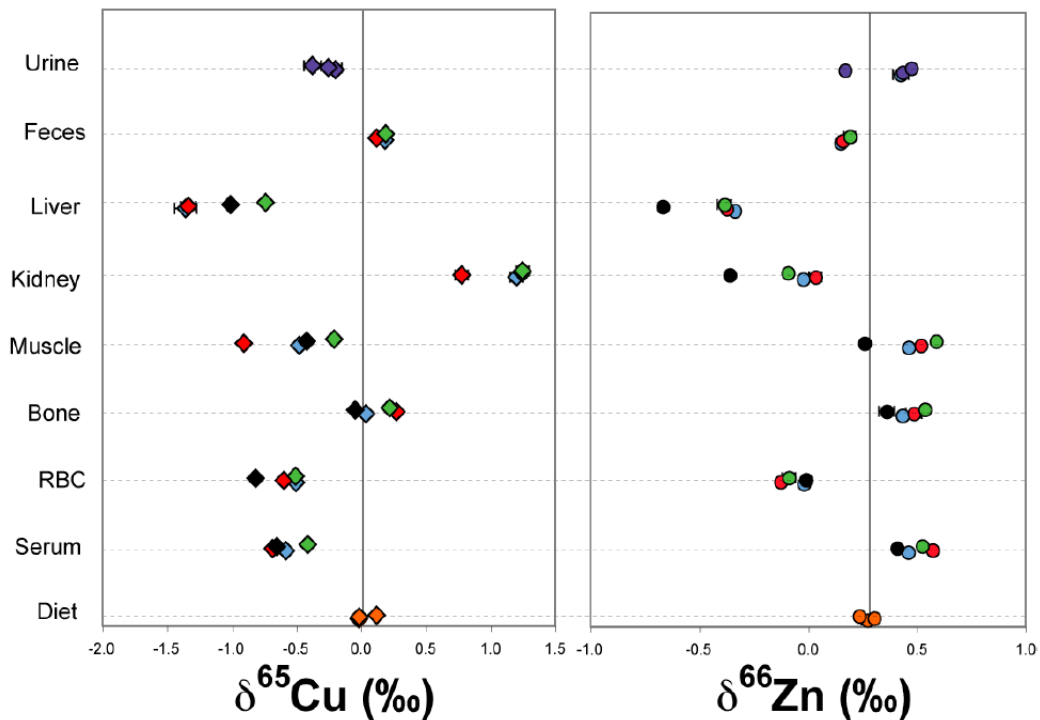


FIGURE 13.2.1: $\delta^{66}\text{Zn}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ de divers organes, fluides, tissus et du régime alimentaire de 4 moutons (Balter *et al.*, 2010 ; Balter in prep).

13.2.1 Résultats

Les données de zinc de foies et d'érythrocytes de Français âgés de plus de 50 ans sont données en annexe C et représentées dans la figure 13.2.2. La composition isotopique

du foie va de -1.04 à -0.37 ‰. Elle est donc très appauvrie en ^{66}Zn par rapport aux érythrocytes qui varient entre 0.24 et 0.63 ‰. En moyenne, la composition isotopique érythrocytaire des individus âgés de plus de 50 ans est identique à celle des jeunes ($\delta^{66}\text{Zn}_{\text{âgés}}=0.43 \pm 0.10$ ‰ et $\delta^{66}\text{Zn}_{\text{jeunes}}=0.46 \pm 0.16$ ‰). Il n'y a pas de différence entre les hommes et les femmes quelque soit le groupe d'âge considéré (Figure 13.2.2).

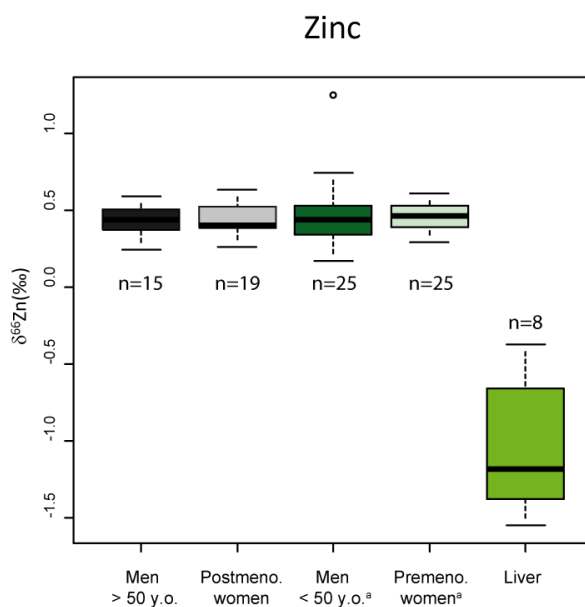


FIGURE 13.2.2: $\delta^{66}\text{Zn}$ du foie et d'érythrocytes de personnes âgées de plus de 55 ans et moins de 40 ans. ^a Données : Albarède et al., 2011

13.2.2 Discussion

13.2.2.1 Age et BMR

Contrairement au sang des Yakoutes et de la même manière que pour le cuivre, on n'observe pas de dérive isotopique en zinc au cours du temps dans le sang des Européens.

Pour expliquer l'originalité isotopique en cuivre et en zinc des Yakoutes, nous avons incriminé leur métabolisme de base, significativement plus important que chez les Européens en raison du stress thermique. Si l'on prédit le métabolisme de base à partir des équations de Schofield *et al.* (1985) et qu'on le compare aux valeurs mesurées, on observe en moyenne un écart de +17 % pour les hommes et +6 % pour les femmes [Snodgrass *et al.*, 2005]. Dès lors, on peut imaginer que l'enrichissement en ^{66}Zn et en ^{65}Cu est plus rapide dans le corps des Yakoutes que celui des Européens.

D'autre part, la Yakoutie est une région dont le pergélisol représente quasiment 95 % de la surface. Par conséquent, les zones cultivables sont très réduites et plus de 50 % de la nourriture est importée [Alcamao *et al.*, 2007]. L'alimentation des habitants de

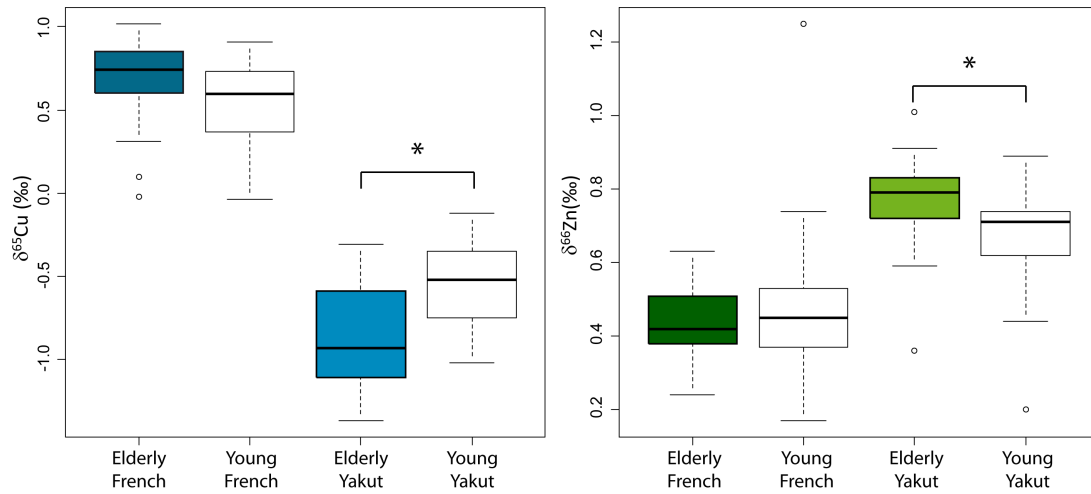


FIGURE 13.2.3: $\delta^{66}\text{Zn}$ du sang de Yakoutes âgés de plus (Elderly Yakut) et moins (Young Yakut) de 50 ans, et d'érythrocytes de Français de plus (Elderly French) et moins (Young French) de 55 ans. Les données pour les jeunes français ont été publié dans Albarède *et al.* 2011.

Viliouïsk, une ville de 10 000 personnes, est probablement plus uniforme que celle des 480 000 Lyonnais. Si l'influence du régime alimentaire sur les compositions isotopiques des métaux de transition existe, elle est susceptible de masquer la dérive isotopique au cours du temps.

Rappelons enfin que l'essentiel du cuivre du sang est contenu dans le sérum alors que seuls les érythrocytes ont été analysés pour la population française de plus de 50 ans. Cependant, il est peu probable que ce facteur soit à l'origine des différences observées entre les populations étant donné que 88 % du zinc sanguin est compris dans les érythrocytes.

Afin de trancher entre ces hypothèses, nous nous intéresserons dans le Chapitre 16 à l'impact de l'alimentation sur les $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{66}\text{Zn}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ du sang.

13.2.2.2 Effet de la ménopause

Après la ménopause, les besoins en fer et en cuivre diminuent. Etant donné que le renouvellement et/ou l'absorption du cuivre et du fer semble à l'origine des différences isotopiques entre les sexes, il est attendu que les valeurs du sang pour les femmes âgées soient plus proches de celles des hommes que celles des jeunes femmes.

Pour le cuivre, il a été mis en évidence un très net effet de la ménopause sur la composition isotopique des érythrocytes de femmes françaises, avec un enrichissement en isotopes lourds de cet élément conformément aux prédictions théoriques. Par contre, dans le cas des femmes yakoutes, la tendance est inverse et a été attribuée à un effet lié à l'âge plutôt qu'à la ménopause. Il semble effectivement que le corps retienne préférentiellement les isotopes légers du cuivre, qui s'accablent au cours du temps [Balter *et al.*, en

préparation]. Le fait que la corrélation entre l'âge et les $\delta^{65}\text{Cu}$ chez les Yakoutes soit assez floue (Fig 13.1.2) pourrait s'expliquer par les effets opposés de l'accumulation de cuivre léger et de la ménopause. En effet, la ménopause devrait d'une certaine manière « rajeunir » les valeurs isotopiques des femmes ménopausées, qui représentent 60 % du groupe d'âge des « matures » (40-60 ans). Or, on n'observe pas entre le groupe des jeunes et des matures la différence statistique qui devrait être engendrée par l'accumulation de cuivre léger au cours du temps. L'effet de la ménopause pourrait être masqué par celui de la rétention de cuivre léger.

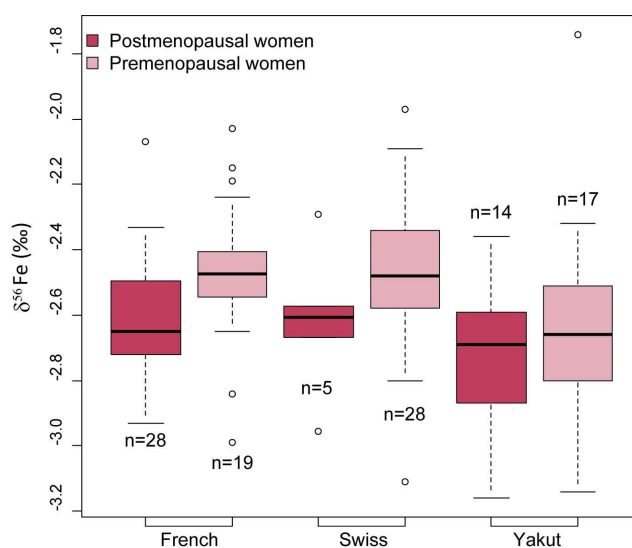


FIGURE 13.2.4: $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang et des érythrocytes (RBC) de femmes préménopausées et postménopausées. Données : Préménopausées françaises : Albarède *et al* (2011) ; Postménopausées françaises : Jaouen *et al.*, en préparation ; Suisses : Walczyk et von Blanckenburg, 2002 ; Yakoutes : Jaouen *et al.*, soumis.

Chez les femmes yakoutes comme chez les femmes françaises, aucune différence statistique n'est observée entre les valeurs obtenues dans le sang des préménopausées et des postménopausées pour les isotopes du fer (Figure 17.1.2). Ceci confirme les résultats préliminaires obtenus par Walczyk et von Blanckenburg (2005). Cependant, on constate une légère tendance pour les femmes ménopausées à posséder des $\delta^{56}\text{Fe}$ plus faibles. D'après nos calculs préliminaires sur le renouvellement du fer dans le corps humain (Partie III, Chapitre 12), nous estimons une période de 8 ans nécessaire au renouvellement de la totalité du fer dans le corps humain. Le processus est lent et peut être encore ralenti par l'accroissement progressif des réserves de fer après l'arrêt des menstruations. Whietfield *et al.* (2003) ont démontré que ces réserves augmentaient après la ménopause sans jamais pouvoir atteindre le niveau des foies des hommes. La lenteur du processus peut expliquer l'absence de différence isotopique constatée.

13.3 Conclusion

Les deux études présentées dans les chapitre 12 et 13 nous ont permis d'esquisser les paramètres susceptibles d'influencer de manière significative les compositions isotopiques des métaux de transitions.

- Le $\delta^{65}\text{Cu}$ du sang est affecté par le sexe de l'individu, son âge et son statut hormonal. On suspecte également une influence du métabolisme de base sur sa variabilité

- Le $\delta^{56}\text{Fe}$ est lui aussi affecté par le sexe de l'individu mais semble insensible au lieu de vie, à l'âge et au métabolisme de base. Il varie après la ménopause mais avec une certaine inertie comparé au $\delta^{65}\text{Cu}$.

- Au contraire du $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{56}\text{Fe}$, le $\delta^{66}\text{Zn}$ du sang ne varie pas en fonction du sexe. Il n'est pas influencé par le statut hormonal mais augmente avec l'âge.

La diversité des réponses des compositions isotopiques aux paramètres biologiques offre des perspectives d'applications très intéressantes pour l'anthropologie. En fonction de l'élément choisi, on peut en effet chercher à développer un outil de détermination du sexe, de l'âge au décès, du métabolisme de base ou encore de la ménopause.

L'objectif de la prochaine partie est de tester l'enregistrement de ces divers paramètres dans les restes humains, sans quoi aucune application archéologique n'est envisageable. Cette étude nous permettra de plus de rassembler de nouveaux éléments pour mieux comprendre la variabilité de leur influence entre populations.

Chapitre 14

Enregistrement de l'âge isotopique dans les restes humains

14.1 Introduction

Les précédents chapitres nous a permis de mettre en évidence deux facteurs de variabilité de la composition isotopique du sang pour les métaux de transition : la ménopause et le métabolisme de base.

Les échantillons de la population yakoute ont également révélé une dérive isotopique au cours du temps pour les isotopes du cuivre et du zinc. Là encore, un enregistrement isotopique de ces tendances pourrait se révéler très utile pour la communauté des anthropologues. En effet, les méthodes actuelles de l'estimation de l'âge au décès donnent des résultats avec une erreur de ± 10 ans dans le meilleur des cas, que ce soit avec les méthodes morphométriques [Meindl et Lovejoy, 1985, Schmitt, 2002, Schmitt *et al.*, 2002] ou biochimiques [Meissner et Ritz-Timme, 2010, Zubakov *et al.*, 2010].

Par conséquent, nous avons cherché à évaluer le lien entre $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$, $\delta^{66}\text{Zn}$, l'âge au décès et la ménopause dans les ossements et l'émail dentaire des populations sur lesquelles nous avons travaillé au cours de cette thèse. Lors de l'étude sur la population yakoute, il a été suspecté un rôle du stress thermique et du régime alimentaire sur ces mêmes compositions isotopiques. Pour les populations archéologiques, il sera impossible d'évaluer l'impact du stress thermique étant donné que tous les échantillons viennent de France.

14.2 Enregistrement de la dérive isotopique au cours du temps

14.2.1 Relation entre $\delta^{65}\text{Cu}$, $\delta^{66}\text{Zn}$ de l'os, et âge au décès

Nous disposons de deux groupes d'ossements. La population de Saint-Laurent de Grenoble, pour laquelle le sexe des individus a été estimé par deux méthodes morphométriques [Lovejoy *et al.*, 1985b, Schmitt, 2002], et les crânes du CCEC, dont l'âge au décès et le sexe de leur propriétaire est connu avec certitude (Annexe C).

14.2.1.1 Cas des ossements de la population de Saint-Laurent de Grenoble

Les estimations morphométriques appliquées aux squelettes du XVII^{ème} et XVIII^{ème} siècle de Saint-Laurent de Grenoble donnent des gammes d'âges très larges et parfois contradictoires selon la méthode (voir l'annexe B). C'est pourquoi nous avons classé les individus en trois groupes : jeunes, matures et âgés. Nous n'avons alors noté aucune différence significative entre les groupes pour les $\delta^{66}\text{Zn}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ des ossements. Cependant, les jeunes hommes étaient caractérisés, en moyenne, par des $\delta^{56}\text{Fe}$ plus négatifs (Tableau 10.4). Sachant qu'il ne semble pas y avoir de rétention préférentielle de ^{56}Fe au cours du temps [Walczyk et von Blanckenburg, 2002, Balter en préparation], cette différence est interprétée comme étant le résultat de la combinaison d'un biais d'échantillonnage et de la largeur des gammes d'âges proposées. Cette explication tient aussi pour l'absence de corrélation entre $\delta^{65}\text{Cu}$, $\delta^{66}\text{Zn}$ et âge. Nous ne nous risquons pas non plus à des interprétations sur l'effet de la ménopause : parmi les phalanges analysées, une seule appartient à une femme décédée après ses 50 ans.

14.2.1.2 Cas des crânes du CCEC

Pour rappel, les crânes du CCEC proviennent d'individus décédés dans les Hospices Civils de Lyon dans la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle. On dispose pour chacun d'entre eux de l'âge exact au décès. La figure 14.2.1 présente la relation entre cet âge, le $\delta^{65}\text{Cu}$ et le $\delta^{66}\text{Zn}$ pour chaque sexe. On s'aperçoit qu'il se pourrait qu'une légère corrélation existe entre âge et $\delta^{66}\text{Zn}$ des os crâniens. Cependant cette relation n'est pas significative, que ce soit pour les hommes ou pour les femmes. Etant donné la faiblesse du coefficient de corrélation mis en évidence entre le $\delta^{66}\text{Zn}$ et l'âge dans le sang des Yakoutes, il est possible qu'un échantillonnage plus important permettrait de mettre en évidence une telle relation. Pour le cuivre, aucune tendance ne se dessine pour les hommes, dont les valeurs isotopiques apparaissent très dispersées. Peut-être est-ce là le résultat d'un échantillonnage aléatoire entre l'os spongieux et l'os cortical.

Encore une fois, parmi les échantillons de crânes, un seul provient d'une femme âgée de plus de 50 ans. Nous ne pouvons donc pas conclure sur l'effet de la ménopause.

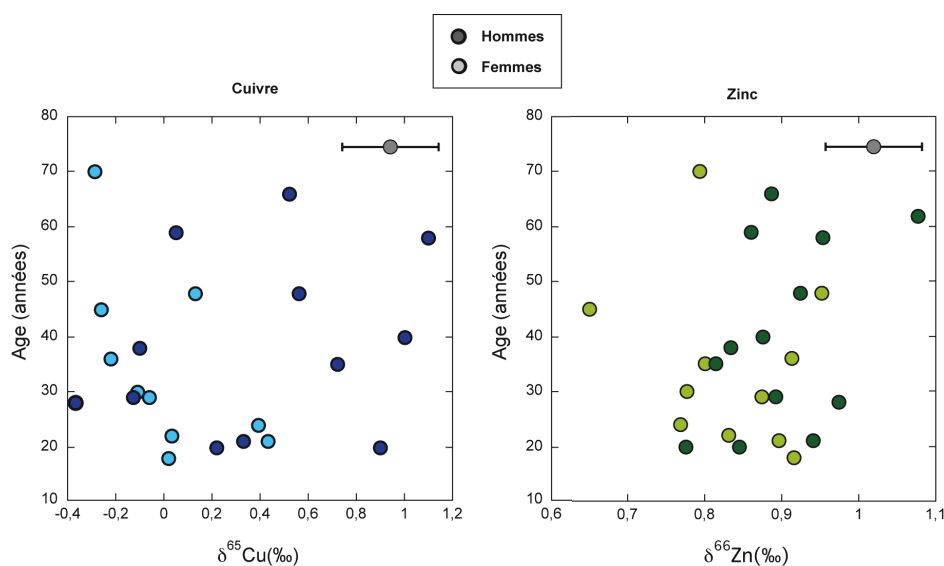


FIGURE 14.2.1: $\delta^{66}\text{Zn}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ des os crâniens du CCEC en fonction de l'âge au décès.

14.2.1.3 Conclusion

L'étude de la relation entre la composition isotopique en cuivre et zinc des ossements d'une part, et de l'âge au décès d'autre part, n'a révélé aucun résultat exploitable. Dans le cas de la population de Saint-Laurent de Grenoble, l'estimation de l'âge au décès était trop imprécise ; dans le cas des crânes du CCEC, il semble que le faible échantillonnage et le choix du type d'os biaisent les observations. L'absence de dérive isotopique en cuivre et en zinc est néanmoins tout à fait plausible étant donné qu'elle est également absente dans le sang des Européens. Il serait toutefois intéressant de tester la relation entre $\delta^{65}\text{Cu}$, $\delta^{66}\text{Zn}$ et âge au décès à partir d'une collection de plus de 50 squelettes pour lesquels l'âge au décès des individus serait connu avec précision et la partie corticale des os facilement prélevable.

14.2.2 Décalage isotopique entre l'émail et les os : un effet du vieillissement ?

Rappelons que la formation de l'émail dentaire des troisièmes molaires se déroule en moyenne entre 9 et 14 ans et qu'il n'est pas remanié après sa formation. L'os, au contraire, est renouvelé tous les dix ans. On peut ainsi espérer détecter un décalage isotopique entre la composition de l'émail dentaire et les ossements de mêmes individus en raison de l'accumulation de l'organisme en cuivre léger et zinc lourd au cours du temps. Au vu de ce qui a été démontré dans le chapitre 10, il convient de comparer la signature isotopique de l'émail dentaire à celle de l'os cortical. Par conséquent, nous nous sommes intéressés aux résultats obtenus pour la population de Saint-Laurent de

Grenoble.

14.2.2.1 Résultats

L'émail dentaire et les ossements possèdent la même gamme de $\delta^{56}\text{Fe}$ mais des gammes distinctes de $\delta^{66}\text{Zn}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ (Figure 14.2.1, tableau 14.1). Les ossements apparaissent enrichis en isotopes lourds du zinc et légers du cuivre comparés à l'émail.

Statistiques descriptives	$\delta^{56}\text{Fe}$			$\delta^{65}\text{Cu}$			$\delta^{66}\text{Zn}$		
	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n	\bar{M}	SD	n
Email dentaire	-0.30	0.64	20	0.27	0.21	20	0.66	0.17	20
Os cortical	-0.34	0.42	43	-0.14	0.11	31	0.79	0.12	31
Résultats des T test	t	p		t	p		t	p	
t	0.27	0.79		-7.13	7.10-6		3.77	0.002	

TABLE 14.1: Statistiques descriptives pour le $\delta^{65}\text{Cu}$, $\delta^{66}\text{Zn}$ et $\delta^{56}\text{Fe}$ de l'émail dentaire et de l'os cortical des individus de Saint-Laurent et résultats des t-tests réalisés pour les rapports isotopiques de ces deux matériaux. \bar{M} = moyenne, SD= écart-type, n= nombre d'échantillons, t= valeur t, p= valeur p

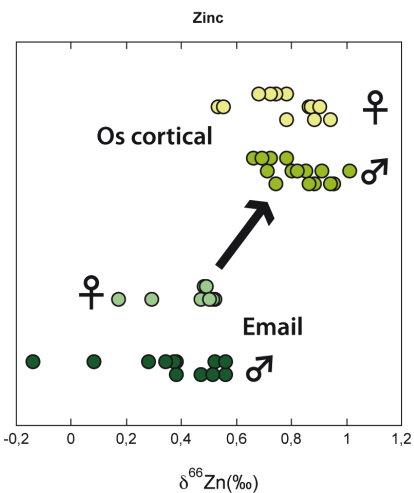
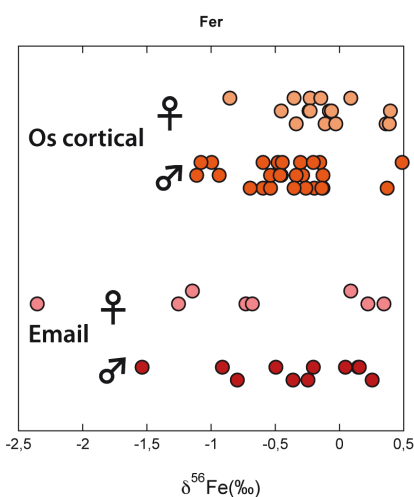
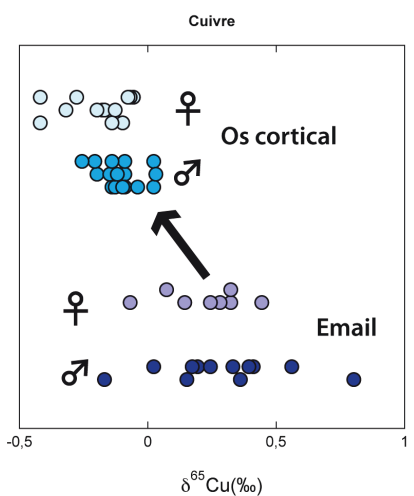
D'un point de vue individuel le fractionnement entre l'émail dentaire et l'os cortical est en moyenne de 0.13 ‰ pour le zinc et -0.43 ‰ pour le cuivre. Pris par groupe d'âge, on n'observe pas de tendance particulière liée à l'âge des individus (Figure 14.2.3).

14.2.2.2 Discussion

Les ossements sont constitués à 70 % de bioapatite mais contiennent également de la matière organique, notamment du collagène. Les métaux de transition sont en majeure partie contenus dans la bioapatite. Il n'y a donc pas de raison d'observer une différence entre les rapports isotopiques de l'émail dentaire et des os corticaux car le mécanisme de fractionnement est théoriquement le même lors de la formation de la bioapatite. Par conséquent, on peut estimer que le décalage isotopique entre ossements et émail dentaire de la population de Saint-Laurent va dans le sens d'une accumulation de ^{66}Zn et de ^{63}Cu au cours de la vie, tel que nous l'avons démontré dans le sang des Yakoutes et conformément aux prédictions de Balter *et al.* (2010 ; en préparation) (Figure 14.2.2).

Pourtant, lorsqu'on s'intéresse à l'écart entre le $\delta^{66}\text{Zn}$ et le $\delta^{65}\text{Cu}$ de l'émail et de l'os pour chaque individu, il ne diffère pas entre les individus jeunes et les plus âgés (Figure 14.2.3). On devrait en effet observer un plus grand décalage pour les individus âgés qui ont théoriquement eu plus de temps pour accumuler le ^{66}Zn et ^{65}Cu . On notera encore une fois que cette tendance était absente dans les érythrocytes de la population française. Nous l'avons interprété comme un effet lié soit au turnover plus faible de ces métaux dans le corps humain comparé à celui des Yakoutes, soit à la diversité du régime alimentaire. Enfin, rappelons que nous avons ici à faire à une population d'un

Saint-Laurent de Grenoble



Yakoutes

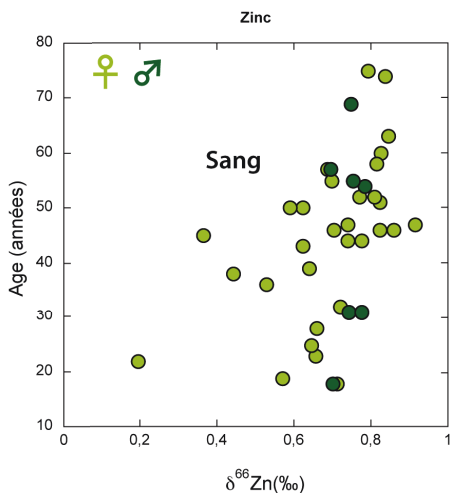
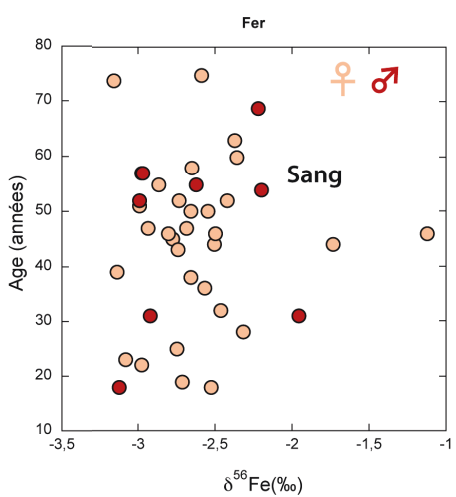
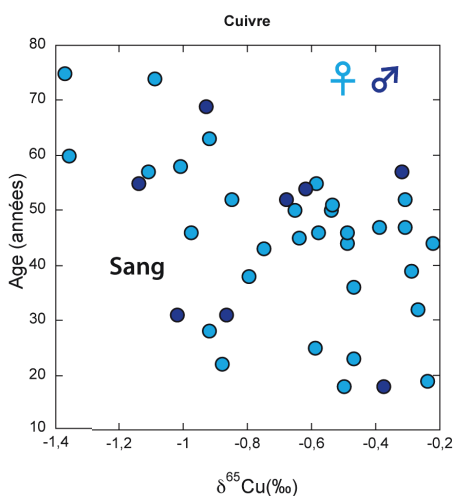


FIGURE 14.2.2: $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$, $\delta^{66}\text{Zn}$ de l'émail dentaire et de l'os cortical de la population archéologique de Saint-Laurent de Grenoble (à gauche) et du sang de Yakoutes actuels (à droite).

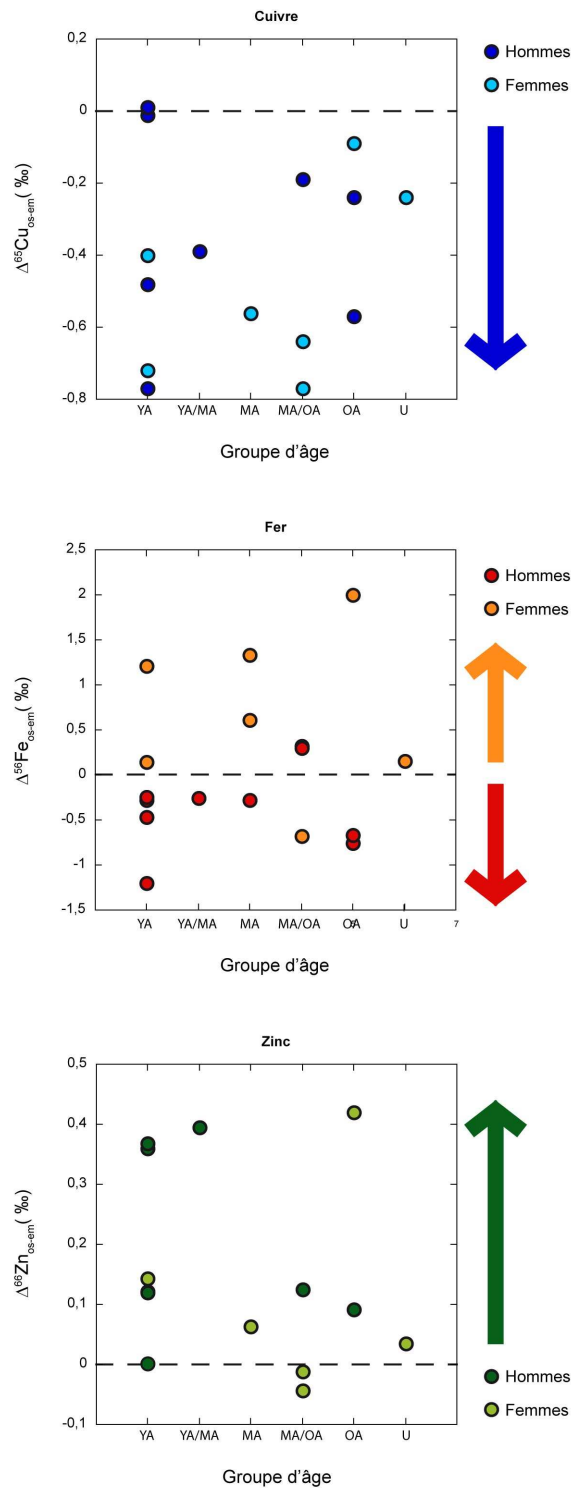


FIGURE 14.2.3: Décalage isotopique pour le cuivre, le fer et le zinc entre l'émail dentaire et l'os cortical par groupe d'âge pour les individus de Saint-Laurent de Grenoble. YA : jeunes adultes, YA/MA individus soit jeunes, soit matures, MA adultes matures, MA/OA : individus matures ou âgés, OA : individus âgés. U : adulte d'âge inconnu.

quartier populaire de Grenoble du XVII et XVIII^{ème} siècle. L'espérance de vie était donc plus faible qu'actuellement. Ainsi, le groupe des individus âgés rassemble les individus décédés après l'âge de 45 ans. Il est également probable que la puberté, et donc l'accélération de la croissance, débutait plus tard. Cette hypothèse est appuyée par les observations de Herrscher (2005, Figure 14.2.4). En effet, les adolescents de 10 à 14 ans de la population de Saint-Laurent de Grenoble connaissent, à l'époque moderne (XVII-XVIII^{ème}) un ralentissement de croissance par rapport aux jeunes du Moyen-Age. Leur courbe de croissance est proche de celle des individus de Spitafield (Angleterre, XVIII-XIX^{ème}) qui souffraient de malnutrition. Le développement dentaire est moins sensible à ces conditions environnementales [Cardoso, 2005]. Par conséquent, l'émail dentaire des molaires enregistre la signature isotopique du corps humain avant l'accélération du turnover des métaux à l'adolescence. Après l'adolescence, le métabolisme de base diminue [Henry *et al.*, 1999, Henry, 2005]. Pour la plupart des populations, il ne cessera de décroître au cours de la vie [Cunningham, 1980, Henry *et al.*, 2000]. Les $\delta^{66}\text{Zn}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ des os seront donc à peu près les mêmes pour tous les individus âgés de plus de 18 ans.

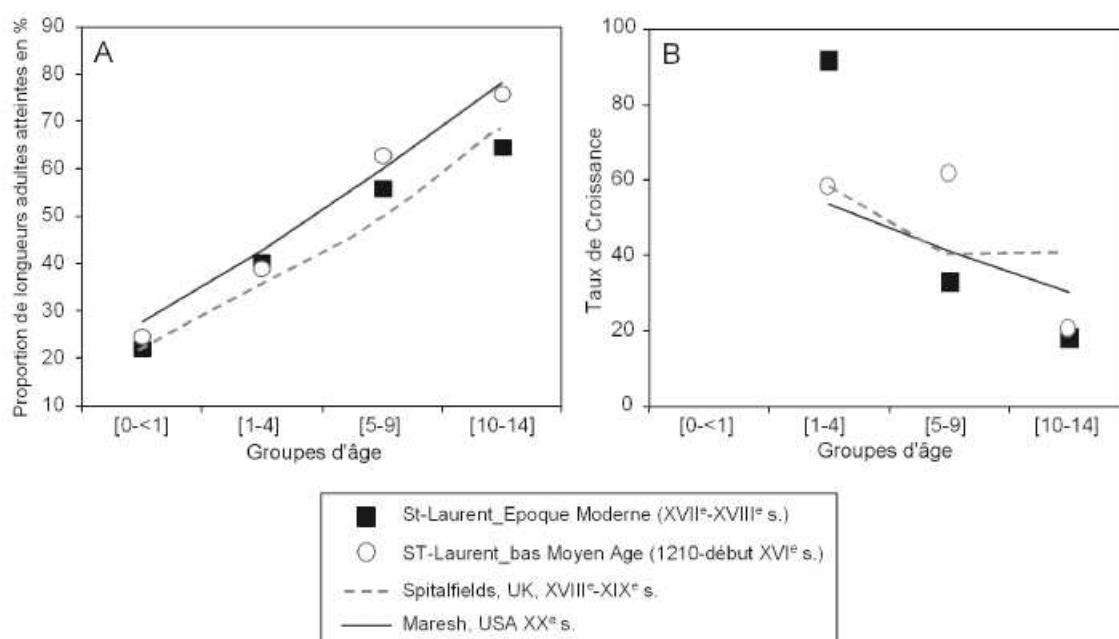


FIGURE 14.2.4: Analyse comparée de la croissance en longueur des humérus des sujets immatures modernes de Saint-Laurent. A. Proportions de longueurs adultes atteintes en fonction de l'âge. B. Taux de croissance en fonction de l'âge. Figure : Herrscher, 2005.

Si la gamme de $\delta^{56}\text{Fe}$ est identique entre l'émail dentaire et l'os cortical, il existe un fractionnement entre les deux biominéraux à l'échelle individuelle. On constate en effet une tendance générale à un enrichissement en isotopes lourds dans les os des femmes par

rapport à l'émail dentaire et la tendance inverse pour les os des hommes. Pour les femmes, l'enrichissement en ^{56}Fe semble logique : dans le chapitre 11, nous avons montré que la différence entre les deux sexes était absente dans l'émail dentaire. Le décalage isotopique en $\delta^{56}\text{Fe}$ dans le corps des femmes se déroule après la formation de l'émail dentaire de ces dents. Les valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ des os correspondent simplement aux valeurs des femmes menstruées alors que l'émail dentaire enregistre les abondances naturelles du corps des filles prépubères. Cette tendance ne semble cependant pas s'accroître au cours du temps, ce à quoi on pourrait s'attendre si les menstruations étaient à l'origine de la différence isotopique homme/femme. Ce constat est contre-intuitif mais appuyé par les observations dans le sang [Walczyk et Von Blanckenburg, 2002, Walczyk et von Blanckenburg, 2005, Albarède *et al.*, 2011, Jaouen *et al.*, a, Jaouen et Balter,]. Le fractionnement entre l'émail dentaire et les ossements des hommes pour le $\delta^{56}\text{Fe}$ est, lui, moins intuitif. Cette fois-ci, le fractionnement va dans le sens d'un enrichissement en fer léger au cours de la vie. Il ne semble pas exister de rétention préférentielle de cet isotope dans le corps animal [Balter, en préparation]. Cependant, il existe un enrichissement en ^{56}Fe dans la chaîne trophique, car il est préférentiellement absorbé par l'organisme [Walczyk et Von Blanckenburg, 2002, Krayenbuehl *et al.*, 2005, Walczyk et von Blanckenburg, 2005, Jaouen *et al.*, b]. Comme il a été montré l'absence de corrélation entre le régime alimentaire et la composition isotopique en $\delta^{56}\text{Fe}$, le rôle direct d'une plus grande consommation de viande dans l'appauvrissement en ^{56}Fe des os est exclu. Par contre, une plus faible absorption intestinale du fer à l'âge adulte de ces individus par comparaison avec celle de l'enfance pourrait expliquer cette tendance.

14.2.2.3 Conclusion

Les données obtenues sur l'émail dentaire de la population de Saint-Laurent de Grenoble confirment une rétention préférentielle des organismes animaux pour le cuivre léger et le zinc lourd. Selon nos conclusions, ces observations devraient pouvoir être généralisées à toutes les populations dont la ménarche arrive en moyenne après 13 ans, âge moyen auquel l'amélogénèse des troisièmes molaires prend fin.

Ces résultats sont difficilement comparables aux analyses réalisées sur les crânes du CCEC en raison de la présence d'os spongieux dans les os crâniens. Nous avons vu en effet que la présence de restes organiques affectait la composition isotopique de ces os pour le $\delta^{56}\text{Fe}$. On observera néanmoins des valeurs significativement plus faibles pour le ^{66}Zn des os que pour l'émail dentaire ($T=4,93$, $p<5.10^{-5}$), tel que ce qui a été observé sur les squelettes de Saint-Laurent de Grenoble.

Comme pour le sang de la population lyonnaise, on n'observe pas de différence isotopique entre les groupes d'âges dans les ossements. A nouveau, on peut invoquer l'insuffisance de la vitesse du métabolisme des Européens pour accumuler le ^{63}Cu et le ^{66}Zn . Il se peut aussi que le signal isotopique soit brouillé par le régime alimentaire. Par conséquent, le but de la prochaine partie est de déterminer l'influence de ce dernier paramètre.

14.3 Bilan de l'enregistrement fossile de la variabilité isotopique pour les métaux de transitions.

Les résultats obtenus sur la population de Saint-Laurent confirment l'importance du métabolisme de base dans l'accumulation isotopique en isotopes légers du cuivre et lourds du zinc au cours de la vie. Malheureusement, l'échantillonnage archéologique réuni au cours de ce travail de thèse ne permet pas de tester l'influence du stress thermique, de la ménarche et de la ménopause sur la composition isotopique des os. Cependant, tout semble aller dans le sens de l'enregistrement fossile de la composition isotopique du corps humain au moment de la mort. En l'absence de diagénèse, on peut donc raisonnablement espérer observer les mêmes tendances que celles du vivant.

Chapitre 15

Variations interspécifiques et métabolisme de base : données préliminaires

Les isotopes du fer, du cuivre et du zinc apportent potentiellement des informations sur le sexe, l'âge au décès, l'âge du début et arrêt des menstruations et le turnover métabolique des métaux. Ce type d'information manque cruellement aux paléoanthropologues travaillant sur les hominidés, que ce soit pour les reconstitutions paléodémographiques ou pour évaluer la validité de l'hypothèse de la grand mère (*grandmotherhood hypothesis*). Les isotopes du cuivre, zinc et fer sont une source potentielle d'informations sur l'ensemble de ces paramètres. Dès lors, il est primordial d'évaluer si les observations réalisées sur l'Homme sont applicables aux hominidés, aux hominoïdes voire à l'ensemble des singes de l'Ancien Monde.

Par conséquent, nous avons contacté les vétérinaires des parcs animaliers français afin d'obtenir du sang de grands singes. Le sang obtenu a été prélevé lors d'actes médicaux afin de ne pas faire subir à l'animal une anesthésie supplémentaire. En raison du faible nombre de grands singes en France et la rareté des actes médicaux nécessitant une anesthésie, seuls six échantillons de sang total ont été obtenus. Leur espèce, âge, sexe et provenance sont précisés tableau 2.2. Nous présentons ici les résultats préliminaires les concernant.

Nous avons également cherché à quantifier le métabolisme de chacune des espèces. En effet, on sait que pour d'autres systèmes isotopiques, tel que l'oxygène, il existe un lien entre le métabolisme propre à une espèce et le fractionnement observé entre la composition isotopique de ce qu'un individu consomme et la composition du corps de celui-ci [Longinelli, 1984, Luz *et al.*, 1984]. D'autre part, nous avons démontré que le métabolisme de base influait sur le $\delta^{65}\text{Cu}$ et le $\delta^{66}\text{Zn}$ du sang humain. Les animaux présentant un fort métabolisme de base devraient par conséquent avoir des signatures isotopiques caractérisées par valeurs très négatives de $\delta^{65}\text{Cu}$ ($\sim 1\%$) et élevées du $\delta^{66}\text{Zn}$.

15.1 Résultats préliminaires

15.1.1 Estimation de la BMR.

Afin de pouvoir comparer les espèces entre elles, nous avons calculé le métabolisme de base pour des individus de masse identique (60 kg).

Pour le chimpanzé et les humains (Européens et habitants des zones circumpolaires), nous avons utilisé les équations et données de Froehle et Schoeninger (2006)¹. Le métabolisme de base d'un gorille de 60 kg a été établi à partir de l'équation de Kleiber *et al.* (1947)². Pour l'orang-outan, aucune équation n'est disponible dans la littérature. En effet, Pontzer *et al.* ont montré en 2010 que cette espèce présentait un métabolisme anormalement bas au regard de sa masse. Les équations classiques de Kleiber surestiment leur métabolisme de base d'environ 40 %. A partir des données de ces auteurs sur 4 orang outans, nous avons établi une équation préliminaire donnant la BMR en fonction de la masse³. Notre estimation est donnée tableau 18.1 avec celle des autres espèces. La femelle chimpanzé dont le sang a été analysé a mis bas un mois avant le prélèvement. La gestation comme la lactation accroissent les besoins nutritifs des mères. Nous avons donc ajouté une estimation du métabolisme de base d'un chimpanzé en fin de gestation, en nous basant sur l'augmentation du métabolisme de base chez la femme⁴ [Lof *et al.*, 2005].

Espèce	Conditions particulières	BMR (kcal/j)
Gorilla gorilla		1509
Homo sapiens		1467±228
Homo sapiens	Circumpolaire	1540±211
Pan troglodytes		1699 ±173
Pan troglodytes	Grossesse	2246±369
Pongo pygmeus		948 ±129

TABLE 15.1: Estimation de la BMR pour des individus de 60 kg de quatre espèces différents. Voir le texte pour la méthode de détermination.

15.1.2 Données isotopiques

Les données isotopiques obtenues sur le sang de grands singes sont données dans l'annexe C et présentées figure 14.2.2. A titre de comparaison, les données isotopiques

1. $BMR_{chimpanzee}(kcal/d)=25.45*M(kg)+172$
2. $BMR_{gorilla}(kcal/d)=70.03*M(kg)^{0.75}$
3. $BMR_{orangutan}(kcal/d)=3.1557*M(kg)+759.36$
4. Augmentation de 32 %

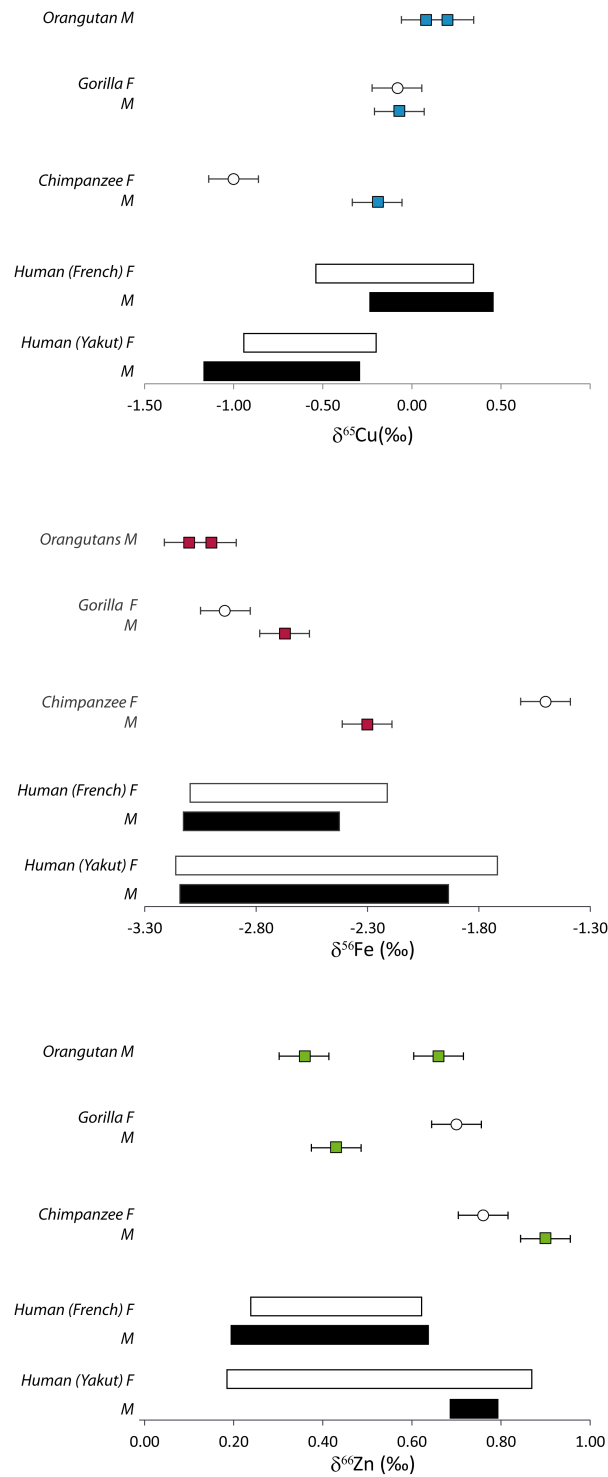


FIGURE 15.1.1: $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$, $\delta^{66}\text{Zn}$ dans le sang d'humains, Yakoutes et Français et de Grands Singes. M : mâles/hommes F : femelles/femmes. Les données pour les Français sont issues d'Albarède *et al.*, 2011. Elles sont également disponibles Annexe A.

obtenues dans le sang de la population française [Albarède *et al.*, 2011] et yakoute sont représentées sur ses mêmes figures.

Les valeurs de $\delta^{65}\text{Cu}$ des grands singes se superposent aux données obtenues dans le sang de la population française, sauf pour la femelle chimpanzé. La composition isotopique de cette femme entre en effet dans la gamme de variation des femmes ménopausées et des hommes yakoutes. Elle se distingue également par le $\delta^{56}\text{Fe}$ de son sang, qui sort cette fois de la gamme humaine. La composition isotopique en fer du mâle chimpanzé se distingue de celles des Français de sexe masculin alors que les orang outans mâles montrent des valeurs très « masculines ». Les gorilles, mâle et femelle, sont compris dans la zone de recouvrement isotopique en fer des humains hommes et femmes. Pour les isotopes du zinc, c'est le mâle chimpanzé qui se distingue par la composition isotopique de son sang : le $\delta^{66}\text{Zn}$ de celui-ci est plus élevé que les valeurs mesurées dans le sang humain. À l'inverse, les autres singes ne se distinguent pas de la variabilité humaine.

Les données préliminaires esquissent également une légère corrélation entre les compositions isotopiques en métaux (Figure 15.1.2). Les chimpanzés possèdent un sang riche en fer et zinc lourds et cuivre léger et le constat inverse peut être dressé pour les orang-outans.

15.1.3 Corrélation avec les paramètres biologiques

Il n'existe pas de corrélation entre la composition isotopique en métaux du sang des grands singes et leur âge. On note par contre une excellente corrélation entre le $\delta^{56}\text{Fe}$ et le métabolisme de base d'individus de 60 kg. Une légère corrélation est également notée pour le cuivre ($R^2=0.50$, $p<0.01$)

15.2 Discussion

15.2.1 Impact du régime alimentaire

Le chimpanzé, le gorille et l'orang-outan sont essentiellement végétariens, alors que l'Homme est majoritairement omnivore. Or, ce dernier ne se distingue pas isotopiquement des trois autres genres. Cette observation va dans le sens d'un faible impact du régime alimentaire sur le $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$.

15.2.2 Impact de la gestation

La femelle chimpanzé a mis bas un mois avant le prélèvement. Son métabolisme de base a été fortement accru pendant la gestation. Les réserves de foie ont été mobilisées, provoquant des réactions redox du fer et du cuivre lors du passage de la ferritine à la transferrine. Cette forte sollicitation du foie est donc susceptible d'avoir enrichi le sang en isotopes lourds du fer et en légers du cuivre [Albarède *et al.*, 2011, Jaouen *et al.*, 2011,

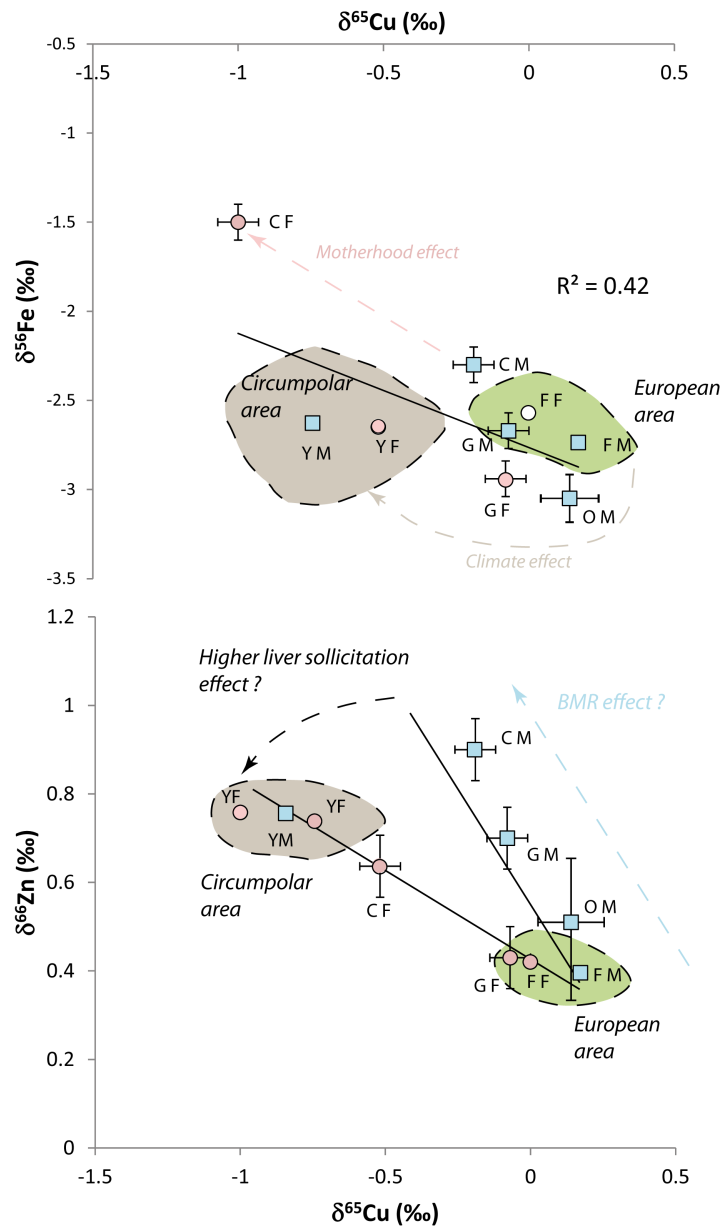


FIGURE 15.1.2: $\delta^{65}\text{Cu}$ vs $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ vs $\delta^{66}\text{Zn}$ pour le sang d'espèces hominoïdes. C : Chimpanzé F : Humain vivant en France, G : gorille, O : orang-outan, Y : Humain vivant en république de Sakha (ex-Yakoutie). La zone nommée « European area » correspond à l'espace occupé par la moyenne des valeurs obtenues dans le sang de Français à un écart-type près. La zone « Circumpolar area » repose sur le même principe à partir des données obtenues chez les Yakoutes.

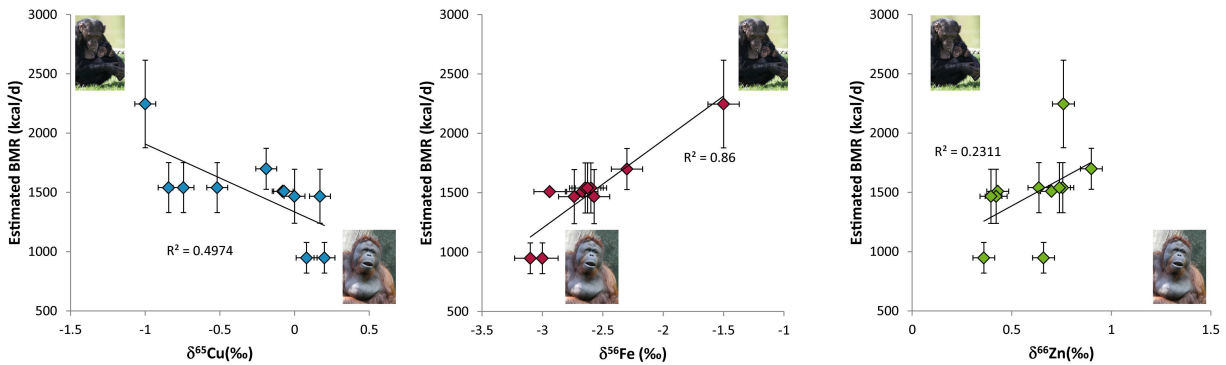


FIGURE 15.1.3: Corrélation entre composition isotopique du fer, cuivre, zinc du sang d'hominoïdes et le métabolisme moyen d'un individu de 60 kg de leur espèce. Les estimations de métabolisme de base sont données tableau 18.1.

Hotz *et al.*, 2012] Figure 15.1.2). L'allaitement faisant suite à la mise à bas nécessite également de puiser dans les réserves de fer de la femelle. Cette hypothèse requiert de nouvelles analyses sur d'autres femmes ou femelles enceintes afin d'être confirmée.

15.2.3 BMR et métaux de transitions

Isotopiquement, les orangs-outans et les gorilles ne sont pas distinguables des êtres humains vivant en Europe. Les chimpanzés se distinguent au contraire par leur $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$ qui tombent dans la gamme observée chez les humains vivants dans les zones circumpolaires. Dès lors, on peut suspecter l'influence du métabolisme de base.

A poids égal, les chimpanzés sont bien les animaux présentant le métabolisme de base le plus élevé (Tableau 18.1). Par contre, les orangs-outans dont la BMR est très faible, ne montrent pas de valeurs de $\delta^{65}\text{Cu}$ particulièrement élevées ou de $\delta^{66}\text{Zn}$ véritablement faibles. La BMR semble donc essentiellement influencer le $\delta^{56}\text{Fe}$ à l'échelle interspécifique. Cependant, elle affecte vraisemblablement le $\delta^{66}\text{Zn}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ à l'échelle intraspécifique. On explique de cette manière la signature isotopique du sang des Yakoutes. On remarque également que la femelle chimpanzé qui vient de mettre bas possède un sang riche en isotopes légers du cuivre et lourds du zinc, alors que le $\delta^{65}\text{Cu}$ du sang du mâle correspond à celui des autres espèces. (Figure 15.1.2).

15.3 Premières conclusions

Les données préliminaires obtenues chez les Grands Singes ouvrent des perspectives sur la compréhension de leur métabolisme. Elles semblent à priori influencées par la gestation et le métabolisme de base propre à chaque espèce mais semble indépendante

du régime alimentaire. Ce travail requiert des analyses complémentaires afin de confirmer ces hypothèses.

Chapitre 16

Isotopie et alimentation

Introduction

Les chapitres précédents nous ont amenés à mettre en cause l'alimentation dans la particularité isotopique du sang des Yakoutes. On ignore l'impact du niveau trophique sur la composition isotopique sur les $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$ du corps humain ainsi que celui de la nature du sol ou encore le rôle de la proportion de végétaux et de viande dans l'alimentation. Ce chapitre vise par conséquent à discuter de ces trois aspects.

16.1 Influence du niveau trophique sur les $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$ corporels.

16.1.1 Introduction

Il n'est pas tout à fait exact d'affirmer qu'on ignore tout du fractionnement isotopique au sein d'un réseau trophique. Walczyk et von Blanckenburg ont réalisé en 2002 un certain nombre de mesures de $\delta^{56}\text{Fe}$ sur les plantes, des muscles d'herbivores et d'animaux marins permettant de suspecter un enrichissement en $\delta^{56}\text{Fe}$ de la base au sommet d'une chaîne trophique. D'autre part Weiss *et al.*, 2005, Weinstein *et al.* 2011 et Moynier *et al.*, 2009 ont démontré un fractionnement sol/plantes lors de l'absorption de cuivre et de zinc.

Récemment, Balter *et al.* [en préparation], ont cherché à mettre en évidence le fractionnement isotopique entre organes chez la souris et le mouton. Cet article, dont je suis co-auteur, est intitulé « *Isotopic mapping of iron, copper and zinc in mice and sheep* » et va prochainement être soumis à la revue *Journal of Analytical and Atomic Spectrometry*. L'analyse des muscles, des os et du régime alimentaire de ces deux espèces animales ont permis d'évaluer les fractionnements isotopiques se déroulant au cours de l'alimentation.

Pour le zinc, les valeurs de $\delta^{66}\text{Zn}$ sont similaires entre os et muscles, que ce soit pour le

mouton ou la souris. Dès lors, on peut prédire un enrichissement en ^{66}Zn dans la chaîne trophique. On observe un enrichissement en ^{66}Zn par rapport au régime alimentaire de l'ordre de 0.2 à 0.3 ‰. Pour le cuivre, il n'existe pas de fractionnement isotopique entre l'os et la plante, mais les muscles sont appauvris en ^{65}Cu par rapport à ces deux matériaux. On peut donc soupçonner que les rapports isotopiques mesurés dans les muscles des carnivores seront appauvris en ^{65}Cu par rapport aux tissus des herbivores. En revanche, les carnivores présenteront des valeurs osseuses similaires aux muscles de leurs proies. Enfin, l'enrichissement isotopique en ^{56}Fe au cours de l'alimentation prédit par Walczyk et von Blanckenburg en 2002 est confirmé par les données expérimentales sur la souris et le mouton ainsi que par celle de Hotz *et al.*, 2011. Cette dernière étude présente l'avantage de porter sur un analogue métabolique de l'Homme, le cochon nain. L'ensemble de ces données permet par conséquent de prédire un enrichissement en ^{63}Cu , ^{66}Zn et ^{56}Fe au cours de la chaîne trophique selon le schéma exposé en figure 16.1.1 (troisième colonne). Elle ne permet pas, par contre, d'évaluer l'impact de la composition isotopique du sol sur celle de l'ensemble de la chaîne trophique.

Dans un projet annexe de ma thèse, Vincent Balter, Marie-Laure Pons et moi-même avons cherché à tester ces prédictions par l'analyse de plantes et d'ossements de carnivores et herbivores provenant de deux réseaux trophiques distincts. Le fait d'utiliser du matériel provenant de deux différentes régions nous a également permis d'appréhender le rôle de la géologie du sol sur les compositions isotopiques. Ce travail, intitulé « *Iron, copper and zinc isotopic fractionation up mammal trophic chains* » a été soumis en juin 2012 à la revue *Earth and Planetary Science Letters*. L'article est joint en annexe (Annexe A). Les échantillons proviennent de la région de Western Cape et du parc national du Kruger en Afrique du Sud. Les fractionnements observés entre plantes-herbivores et herbivores-carnivores sont cohérents entre les deux sites et permettent d'aboutir à un schéma d'enrichissement en cuivre léger, fer léger et zinc lourd au cours de la chaîne trophique (Figure 16.1.1, panneaux 1 et 2). Si on compare ce schéma à celui proposé par Balter *et al.* (en préparation), on se heurte à certaines contradictions. Pour le cuivre, par exemple, les carnivores présentent un enrichissement en ^{65}Cu comparés aux herbivores et aux plantes, que nous n'avons pu expliquer. Par contre, les résultats obtenus pour le fer confirment les prédictions de Balter *et al.* [2010, en préparation] et Hotz *et al.* (2011). Pour le zinc, il n'existe pas de différences isotopiques entre les carnivores et les herbivores (Figure 16.1.2). Ce dernier élément peut s'expliquer par la présence de substances inhibitrices de l'absorption de zinc dans les produits végétaux, tels que les phytates [Lönnerdal, 2000]. La liaison partielle entre le zinc alimentaire et les phytates au sein du lumen est susceptible d'engendrer un fractionnement isotopique au cours de la digestion. Ces phytates sont absents de l'alimentation des carnivores, ce qui peut expliquer une absorption quantitative du zinc.

Ces résultats et interprétations préliminaires demandent à être confirmés par des études ultérieures. Toutefois, elles nous permettent d'ores et déjà d'affirmer l'existence de fractionnement isotopique au sein des réseaux trophiques.

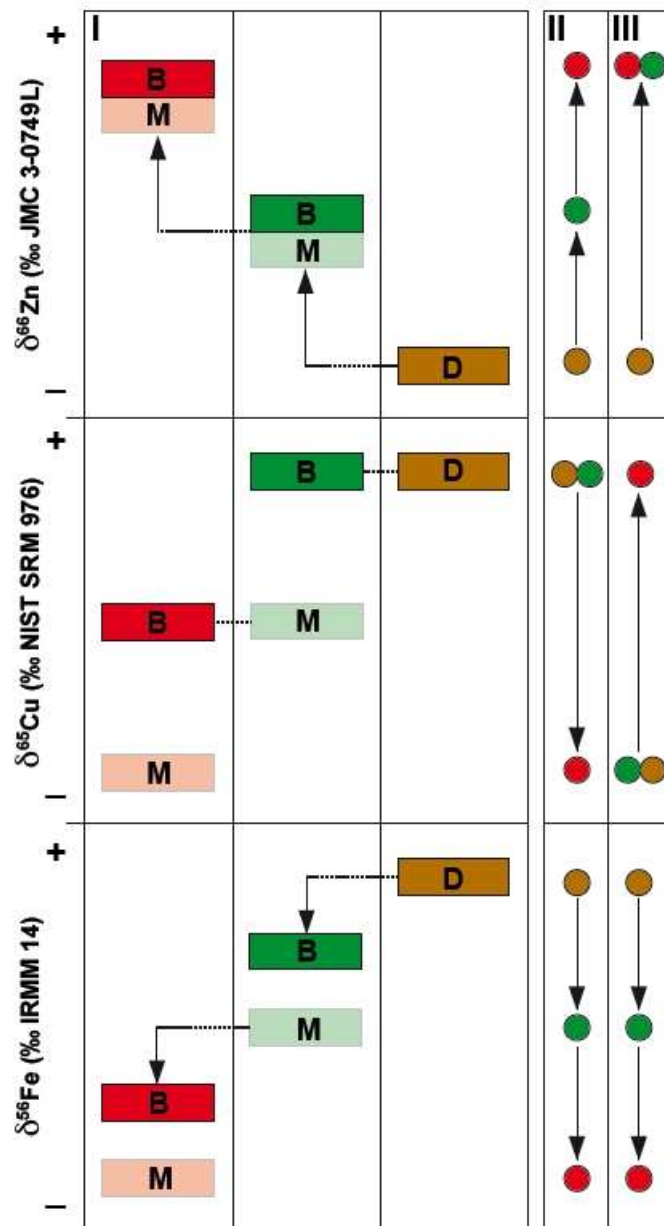


FIGURE 16.1.1: Panneau I : Distribution schématique des valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$ dans les animaux (moutons et souris, Balter *et al.*, 2010, Balter *et al.*, submitted), entre le régime alimentaire (D), les muscles (M) et les os (B). Les muscles des herbivores sont considérés comme la source du régime alimentaire des carnivores. Panneau II : Fractionnement isotopique attendu entre les différents niveaux trophiques d'après la distribution isotopique dans les organismes vivants. Panneau III : Fractionnements isotopiques observés.

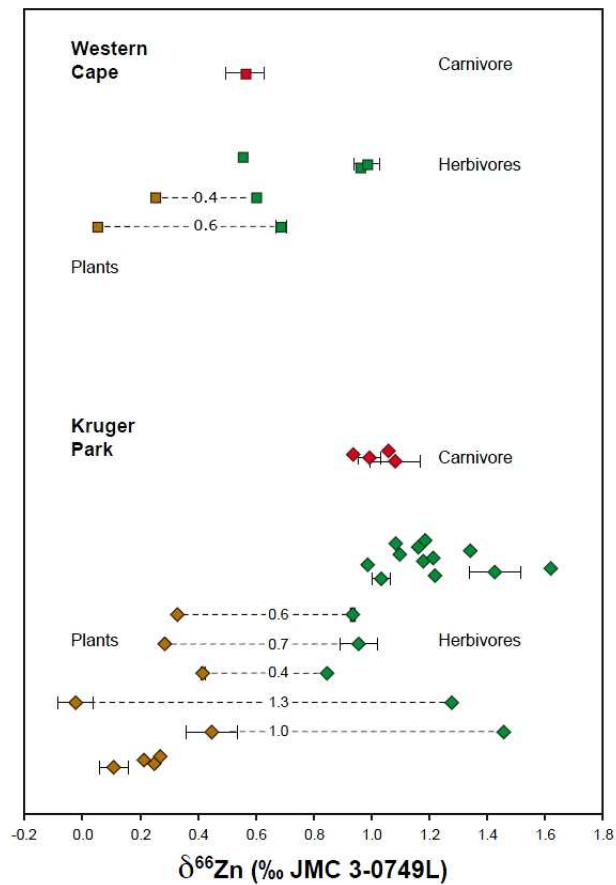


FIGURE 16.1.2: $\delta^{66}\text{Zn}$ des ossements de carnivores et d'herbivores et de plantes de Western Cap et du parc du Kruger. Les barres d'erreur correspondent au double de l'écartype des répliqués.

16.2 Isotopie et lieu de vie

S'il existe un fractionnement isotopique pour le cuivre, fer et zinc de la plante au sommet de la chaîne trophique, nous ignorons encore l'influence de la composition isotopique du sol sur l'ensemble de ce réseau. Cette question est essentielle car elle pourrait potentiellement être à l'origine de la différence isotopique en cuivre et zinc existant entre les Yakoutes et les Européens.

16.2.1 Apport de l'étude des réseaux trophiques d'Afrique du sud

L'étude portant sur le Western Cape et le parc national du Kruger (Annexe A2) apporte des éléments de réponses. Les deux sites possèdent en effet un contexte géologique très différent. Le substrat du Western Cape est caractérisé par des roches sédimentaires de l'ère primaire alors que le Kruger Park est principalement composé de granites et de roches volcaniques de la séquence du Karoo [Shone et Booth, 2005, Schutte, 2008]. Si les sols n'ont pas été analysés dans cette étude, on sait que le $\delta^{66}\text{Zn}$ des roches ignées et des roches sédimentaires est respectivement de l'ordre de 0.2-0.3 ‰ et 0 ‰ [Albarède, 2004]. Or, les $\delta^{66}\text{Zn}$ des os des animaux du Western Cape diffèrent significativement de ceux du Kruger Park. De plus, l'ordre de grandeur entre les deux sites est comparable à celui prédit par la géologie. Pour le cuivre, par contre, les roches ont théoriquement la même composition isotopique alors que les $\delta^{65}\text{Cu}$ des os diffèrent entre les deux sites. Des facteurs climatiques peuvent alors entrer en jeu. Par exemple, on sait que le lessivage des sols influe sur leur $\delta^{66}\text{Zn}$, $\delta^{56}\text{Fe}$ ou $\delta^{65}\text{Cu}$ [Frantle et DePaolo, 2004, Viers *et al.*, 2007, Wiederhold *et al.*, 2007, Bigalke *et al.*, 2010, Weinstein *et al.*, 2011, Pons *et al.*, soumis]. Pour le cuivre, Bigalke *et al.* (2010) signalent par exemple un fractionnement de 0.60 ‰ entre les différents horizons d'un même sol. Dès lors, le $\delta^{65}\text{Cu}$ des plantes est soit contrôlé par le métabolisme de celles-ci, soit par la composition du sol, soit les deux. Il n'est pas possible de conclure sur ce point à l'heure actuelle. Pour le fer, il ne semble pas y avoir de différence isotopique entre les deux réseaux trophiques d'Afrique du Sud, et les données se superposent également à celles obtenues par Walczyk and von Blanckenburg. Par conséquent, la géologie n'influe pas sur le $\delta^{56}\text{Fe}$ des mammifères. Qu'en est-il de les différences isotopiques Européens-Japonais-Yakoutes ?

16.2.2 Sang humain et lieu de vie

16.2.2.1 Géologie et composition isotopique du sang humain

Diverses études ont décrit la variabilité naturelle des métaux de transitions dans les matériaux géologiques. Elles ont permis de montrer une très large gamme isotopique pour le $\delta^{65}\text{Cu}$ des gisements métallifères [Maréchal et Albarède, 2002, Albarède, 2004] mais une grande homogénéité pour le $\delta^{65}\text{Cu}$ des autres matériaux géologiques [Albarède, 2004]. Pour le fer, Anbar (2004) fait cas d'un ΔFe de 4‰ pour l'ensemble

des matériaux géologiques, oxydes de fer compris. Enfin, la distribution des isotopes du zinc dans les roches n'excéderait pas 2 ‰ [Albarède, 2004]. Cette variabilité est somme toute supérieure à l'écart observé entre la composition isotopique du sang des Européens et celui des Yakoutes ($\Delta^{56}\text{Fe}=0.01$ ‰, $\Delta^{66}\text{Zn}=0.3$ ‰, $\Delta^{65}\text{Cu}=0.75$ ‰). Existe-t-il un lien entre les deux ?

Pour le cuivre, seules les populations françaises et yakoute ont été analysées si bien que l'on ne peut conclure sur l'influence du lieu de vie sur le $\delta^{65}\text{Cu}$ du sang. Les $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang humain ne diffèrent pas significativement entre les populations. En effet, les faibles valeurs chez les Japonais sont probablement liées à la forte proportion d'hommes analysés (4/5) et la faiblesse de l'échantillonnage (5 individus). Si la valeur extrême de l'individu Y17 n'est pas prise en compte, on peut noter une différence significative entre la population suisse et yakoute ($\Delta\text{Fe} = 0.15\text{‰}$). Cependant, la faiblesse de cet écart isotopique va à l'encontre de l'idée d'une dépendance de la composition isotopique des métaux à celle de l'alimentation. Elle confirme également la négligibilité de l'impact du $\delta^{56}\text{Fe}$ du lieu de vie sur les compositions isotopiques en fer des mammifères. Pour le zinc, les $\delta^{66}\text{Zn}$ sont similaires pour les populations européennes et japonaises mais diffèrent de celles des Yakoutes. Les substrats géologiques sont très différents et n'expliquent pas l'homogénéité isotopique en fer et en zinc entre populations¹. Il convient également de signaler le fait que 50 % des produits alimentaires de Yakoutie sont importés [Alcama *et al.*, 2007]. De même, si l'essentiel des produits consommés par les Européens proviennent d'un réseau national, il n'en reste pas moins qu'une faible proportion des aliments des supermarchés proviennent d'une aire géographique d'un rayon inférieur à 100 km.

16.2.2.2 Pédogénèse et composition isotopique du sang humain

Isotopiquement, seuls les Yakoutes se distinguent des autres populations par les $\delta^{66}\text{Zn}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ de leur sang. Si la géologie de leur lieu de vie ne diffère pas véritablement de la variabilité observée en Europe, ce n'est pas le cas de la nature du sol. Les forêts de la taïga couvrent environ 47 % de la République de Sakha, le reste de la végétation étant occupé par de la toundra. Près de 95 % du sol est un pergélisol. Viliouïsk est

1. Les volontaires ayant participé à des études isotopiques portant sur le sang viennent de Zurich, Lyon, Umea, Tokyo et Viliouïsk [Walczyk et von Blanckenburg, 2002, Ohno *et al.*, 2004, Ohno *et al.*, 2005, Stenberg *et al.*, 2005, Albarede *et al.*, 2011, Jaouen *et al.*, soumis, Jaouen *et al.*, en préparation].

Lyon et Zurich sont toutes deux alimentées par des fleuves prenant leur source dans les Alpes. Lyon est située dans la vallée du Rhône entre le Massif Central et les Alpes. Elle repose sur des dépôts quaternaires. Quant à Zurich, elle se trouve dans le bassin molassique des Alpes Suisses. Umea est située sur le bouclier svécofennien, principalement composé de granite rapakivi. Elle est traversée par la rivière Ume qui prend sa source dans les Calédonides, composées de roches métamorphiques. Viliouïsk appartient au craton sibérien. Elle repose sur la couverture sédimentaire de la plateforme sibérienne constituée de carbonates et sédiments clastiques du Cénozoïque [Popp *et al.*, 2007]. La rivière Vilyuy, qui l'alimente, prend sa source dans le plateau central sibérien. Enfin, Tokyo est en plein coeur d'une zone de subduction. Ville littorale, elle repose sur des terrains holocènes. Néanmoins, la majorité de l'île est constituée de granitoïdes et de roches volcaniques.

située dans la région de la taïga qui pousse sur un podzol. Malgré la faible proportion des produits locaux dans l'alimentation yakoute, se pourrait-il que ceux-ci suffisent à modifier la composition isotopique de leur sang ?

Il semble que les sols soient appauvris en isotopes lourds de zinc par rapport à la roche mère. Cet appauvrissement est lié à la couverture végétale [Viers *et al.*, 2007, Pons *et al.*, soumis]. Ainsi, le sol de la toundra doit être caractérisé par un $\delta^{66}\text{Zn}$ plus élevé que celui des zones tempérées en raison de la faiblesse de la végétation. Par contre, on peut s'attendre à observer des valeurs de $\delta^{66}\text{Zn}$ particulièrement faible pour le podzol² car la décomposition de la végétation de la taïga est très faible ce qui engendre un appauvrissement du sol très important en minéraux. Pour le cuivre, un fort prélèvement minéral de la végétation devrait engendrer un enrichissement en ^{65}Cu , conformément à la tendance observée entre le sang des Yakoutes et celui des Français [Weinstein *et al.*, 2011]. Cependant, l'écart isotopique maximal de $\Delta^{65}\text{Cu}=0.60\text{ ‰}$ mis en évidence par Bigalke *et al.* (2010) au sein de quatre profils de sol est inférieur à la différence moyenne existant entre le sang des Lyonnais et des habitants de Viliouïsk ($\Delta^{65}\text{Cu}=-0.75\text{ ‰}$). Enfin, l'homogénéité des $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang au niveau mondial ne cadre pas avec la forte variabilité isotopique existant dans les sols, en particulier le podzol [Fantle et DePaolo, 2004, Wiederhold *et al.*, 2007]. L'ensemble de ces observations va à l'encontre d'un rôle des processus de pédogénèse sur l'originalité isotopique du sang des Yakoutes.

16.2.3 Bilan de l'influence du lieu de vie sur les isotopes des métaux de transition du sang

L'influence du lieu de vie sur la composition isotopique du sang des humains est a priori négligeable. En effet, les populations présentent les mêmes gammes de variabilité de rapport isotopique des métaux de transition, à l'exception des Yakoutes qui se distinguent par les $\delta^{66}\text{Zn}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ de leur sang. Cependant, il est difficile d'expliquer cette originalité par leur lieu de vie sachant que la composition isotopique du sol de la taïga devrait provoquer un enrichissement en $\delta^{65}\text{Cu}$ et un appauvrissement du $\delta^{66}\text{Zn}$ du sang des Yakoutes alors qu'on observe la tendance inverse.

D'autre part, l'étude du lien entre lieu de vie et composition isotopique du sang humain pose un problème majeur : l'essentiel de l'alimentation des populations étudiées ne provient pas de réseaux locaux. À l'avenir, il conviendrait de s'intéresser à des populations s'alimentant à un niveau local ou de continuer à travailler sur des modèles animaux.

Cependant, les résultats obtenus chez l'Homme confirment l'absence de lien entre $\delta^{56}\text{Fe}$ et lieu de vie mis en évidence dans l'étude sur les réseaux trophiques d'Afrique du Sud. Ils contredisent les résultats obtenus pour le $\delta^{66}\text{Zn}$, qui eux même allaient à l'encontre de l'étude portant sur les moutons et les souris [Balter *et al.*, en préparation].

2. c.f. glossaire

Par conséquent, l'influence du niveau trophique et de la géologie du sol sur la composition isotopique en cuivre et zinc des être vivants semblent répondre à une dynamique complexe que le peu d'études existantes ne permet pas, pour le moment, d'élucider.

La difficulté de conclure sur l'origine du $\delta^{66}\text{Zn}$ et du $\delta^{65}\text{Cu}$ est accentuée par la forte proportion d'aliments importés dans les alimentations des populations actuelles. Seul le fer échappe à ce problème d'importation étant donné que les compositions isotopiques des réseaux trophiques sont comparables selon les localités [Walczyk et Von Blanckenburg, 2002, Jaouen *et al.*, b]. Nous allons maintenant nous intéresser à l'influence du régime alimentaire en lui même, c'est à dire la proportion de chaque type d'aliments, sur le $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang humain

16.3 Influence du régime alimentaire au niveau intrapopulationnel

16.3.1 Alimentation et composition isotopique du sang

Les Yakoutes se distinguent des autres populations, notamment française, par leur $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ (chapitre 13). L'alimentation serait-elle responsable de l'originalité isotopique des Yakoutes ? Les proxies isotopiques classiques de l'alimentation ne nous permettent pas de répondre. En effet, si le sang des Yakoutes se distingue d'une part par son $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ et d'autre part par ses $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$, il n'existe pas de corrélation entre ces systèmes isotopiques.

Le sang de 2 Français et 12 Françaises non ménopausées âgées entre 23 et 49 ans a été analysé au cours de cette thèse. Chacun d'entre eux a répondu à un questionnaire alimentaire détaillé, permettant de compter le nombre de prises alimentaires par mois de produits laitiers, de viande, de poisson, de fruits, de légumes dont les féculents ou encore de produits inhibiteurs de l'absorption intestinale de fer tel que le thé. A partir de ces données, nous avons également pu quantifier la prise alimentaire de protéines animales et végétales. Le détail des résultats de ces questionnaires est disponible annexe C. Nous n'avons constaté aucune corrélation entre le nombre de prises alimentaires de chaque type de produit et le $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang, à l'exception des féculents (Figure 16.3.1). La corrélation est valable quand les deux sexes sont considérés ensemble. Si l'on analyse les données provenant uniquement des femmes, cette corrélation reste valide si l'on ne tient pas compte de la valeur extrême provenant de l'individu qui consomme très peu de féculents par mois.

Il semble ainsi que la consommation de féculents diminue le $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang. Ce résultat peut s'expliquer facilement : les céréales sont très riches en acide phytique qui inhibe l'absorption du fer, du cuivre et du zinc. L'inhibition de l'absorption intestinale engendre donc un fractionnement plus important entre le régime alimentaire et le sang. Or, ce fractionnement favorise les isotopes légers : les individus consommant beaucoup

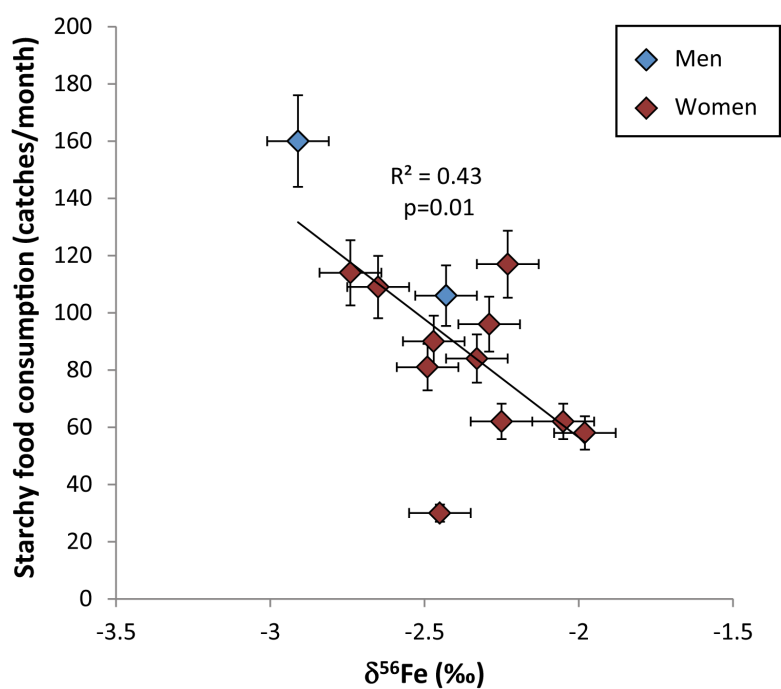


FIGURE 16.3.1: Corrélation entre le nombre de portions de féculents ingérées par mois et le $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang de 12 femmes et 2 hommes français du réseau d'entourage.

de céréales ont donc un sang logiquement enrichi en ^{54}Fe . On peut également prédire chez ces individus une signature isotopique caractérisée par un fort $\delta^{66}\text{Zn}$ et un faible $\delta^{65}\text{Cu}$.

L'acide phytique joue vraisemblablement un rôle prépondérant dans le fractionnement isotopique des métaux au cours de l'alimentation d'après nos observations réalisées au sein d'un réseau trophique ou d'une population. Curieusement, la proportion d'aliments riches en ^{56}Fe ou ^{54}Fe semble ne jouer aucun rôle sur le ^{56}Fe , ce qui confirme les observations préliminaires de Walczyk et von Blanckenburg (2005). Une étude récemment publiée [Van Heghe *et al.*, 2012] porte sur les différences isotopiques entre 6 omnivores et 6 végétariens. Leurs résultats préliminaires indiquent une absence d'influence du régime alimentaire sur le $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang mais un enrichissement en ^{63}Cu et ^{66}Zn pour le sang des végétariens. Ces résultats vont dans le sens de la prédiction du rôle des phytates sur les compositions isotopiques du ^{63}Cu et ^{66}Zn et confirment l'absence de corrélation entre alimentation et $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang quand d'autres aliments que les féculents sont pris en compte.

A ce jour, aucune étude de grande ampleur n'a pu mettre en évidence le lien entre alimentation et composition isotopique en métaux du sang. Les résultats présentés dans cette section vont cependant dans le sens d'une influence du niveau trophique ainsi que d'un lien entre lieu de vie, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$ et entre consommation de phytates, $\delta^{66}\text{Zn}$ et $\delta^{56}\text{Fe}$. L'ensemble de ces résultats préliminaires gagnerait à être confirmé par des études ultérieures.

16.3.2 Alimentation et composition isotopique des ossements.

16.3.2.1 Tendances dans le régime alimentaire de la population de Saint-Laurent de Grenoble à l'Epoque Moderne

Les analyses de $\delta^{13}\text{C}$ et de $\delta^{15}\text{N}$ des squelettes de Saint-Laurent de Grenoble ont été réalisées par Estelle Herrscher à partir des phalanges qui, plus tard, ont servi à la détermination des rapports isotopiques des métaux. Ces données ont été très brièvement discutées dans la troisième partie. Nous avons alors insisté sur l'absence de corrélation entre les rapports isotopiques des métaux de transitions et ces proxies alimentaires. L'absence de différence significative entre le régime alimentaire des hommes et celui des femmes avait également été soulignée.

La distribution des 43 données de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ est continue. Elle s'organise autour d'un axe avec une très large dispersion, la corrélation étant très faible mais significative ($R^2=0.16$, $p<0.006$). Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ sont très variables, alors que les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ se distribuent dans une gamme restreinte. Ces gammes se superposent exactement à celles mises en évidence par Herrscher (2003, Tableau 16.1). Dans cette publication, Estelle Herrscher souligne la restriction de la gamme de $\delta^{13}\text{C}$ pour une alimentation à base de plantes de type C3. Cela avait été interprété comme une faible diversité des produits consommés. La gamme de $\delta^{15}\text{N}$ est, elle, très large, du XIII au XVIII^{ème} siècle.

Herrscher *et al.* (2003) et Richards *et al.* (1998) interprètent cette originalité par une alimentation comprenant à la fois des protéines animales terrestres et marines. Les valeurs en $\delta^{13}\text{C}$ sont étonnamment faibles en comparaison d'autres études sur les populations médiévales [Herrscher, 2003], ce qui confirme la présence de protéines animales terrestres dans l'alimentation de tous les individus. Ces protéines peuvent provenir d'oeufs et de lait et non uniquement de viande [O'Connell *et al.*, 1999]. Dès lors, on peut distinguer dans la distribution des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ un pôle végétarien et un pôle carnivore, ce dernier étant caractérisé par de fortes valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$.

Source		$\delta^{15}\text{N}$			$\delta^{13}\text{C}$		
		max	min	D	max	min	D
XIII-XV	Herrscher <i>et al.</i> , 2001	10.8	6.3	4.5	-19.1	-20.6	1.5
XVII-XVIII	In Jaouen <i>et al.</i> , 2012	10.9	6.4	4.5	-19.1	-20.2	1.1

TABLE 16.1: Variations inter-individuelles des compositions isotopiques en carbone et en azote à Saint-Laurent au Moyen-Age et à l'Epoque Moderne (sujets adultes).

Du XIII au XIV^{ème} siècle, le régime alimentaire des jeunes individus diffère significativement de celui des individus les plus âgés. Il est alors caractérisé par un plus faible apport de protéines animales. Dans l'échantillonnage du XVII-XVIII^{ème} siècle, on remarque que les jeunes individus occupent le pôle végétarien et les individus les plus âgés le pôle carnivore. Cependant, aucune différence significative ne ressort entre les trois groupes d'âge. Dès lors, on peut considérer que l'accès aux protéines animales devient plus aisé pour les individus les plus âgés au détriment des plus jeunes.

16.3.3 Relation entre régime alimentaire et composition isotopique en métaux des restes humains

Il a déjà été souligné l'absence de corrélation entre les isotopes du carbone et de l'azote d'une part et les isotopes des métaux de transitions d'autre part (Partie IV). Cependant, il a été proposé que l'absence de corrélation entre le $\delta^{65}\text{Cu}$, $\delta^{66}\text{Zn}$ et l'âge dans les os et le sang des deux populations étudiées soit liée à l'influence du régime alimentaire (Actuelle : Jaouen *et al.*, en préparation et Albarède *et al.*, 2011 ; XIX^{ème} : Partie III). Dès lors, il est intéressant d'évaluer la corrélation entre proxies isotopiques alimentaires et $\delta^{66}\text{Zn}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ par groupe d'âge. Pour les ossements, on s'intéressera à la fois aux valeurs de ceux-ci ainsi qu'au fractionnement isotopique entre l'os et l'émail dentaire.

Les résultats révèlent une absence totale de corrélation entre les proxies alimentaires et les valeurs isotopiques des métaux de transition, qu'on considère le $\Delta_{\text{email-os}}$ ou le δ propre à l'os. Cela n'est pas étonnant étant donné qu'aucune tendance significative de régime alimentaire n'a été mise en évidence par groupe d'âge. Dès lors, l'hypothèse

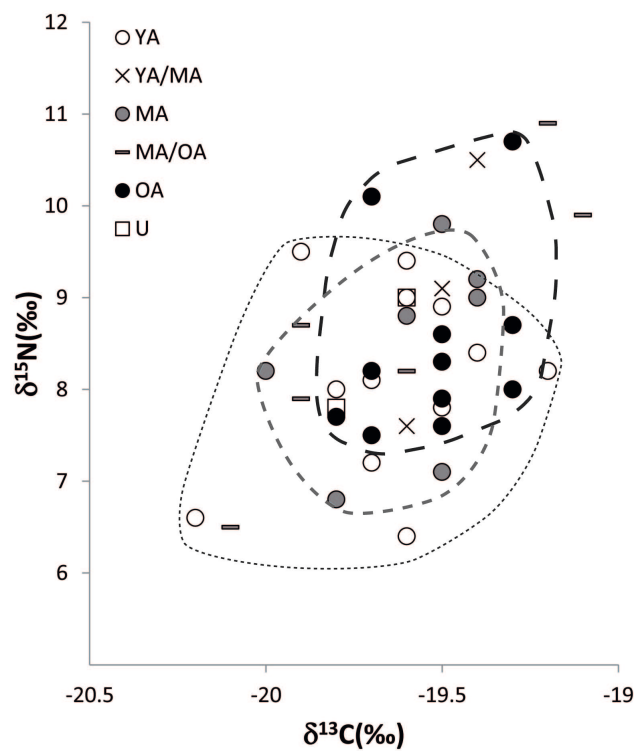


FIGURE 16.3.2: $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ du collagène des ossements de Saint-Laurent de Grenoble. Les individus sont classés par groupe d'âges et sont décédés entre le XVII et le XVIII^{ème} siècle.

d'une influence réelle du régime alimentaire sur les rapports isotopiques des métaux est à écarter, confirmant les prédictions obtenues dans le vivant.

Conclusions sur l'impact isotopique de l'alimentation

L'influence du régime alimentaire sur les compositions isotopiques des métaux de transition semble répondre à un mécanisme complexe si tant est qu'elle existe. Certes, il apparaît que le niveau trophique affecte la composition isotopique globale du corps humain, que ce soit pour le cuivre, le fer ou le zinc. La signature isotopique locale se transmet du sol jusqu'au sommet des réseaux trophiques pour le cuivre, voire pour le zinc. Pourtant, la proportion de végétaux/viande consommée ou poisson/viande ne se corrèle en rien avec le $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang, alors que ces sources alimentaires ont des compositions isotopiques très différentes. Le seul facteur de variabilité isotopique intrapopulationnel qui apparaît à plusieurs reprises est la consommation des phytates. Toutefois, les études présentées dans ce chapitre sont préliminaires et requièrent des confirmations ultérieures.

Conclusion

La question des facteurs influençant la composition isotopique du sang est très complexe car les paramètres semblent nombreux : le régime alimentaire, l'âge, le sexe, la ménopause, les menstruations, la grossesse, la croissance ou encore le stress climatique.

Le *turnover* des métaux dans le corps humain est néanmoins le point crucial dans l'explication des $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$ de chaque individu : le stress climatique, les menstruations et la grossesse l'accélèrent, provoquant un prélèvement plus important de ^{66}Zn , ^{63}Cu et ^{56}Fe à partir de l'alimentation. Au contraire, la ménopause le ralentit.

Comme pour le sexe, les restes humains semblent enregistrer l'influence des paramètres isotopiques du sang. Néanmoins, beaucoup de facteurs n'ont pu être testés et requièrent des études ultérieures. Quoi qu'il en soit, la mise en évidence de l'influence d'une élévation de la BMR sur le $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$ du sang pourrait être d'un intérêt majeur en paléanthropologie. En effet, le métabolisme de base des Néandertaliens est actuellement calculé à partir d'équations établies chez l'Homme [Sorensen et Leonard, 2001]. Or, on ne connaît pas l'influence de l'espèce sur ce métabolisme, mais on a vu que les équations des mammifères appliquées à l'orang-outan surestimaient de 40 % le métabolisme de ce grand singe [Pontzer *et al.*, 2010]. Les isotopes du cuivre et du zinc sont donc susceptibles de fournir à terme un critère quantifiant le métabolisme individuel des populations passées.

Origine du dimorphisme sexuel isotopique

Introduction

L'ensemble de ce travail de thèse a permis de mettre en évidence l'influence de certains paramètres physiologiques et d'en expliquer l'origine, à l'exception d'un seul. En effet, la différence entre les sexes initialement découverte dans le sang est conservée dans les ossements, ce qui offre des perspectives de sexage des restes humains par un outil isotopique. Pourtant, nous n'avons pas encore discuté en détail du mécanisme provoquant l'enrichissement en ^{56}Fe et ^{63}Cu dans les tissus humains.

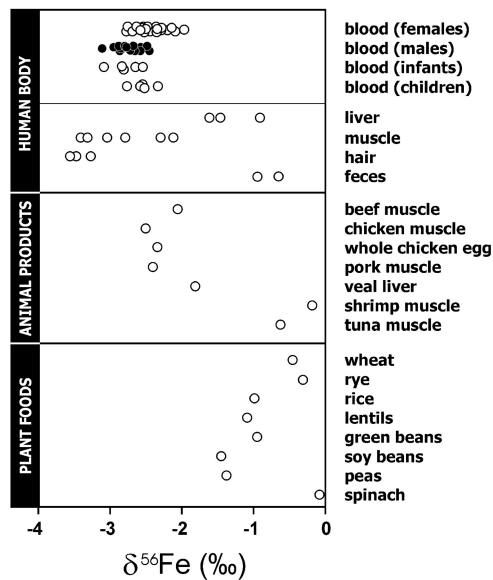


FIGURE 16.3.3: Variations isotopiques en fer dans les organes humains et différents échantillons provenant des sources classiques de l'alimentation humaine. Figure : Walczyk et von Blanckenburg, 2002.

La première hypothèse pour expliquer les valeurs élevées du $\delta^{56}\text{Fe}$ dans le sang des femmes a été proposée par Walczyk et von Blanckenburg en 2002. Ils suggèrent que les besoins en fer des femmes, supérieurs à ceux des hommes, sont compensés par une absorption intestinale du fer plus élevée. Au vu des compositions isotopiques des plantes et des muscles herbivores, le corps humain semble préférentiellement absorber les isotopes lourds du fer (Figure 16.3.3). Le fractionnement isotopique est d'autant plus important

que la portion de fer prélevée est faible. Par conséquent, l'accroissement de l'absorption intestinale des femmes induit un fractionnement plus faible entre l'alimentation et leur sang.

Walczyk et von Blanckenburg proposent également trois autres théories dans leur article de 2002 :

- *Le fer reflète directement la composition isotopique de l'alimentation.* Cette idée repose sur le fait que les plantes sont caractérisées par une signature très enrichie en isotopes lourds comparée à celle du sang ($-1.4\text{‰} < \delta^{56}\text{Fe}_{\text{plantes}} < -0.1\text{‰}$, Figure 16.3.3). Cependant, les auteurs stipulent que cet enrichissement ne suffit pas à lui seul à expliquer l'étendue de la gamme isotopique sanguine (-2 à -3.1 ‰). En effet, la faible proportion de produits animaux (10 à 20 %) dans l'alimentation ne permet pas d'engendrer une forte variabilité de la composition isotopique du régime alimentaire. Pour preuve, la composition isotopique des fèces : 80 % du fer du bol alimentaire n'est pas absorbé et constitue le $\delta^{56}\text{Fe}$ de la matière fécale. Le rapport isotopique du fer des fèces est par conséquent proche de celui de l'alimentation, soit autour de -1 ‰. Les résultats préliminaires de Walczyk et von Blanckenburg (2005) et Van Hegue *et al.* (2012) ainsi que nos résultats obtenus sur les Yakoutes et les douze Français (Chapitre 13 et Chapitre 18) confirment cette absence de dépendance entre proportion de protéines animales dans l'alimentation et $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang humain.
- *Les isotopes du fer sont répartis de façon hétérogène dans le corps humain* et peuvent subir un fractionnement différentiel selon les organes et tissus réservoirs. Ceux-ci sont constitués par le foie, le sang, les muscles et la peau, tous très appauvris en ^{56}Fe (Figure 16.3.3). L'idée de Walczyk et von Blanckenburg est que, dans le cadre d'une absorption quantitative du fer, on devrait observer dans d'autres organes des $\delta^{56}\text{Fe}$ autour de +3 à +6 ‰. Cependant, il est possible que l'absorption sélectionne effectivement les isotopes légers de manière équivalente entre hommes et femmes, mais que la distribution aux organes et tissus soit ensuite hétérogène. C'est l'hypothèse que nous avons formulée dans deux publications [Albarède *et al.*, 2011, Jaouen *et al.*, 2011] et qui a récemment été suggérée par Hotz *et al.* en 2012. Nous reviendrons sur cette idée au cours de ce chapitre.
- *Les pertes de fer du sang des femmes pourraient être enrichies en isotopes légers du fer*, et engendrer un enrichissement progressif du corps en isotopes lourds du fer. Walczyk et von Blanckenburg souligne le fait qu'il n'y a pas de mécanisme susceptible d'engendrer un fractionnement isotopique du sang menstruel (Walczyk et von Blanckenburg, 2005). Néanmoins, les pertes menstruelles contiennent aussi une proportion importante de débris endométriaux³, dont la composition isotopique n'est pas connue à ce jour. Nous présenterons des données préliminaires concernant le $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ de l'endomètre afin de discuter de cette piste explicative.

Depuis 2002, les publications concernant la variabilité isotopique des métaux de tran-

3. c.f. glossaire

sition dans le corps humain se sont essentiellement concentrées sur le fer. Dès lors, on dispose désormais d'un nombre significatif de données sur les compositions isotopiques des tissus et organes jouant un rôle primordial dans le métabolisme de cet élément. Il est désormais possible de modéliser numériquement les différentes hypothèses sur l'origine de la différence isotopique sexuelle pour cet élément.

Par conséquent, nous allons discuter dans cette partie des potentiels mécanismes à l'origine de la différence isotopique homme/femme à la lumière des données évoquées au cours des précédents chapitres ainsi que des nouvelles données obtenues sur des débris endométriaux. Pour cela, nous ferons également appel à des modélisations mathématiques type modèle de boîtes. Nous centrerons notre étude sur le fer, le cas du cuivre souffrant d'un manque de données bibliographiques.

Chapitre 17

Discussion autour des trois hypothèses

17.1 Une différence isotopique liée à des pertes endométriales ?

Chaque mois, les femmes perdent entre 30 à 80 mL de sang menstruel [Hallberg et Rossander-Hulten, 1991, Harvey *et al.*, 2005]. Ces pertes ne sont pas uniquement constituées de sang à proprement parler, mais contiennent également des débris d'endomètre et dans une moindre mesure, des cellules vaginales. L'endomètre est la muqueuse interne de l'utérus (Figure 17.1.1). Chaque mois, il est renouvelé au 2/3, ce qui représente une perte d'environ 5 mL pour le corps (Philippe et Charpin, 1992, Figure 17.1.1). Si cet endomètre était enrichi en ^{65}Cu et appauvri en ^{56}Fe par rapport au corps humain, on pourrait expliquer la composition isotopique du sang des femmes comme résultant de l'enrichissement progressif de l'ensemble du corps en ^{63}Cu et ^{56}Fe . Il convient donc à la fois de déterminer la composition isotopique du corps humain et celle de l'endomètre et/ou du sang menstruel afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

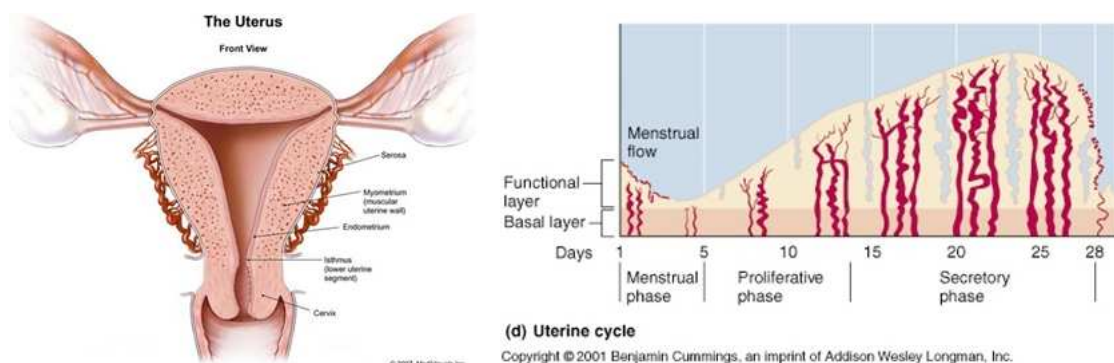


FIGURE 17.1.1: À gauche : Anatomie de l'utérus humain. À droite : Évolution de l'épaisseur endométriale au cours du cycle menstruel.

17.1.1 Étude isotopique de l'endomètre et du sang menstruel

17.1.1.1 Résultats

Les données isotopiques et élémentaires de sang menstruel, d'endomètre et de sang capillaire sont données dans l'annexe C.

Analyse du sang menstruel

Les valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang menstruel sont comprises entre -1.96 et -2.87 ‰ et les valeurs de sang capillaire entre -2.08 et -2.77 ‰. Les résultats sont présentés figure 17.1.2.

Concernant les mesures pour chaque individu, le sang menstruel du premier jour semble enrichi en isotopes légers comparé au sang capillaire sauf pour l'individu D. Le $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang du deuxième et troisième jour est identique au sang capillaire.

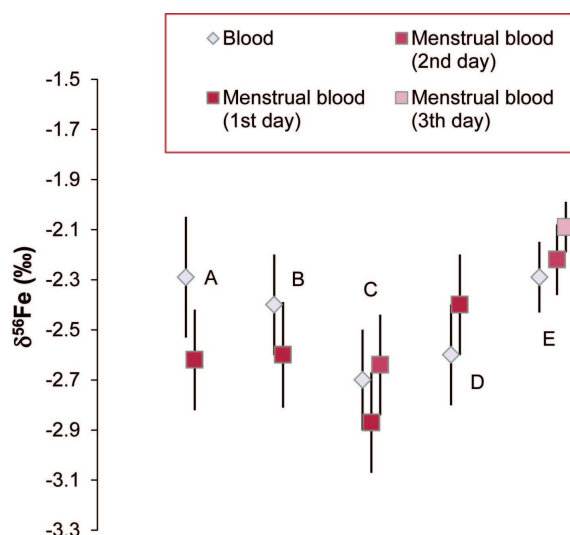


FIGURE 17.1.2: $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang capillaire et menstruel de cinq femmes.

Analyse de l'endomètre

L'endomètre provient du sang menstruel des femmes ici anonymées par les lettres B, D, E, L et K. Parallèlement, le sang total des femmes B, D, E et K et les hématies de la femme L ont été prélevés et analysés.

Les valeurs isotopiques de l'endomètre sont comprises entre -2.76 et -4.44 ‰ pour le fer et -0.19 et -0.75 ‰ pour le cuivre (Figure 17.1.3). L'endomètre est systématiquement enrichi en ^{54}Fe par rapport au sang. Pour le cuivre, 4 endomètres sur 5 sont enrichis en ^{63}Cu comparé au sang capillaire.

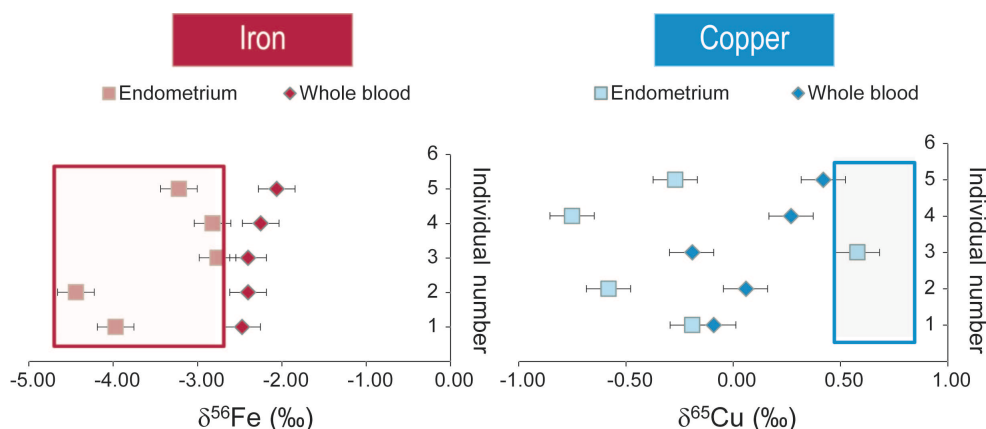


FIGURE 17.1.3: $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$ du sang capillaire et de l'endomètre de cinq femmes âgées entre 24 et 27 ans

Estimation de la composition isotopique globale du corps humain

Les principaux réservoirs du fer et du cuivre dans le corps humain sont donnés tableau 17.1 avec les compositions isotopiques qui leur sont associées. Pour le cerveau et les muscles, il n'existe pas dans la littérature de mesures sur des tissus humains. Cependant, chez le mouton comme chez la souris, la composition isotopique des muscles équivaut à celle du sang total [Balter *et al.*, en préparation]. Pour ces animaux, les données du cerveau correspondent à celles obtenues dans les érythrocytes. Cela peut s'expliquer par le fait que le cuivre est intracellulaire dans le cerveau comme les hématies, et que les muscles sont gorgés de sang. La composition isotopique estimée du cerveau a donc été assimilée au $\delta^{65}\text{Cu}$ moyen des érythrocytes [Albarède *et al.*, 2011] et celle du muscle au $\delta^{65}\text{Cu}$ moyen du sang total [Albarède *et al.*, 2011]. On trouve une composition globale du corps humain de $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{globale}} = -2.30 \text{ ‰}$ et $\delta^{65}\text{Cu}_{\text{globale}} = 0.04 \text{ ‰}$.

	Fer (mg)	$\delta^{56}\text{Fe}$ (‰)	Ref
Muscles	300	-2.79	Walczyk et von Blanckenburg, 2002
Foies	1000	-1.26	Jaouen <i>et al.</i> , en préparation
Sang total	2500	-2.65	Albarede <i>et al.</i> , 2011
Composition globale	3800	-2.30	

TABLE 17.1: Quantité de fer contenu dans les principaux organes et tissus réservoirs de ce métal et composition isotopique associée

Discussion

Avec une population de cinq femmes, cette étude est véritablement préliminaire. Les $\delta^{56}\text{Fe}$ sont très variables : cela s'explique probablement par les traces de sang encore

	Cuivre (mg)	$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰)	Ref
Cerveau	7	0.53	Estimation*
Foies	10	-0.26	Jaouen <i>et al.</i> , en préparation
Muscles	26	0.08	Estimation*
Os	9.5	-0.11	Jaouen <i>et al.</i> , 2012
Sang total	6	0.08	Albarede <i>et al.</i> , 2011
Composition globale	58.5	0.04	

TABLE 17.2: Quantité de fer contenu dans les principaux organes et tissus réservoirs de ce métal et composition isotopique associée.* Estimations : voir texte.

présentes dans la muqueuse. Il peut être remarqué que l'endomètre est systématiquement enrichi en isotopes légers par rapport au sang circulatoire. Les faibles $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang des premiers jours de menstruations s'expliquent probablement par une forte proportion de débris d'endomètres. Le sang circulatoire étant lui-même enrichi en isotopes légers par rapport à la composition globale du corps, on en déduit que la perte d'endomètre provoque chaque mois un enrichissement en ^{56}Fe du corps humain.

Le $\delta^{65}\text{Cu}$ du corps humain est similaire au $\delta^{65}\text{Cu}$ du sang total. Les cinq échantillons d'endomètres sont, selon les femmes, soit appauvris soit enrichis en ^{65}Cu . La différence isotopique entre hommes et femmes ne peut donc pas s'expliquer par un appauvrissement en ^{65}Cu au cours du temps liée à la perte endométriale. De plus, l'endomètre présente de faibles concentrations de cuivre (6 à 8 ppm). Même s'il était systématiquement enrichi en isotopes lourds par rapport au corps humain, l'endomètre contient trop peu de cuivre pour être à l'origine d'un fractionnement isotopique sur le long terme.

En conclusion, la perte endométriale ne peut pas être l'origine de la différence isotopique homme/femme pour le cuivre. Il est donc peu probable qu'elle soit à l'origine de la différence isotopique en fer. En revanche, l'endomètre est un matériau riche en ^{54}Fe , et pourrait par conséquent contribuer au décalage isotopique entre homme et femme sur le long terme. Nos estimations à partir d'un modèle très simple (Annexe D) indique un décalage isotopique maximal de 0.2 ‰ en 10 ans, ce qui est non négligeable compte tenu de la différence moyenne de 0.27 ‰ mise en évidence par Walczyk et von Blanckenburg (2002) et Albarede *et al.* (2011) entre hommes et femmes.

17.2 Une différence isotopique liée à une absorption intestinale différentielle ?

L'hypothèse d'une différence isotopique liée à une absorption différentielle du fer entre hommes et femmes a donc été proposée par Walczyk et von Blanckenburg en 2002.

Elle a été étayée en 2005 par Krayenbuehl *et al.* Ces auteurs ont étudié la composition isotopique du sang de patients traités pour hémochromatose, une maladie génétique

caractérisée par une augmentation de l'absorption intestinale du fer engendrant une surcharge de cet élément au sein des organes de réserve. Le traitement de cette maladie se fait par des saignées (phlébotomies). Krayenbuehl *et al.* (2005) observent des valeurs élevées du $\delta^{56}\text{Fe}$ dans le sang des patients souffrant d'hémochromatose. Les patients traités sont ceux concernés par les valeurs les plus hautes, ce qui n'est pas étonnant étant donné que l'augmentation de l'absorption du fer lors des phlébotomies a été documentée [Weintraub *et al.*, 1964]. Il a alors été conclu que l'absorption intestinale était bien à l'origine de la différence isotopique entre hommes et femmes.

Selon Krayenbuehl *et al.*, le fractionnement isotopique est lié à l'absorption de fer non-hémique qui est transféré dans l'entérocyte¹ par un transporteur, le DMT-1, alors que le fer hémique pénètre dans la cellule par endocytose (Figure 17.2.1).

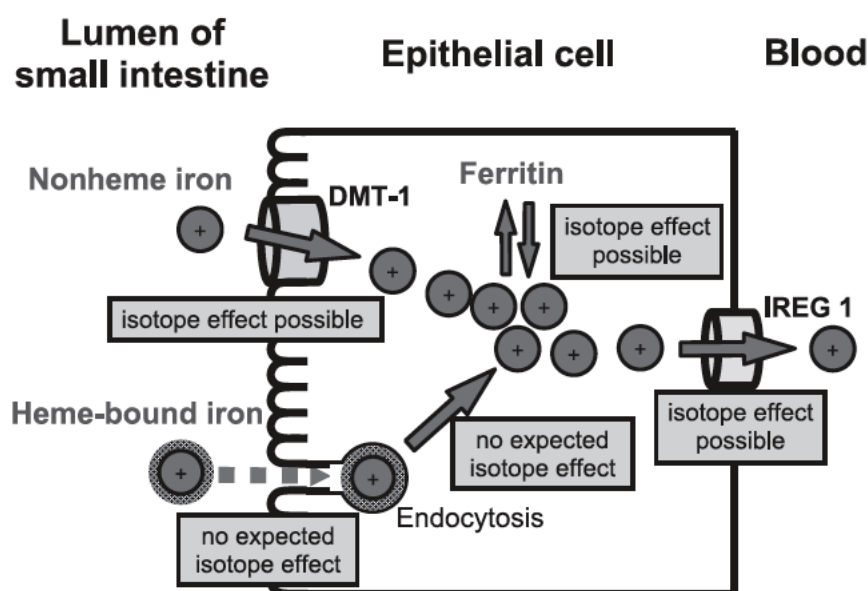


FIGURE 17.2.1: Fractionnement isotopique du fer au cours de l'absorption intestinale. Figure : Krayenbuehl *et al.*, 2005. DMT-1 : divalent metal transporter-1 ; IREG 1 : iron regulatory protein 1.

Cette explication rend compte d'un certain nombre d'observations réalisées au cours de ce travail de thèse.

- D'une part, parmi les échantillons de sang de Yakoutes, nous avons observé des valeurs étonnamment élevées en $\delta^{56}\text{Fe}$ chez les hommes (Partie IV, Chapitre 13). En raison du stress thermique résultant de leur habitat proche du cercle polaire arctique, leur métabolisme est plus élevé et le turnover du fer est accéléré. L'absorption intestinale est donc probablement plus forte pour ces hommes. L'écart de

1. c.f. glossaire

métabolisme entre individus des zones circumpolaires et tempérées est plus élevé pour les hommes que pour les femmes, ce qui peut expliquer que cette particularité ne s'observe pas chez les femmes yakoutes [Snodgrass *et al.*, 2005].

- D'autre part, nous avons invoqué l'accroissement de l'absorption du fer au cours de l'adolescence pour expliquer l'écart isotopique entre émail dentaire et ossements chez les hommes (Partie IV, Chapitre 14).
- Enfin, les résultats préliminaires obtenus sur les 12 français vont dans le sens d'un accroissement du fractionnement isotopique lors de l'absorption lié à la présence de phytate (Partie V, Chapitre 18).

Cependant, cette hypothèse a été fragilisée par les observations que nous avons réalisées dans l'émail dentaire. En effet, l'absorption intestinale est déjà plus importante chez les filles de 9 ans que sur les enfants du même âge [Woodhead *et al.*, 1991]. Les résultats isotopiques sont similaires chez les enfants de deux sexes, que ce soit dans le sang ou l'émail dentaire (Partie III, Chapitre 11, Walczyk et von Blanckenburg, 2002). Cela n'a rien de surprenant étant donné la lenteur du cycle métabolique du fer (Partie III, Chapitre 12, Hotz *et al.*, 2012). Par contre, on ne constate pas dans l'émail dentaire la différence isotopique attendue entre les deux sexes pour les isotopes du cuivre.

De plus, selon le mécanisme de fractionnement proposé par Krayenbuehl *et al.* (2005), on devrait observer des gammes de $\delta^{56}\text{Fe}$ différentes entre les individus consommant beaucoup de viande et ceux consommant beaucoup de légumes, ce qui n'a pas été observé dans la littérature [Van Heghe *et al.*, 2012] ou pour les 12 volontaires ayant répondu à des questionnaires alimentaires (Figure 17.2.2).

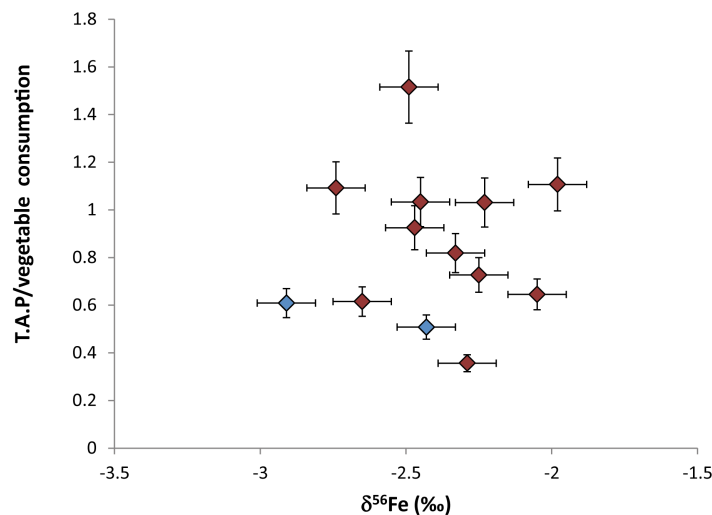


FIGURE 17.2.2: $\delta^{56}\text{Fe}$ du sang total en fonction de la proportion entre T.A.P (Terrestrial Animal Products) et légumes (céréales comprises) consommée chaque mois. Le rapport T.A.P./végétales est quantifié en fonction du nombre de prises alimentaires des aliments de chaque catégorie.

Dès lors, comment peut-on expliquer la différence isotopique homme/femme ?

17.3 Une différence isotopique liée à une sollicitation hépatique différentielle ?

En 2011, l'analyse de huit échantillons de foie humain provenant d'une biopsie nous a amené à proposer une nouvelle hypothèse sur l'origine de la différence isotopique homme/femme [Albarède *et al.*, 2011, Jaouen *et al.*, 2011]. Ces données sont comprises dans l'article « *Iron and copper isotope budgets at menopause* » du chapitre 12. Pour rappel, nous avons constaté que la composition isotopique du foie était plus proche de celle du sang des femmes que du sang des hommes, et cela pour le cuivre comme pour le fer (Partie III, chapitre 12). Les réserves hépatiques des femmes, à partir de la ménarche, sont plus faibles que celles des hommes en raison des pertes menstruelles [Woodhead *et al.*, 1991]. Après la ménopause, ces réserves se reconstituent sans jamais atteindre le niveau de celles des hommes, ce qui s'explique par la lenteur du renouvellement du fer dans le corps humain [Whitfield *et al.*, 2003]. Ainsi, la proportion de fer entre le foie et les érythrocytes² diffère selon le sexe. Les principaux réservoirs du fer dans le corps humain sont en effet constitués par les érythrocytes et le foie. Chez l'homme, le ratio de fer entre le foie et les hématies est d'environ 0.4 alors qu'il est de 0.25 pour la femme menstruée (Figure 17.3.1). Dès lors, on peut supposer que la sollicitation des réserves hépatiques engendre un enrichissement en ^{56}Fe et ^{63}Cu dans le sang.

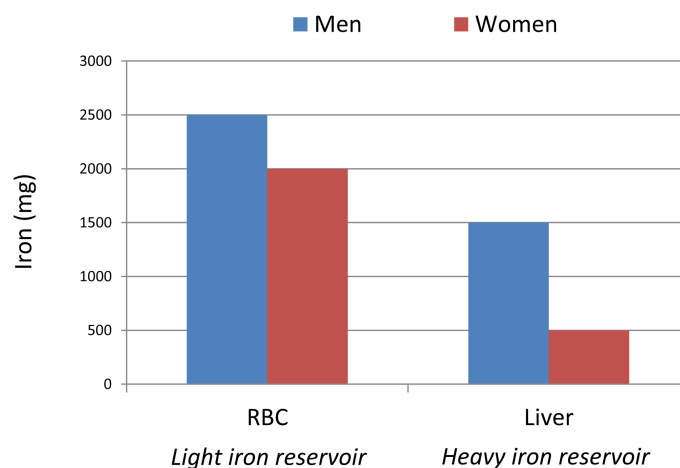


FIGURE 17.3.1: Masse de fer présente dans le foie et le sang chez les hommes et les femmes.

La sollicitation des réserves du fer chez les femmes menstruées est parfaitement logique.

2. c.f. glossaire

Celle du cuivre, si elle est moins intuitive, est toute aussi pertinente. Comme cela a été rappelé dans la première partie de ce manuscrit, les carrefours métaboliques entre le foie et le cuivre sont nombreux (Figure 3.5). La mise en réserve du fer et sa mobilisation dans le foie requiert notamment une enzyme, la céruloplasmine, qui contient du cuivre. Ces réactions biochimiques sont caractérisées par un changement de spéciation chimique. Au sein de la ferritine, le fer est à l'état réduit. Dans le sang, il est oxydé (Figure 17.3.2). Lors de la mise en réserve du fer, le cuivre de la céruloplasmine joue donc le rôle de donneur d'électron. Les réactions d'oxydoréduction sont le siège de grandes variations isotopiques des métaux en biologie [Anbar, 2004]. Ces réactions sont l'origine du fractionnement isotopique entre foie et sang [Albarède *et al.*, 2011]. Dès lors, la composition isotopique en cuivre et fer des érythrocytes des femmes se situe théoriquement sur une hyperbole de mélange entre foie et érythrocytes masculins (Figure 17.3.2).

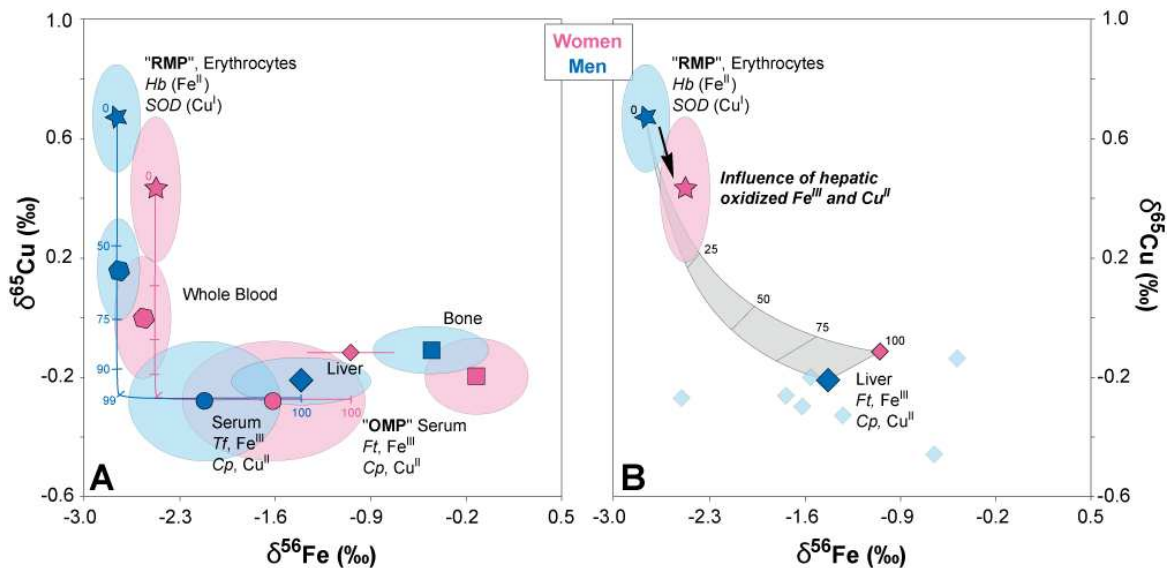


FIGURE 17.3.2: Composition isotopique des différents éléments du sang, du foie et des os pour le cuivre et le fer. (A) On remarque que ces organes et tissus se distribuent selon une hyperbole de mélange dont les extrémités sont caractérisées par un pôle de métaux oxydés (OMP) et un pôle réduit (RMP). (B) Les valeurs érythrocytaires des femmes se situent sur une hyperbole de mélange entre le foie et les érythrocytes masculins. Ft : ferritine, Hb : hémoglobine, Cp : céruloplasmine, Tf : transferrine.

En 2012, Hotz K., Krayenbuehl P.A. et Walczyk T. ont apporté des arguments solides à cette théorie. Ils ont de nouveau analysé du sang de patients atteints d'hémochromatose au cours de leur traitement par saignées (phlébotomie). Ils observent une dérive isotopique en moins de 4 semaines. La quantité de fer absorbée chaque jour représente moins de 1 ‰ du fer total contenu dans le corps. C'est pourquoi l'augmentation de cette

absorption ne peut pas engendrer une variabilité isotopique analytiquement détectable à l'échelle d'un mois [Hotz *et al.*, 2012]. Les auteurs ont donc conclu que la sollicitation du foie hépatique était bien à l'origine de la modification isotopique du sang et confirment la forte probabilité de l'existence d'un fractionnement isotopique lors du déstockage du fer sous forme de ferritine (Figure 17.3.3). Selon ces auteurs, la composition isotopique du sang pourrait être à la fois le reflet de l'absorption intestinale et des réserves hépatiques du fer (Figure 17.3.3).

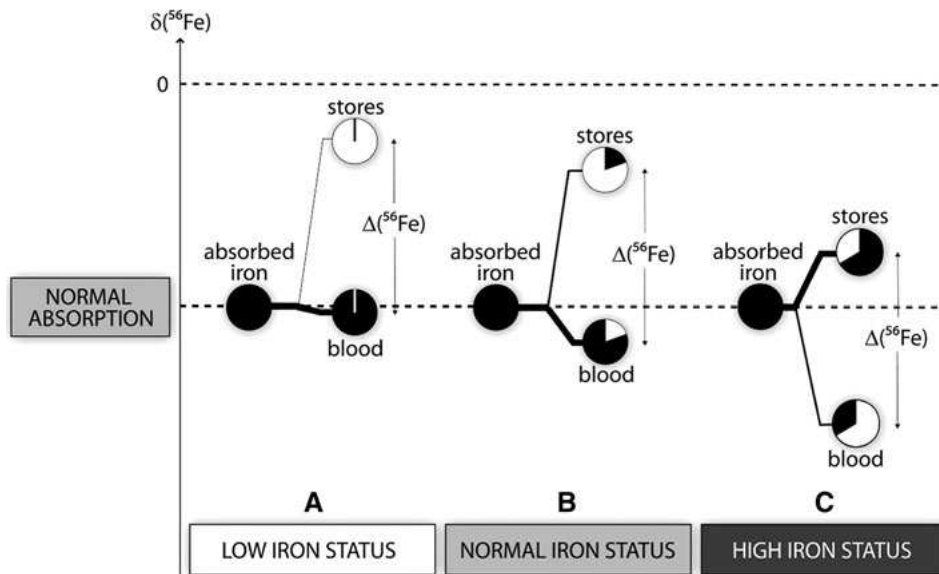


FIGURE 17.3.3: Répartition du fer corporel entre le sang et les réserves et ses conséquences sur la composition isotopique du sang. Figure : Hotz *et al.*, 2012.

En conclusion, la sollicitation des réserves de fer du foie semble être à l'origine de la différence isotopique homme/femme. Néanmoins, il se pourrait qu'à long terme, l'absorption intestinale et les pertes endométriales jouent un rôle non négligeable sur la composition isotopique en fer du sang. Ce qui manque cruellement à l'ensemble des travaux sur le métabolisme des isotopes des métaux est une quantification mathématique de chacune des hypothèses. Nous avons donc décidé de réaliser un modèle de boîtes nous permettant de tester plusieurs pistes explicatives et de prédire l'évolution du $\delta^{56}\text{Fe}$ en fonction du temps et d'événements tels que la ménopause ou la ménarche. Ce modèle a uniquement été réalisé pour le fer, son cycle étant mieux documenté. De plus, le cuivre excrété est réabsorbé de façon variable dans l'intestin (Linder et Hazam, 1996), ce qui rend la modélisation difficile.

Chapitre 18

Absorption intestinale ou sollicitation hépatique ? Réponse de la modélisation mathématique

Afin de prédire l'évolution dans le temps des rapports isotopiques et de tester numériquement les hypothèses à l'origine des différences isotopiques homme/femme, j'ai développé avec l'aide de Laurent Pouilloux, Francis Albarède et Vincent Balter un programme modélisant l'évolution du $\delta^{54\text{Fe}/56\text{Fe}}$ au cours du temps dans les érythrocytes du corps humain. Le choix de l'étude du $\delta^{54\text{Fe}}$ au lieu du $\delta^{56\text{Fe}}$ a été réalisé pour un aspect pratique lors de l'écriture du programme. Rappelons que le $\delta^{54\text{Fe}}$ s'exprime simplement par la relation $\delta^{54\text{Fe}} = -\delta^{56\text{Fe}}$.

18.1 Rappel sur le cycle du fer

Nous dresserons ici un bref rappel du métabolisme de fer dans le corps humain en précisant les appellations qui seront utilisées pour désigner les organes, tissus et échanges de fer entre réservoirs dans le modèle.

Le corps humain contient environ 4 g de fer, principalement répartis entre le foie (F) et les érythrocytes (E) [Andrews, 1999]. Il est absorbé au niveau intestinal ($F_{D \rightarrow P}$). Cette absorption est partielle : seulement 10 % des 10 à 20 mg de fer ingérés par jour sont absorbés [Andrews, 1999, Wessling-Resnick, 2000, Knutson et Wessling-Resnick, 2003]. Il permet cependant de compenser les pertes de fer quotidiennes provenant des menstruations ($F_{E \rightarrow M}$), des pertes de sang, des destructions d'érythrocytes ($F_{E \rightarrow F}$), de l'excrétion urinaire et de la desquamation ($F_{P \rightarrow U}$) ou encore de l'excrétion biliaire ($F_{L \rightarrow F}$) [Pollycove et Mortimer, 1961, Andrews, 1999, Wessling-Resnick, 2000, Knutson et Wessling-Resnick, 2003, Harvey *et al.*, 2005, Papanikolaou et Pantopoulos, 2005]. L'absorption quotidienne de fer est extrêmement faible comparée à la quantité totale de fer présente dans le corps (<1 ‰). Cependant, le

brassage du fer dans le corps humain est un processus rapide puisque les érythrocytes, qui contiennent 60 % du fer, sont recyclés tous les 120 jours. Ils sont détruits par les macrophages. Le fer est relibéré dans le plasma ($F_{E \rightarrow P}$) et transféré dans la moelle osseuse où se forment les nouveaux érythrocytes ($F_{P \rightarrow E}$). Le système fonctionne quasiment comme un système clos. Le fer alimentaire contribue à compenser les faibles destructions de fer érythrocytaire et est également stocké dans les cellules hépatiques en association avec la ferritine ($F_{P \rightarrow L}$), sous forme Fe^{3+} [Worwood, 1997]. Il existe également un flux quotidien de fer du foie vers le plasma ($F_{L \rightarrow P}$) résultant de la sollicitation des réserves et de la redistribution du fer provenant des cellules de Kuppfer, qui forment une partie des macrophages détruisant les érythrocytes [Collins *et al.*, 2010].

18.2 Paramétrage du modèle

18.2.1 Hypothèses de départ

Pour ce modèle de boîtes, nous avons uniquement considéré les organes et tissus jouant un rôle majeur dans le métabolisme du fer : le foie, l'organe de réserve, le plasma, assurant le transport et les érythrocytes, éléments d'utilisation du fer (Figure 18.2.1). Le fer entre dans le corps humain par l'alimentation et est excrété dans l'urine, les sucs intestinaux et les pertes de sang. Le corps est considéré comme étant à l'équilibre stationnaire pour les concentrations en fer de chaque réservoir. La masse des réservoirs internes du corps humain (foie, plasma, hématies) ne varie donc pas au cours du temps. On prend le cas d'individus vivant dans des zones tempérées. A partir des données de Walczyk et von Blanckenburg (2002) et Ohno *et al.* (2004) obtenues dans le sang humain chez les enfants et les adultes, on suppose que le $\delta^{54}Fe$ des érythrocytes ($\delta^{54}Fe_{RBC}$) est constant au cours du temps chez les hommes, alors qu'il est perturbé chez la femme lors de la ménarche et de la ménopause. L'idée est ici de réaliser un modèle d'évolution du $\delta^{54}Fe$ au cours du temps chez un individu non menstrué et de perturber ce système par l'apparition de menstruations et par leur arrêt.

18.2.2 Choix des modélisations

18.2.2.1 Perturbation du système par l'alimentation

Dans le but d'observer d'autres facteurs de variabilité isotopique que celui du sexe, nous avons réalisé un modèle, appelé « Modèle de l'alimentation », où la quantité de fer absorbé varie entre 1.2 et 2.2 mg/jr et la composition isotopique du régime alimentaire entre 0 et 3 ‰.

18.2.2.2 Perturbation du système par les menstruations.

Selon Harvey *et al.* (2005), les menstruations induisent une supplémentation quotidienne en fer de 0.15 à 0.70 mg par jour en fonction de l'abondance des pertes de sang, la moyenne se situant à 0.40 mg. Nous avons envisagé deux scénarios pour la compensation de ces pertes menstruelles.

Le premier modèle correspond à l'hypothèse de Walczyk et von Blanckenburg (2002), supposant que l'absorption intestinale des femmes compensent la perte de fer dans le sang menstruel. Le second modèle est celui d'une compensation de la perte de fer par les réserves du foie (Tableau 18.2). Dans la suite du texte, on surnommara ces modèles « *Modèle de l'absorption intestinale* » et « *Modèle de la sollicitation hépatique* ». Les modélisations seront testées pour une période d'évolution de 11 ans, qui correspond à l'ordre de grandeur en temps entre la ménarche et l'âge des jeunes femmes dont le sang a été analysé par Walczyk et von Blanckenburg (2002) et Albarede *et al.* (2011), ainsi qu'après une période de 38 ans qui correspond au nombre moyen d'années reproductives d'une femme.

18.2.2.3 Temps de remise à l'équilibre après la ménopause

Afin de tester le temps de remise à l'équilibre après la cessation des menstruations, nous avons simplement utilisé le modèle calibré pour une personne non menstruée de 70 kg et remplacé le $\delta^{54}\text{Fe}$ initial par différentes valeurs typiques de la gamme de valeur observée chez les femmes.

18.2.3 Définition des valeurs numériques du modèle de base

Les gammes de variation des tailles des réservoirs et de l'intensité des flux sont indiqués dans les tableaux 18.1 et 18.2. L'alimentation est considérée comme illimitée, l'influence de la taille des réservoirs de l'urine et des fèces n'influence en rien l'évolution du $\delta^{54}\text{Fe}$ et peut être fixée aléatoirement. Les données prises pour le modèle correspondent aux valeurs les plus fréquemment trouvées dans la littérature. Les compositions isotopiques de chacun de ces réservoirs correspondent aux moyennes de l'ensemble des $\delta^{54}\text{Fe}$ mesurés dans chaque type d'organes et tissus humains pour les deux sexes, à l'exception des érythrocytes. Pour ce dernier réservoir, seules les valeurs mesurées chez les hommes ont été prises, étant donné que l'on suppose qu'elles correspondent aux valeurs existant chez les femmes avant la ménarche. Les valeurs permettant de déterminer le $\delta^{54}\text{Fe}_{RBC}$ comprennent les données de sang total (Tableau 18.3).

Pour le régime alimentaire : le $\delta^{54}\text{Fe}$ des produits végétaux est compris entre 0 et 1.45 ‰, celui des produits marins entre 0.18 et 0.63 ‰ et celui des produits animaux terrestres (lait, viande, oeuf) entre 1.81 et 2.51 ‰. Le $\delta^{54}\text{Fe}$ doit donc être compris entre 0 et 3 ‰. Sa valeur doit être également très proche de celle des fèces, étant donné que plus de 90 % du fer alimentaire n'est pas absorbé. Il n'existe à l'heure actuelle que deux

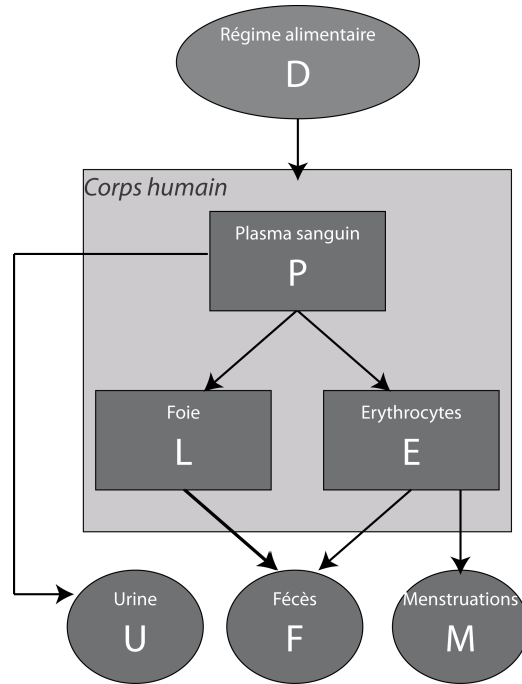


FIGURE 18.2.1: Schématisation des « boîtes » et des flux utilisés pour modéliser le cycle du fer dans le corps humain.

valeurs de $\delta^{54}\text{Fe}$ de fèces : 0.65 ‰ et 0.95 ‰. On sait également que chez le cochon nain, un très bon analogue métabolique de l'Homme, il existe une différence de 1.7 ‰ entre le sang total et le régime alimentaire [Hotz *et al.*, 2011]. L'ensemble de ces observations nous a amené à fixer la valeur du régime alimentaire de 1 ‰.

Les coefficients de partage sont encore inconnus à l'heure actuelle. Ils ont été identifiés par une méthode de Monte-Carlo¹. Nous avons pour cela supposé que $\alpha_{A \rightarrow B} = 1/\alpha_{B \rightarrow A}$ et qu'il n'y avait pas de fractionnement isotopique lors des pertes de sang, de la fabrication de l'urine et de la sécrétion intestinale étant donné qu'il n'y a pas de changement redox du fer entre les réservoirs et les flux dont ils proviennent. Les données isotopiques obtenues sur l'urine humaine et animale corroborent cette hypothèse [Walczyk et von Blanckenburg, 2005, Balter *et al.*, 2010]. Les coefficients de fractionnement entre chaque réservoir ont donc été estimés de telle manière à ce que la valeur initiale de chaque réservoir soit égale à la valeur de ce même réservoir dix ans plus tard. Concrètement, les coefficients de partage entre deux réservoirs contenant le fer sous le même état d'oxydation ont été fixés à 1 et les autres ont été estimés par tirages aléatoires. Les tirages aléatoires ont été réalisés jusqu'à ce que la combinaison des valeurs de coefficients de fractionnement implique une stabilité de la composition isotopique de

1. Une méthode de Monte Carlo est une méthode numérique qui utilise des tirages aléatoires pour réaliser le calcul d'une quantité déterministe.

Taille des réservoirs	M_{Fe}
Foie	1000
Erythrocytes	2400
Plasma	3

TABLE 18.1: Estimation de la quantité de fer contenue dans le foie, les érythrocytes et le plasma sanguin pour un homme adulte de 70kg. La masse de fer contenue dans les macrophages est comprise dans le réservoir « érythrocytes » en qualité d'érythrocytes non circulants. Références : Pollycove et Mortimer, 1961 ; Andrews, 1999 ; Papanikolaou et Pantopoulos, 2005 ; Walczyk et von Blanckenburg, 2005.

Flux	Modèle « de base »	Modèle « alimentation »	Modèle « absorption »	Modèle « sollicitation hépatique »
$F_{D \rightarrow P}$	1.3	1.2-2.2	1.3-2	1.3
$F_{E \rightarrow P}$	23.9	23.9	23.9	23.9
$F_{P \rightarrow E}$	24.4	24.4	24.4-25.3	24.4-25.3
$F_{P \rightarrow L}$	5	5	5	5
$F_{L \rightarrow P}$	4.3	4.3	4.3	4.3-5
$F_{E \rightarrow F}$	0.5	0.5	0.5	0.5
$F_{L \rightarrow F}$	0.7	0.7	0.7	0-0.7
$F_{P \rightarrow U}$	0.1	0-1	0.1	0.1
$F_{E \rightarrow M}$	0	0	0-0.7	0-0.7

TABLE 18.2: Flux entre réservoirs en mg/jr pour chaque modèle. Références : Hallberg et Rossander-Hulten, 1991 ; Andrews *et al.*, 1999 ; Pannel of micronutrients, 2001 ; Knutson et Wessling-Resnick, 2003 ; Hentze *et al.*, 2004 ; Harvey *et al.*, 2005 ; Papanikolaou et Pantopoulos, 2005 ; Walczyk et von Blanckenburg, 2005.

Réservoir	Méthode de calcul	$\delta^{54}Fe$ (‰)	Références
Erythrocytes	Moyenne homme RBC/sang total	2.74	Walczyk et von Blanckenburg, 2002, Ohno <i>et al.</i> , 2004 ; Albaredo <i>et al.</i> , 2011
Plasma	Moyenne deux sexes plasma	1.51	Albaredo <i>et al.</i> , 2011
Foie	Moyenne deux sexes	1.35	Jaouen <i>et al.</i> , en préparation ; Walczyk et von Blanckenburg, 2002
Régime alimentaire	Voir texte	1.00	Walczyk et von Blanckenburg, 2002

TABLE 18.3: Composition isotopique initiale de chaque réservoir

Coefficients de fractionnement α	Valeurs
$\alpha_{D \rightarrow P}$	0.9990997
$\alpha_{E \rightarrow P}$	1.0006202
$\alpha_{P \rightarrow E}$	0.9993801
$\alpha_{P \rightarrow L}$	1.0008577
$\alpha_{L \rightarrow P}$	0.9999143
$\alpha_{E \rightarrow F}$	1.000000
$\alpha_{L \rightarrow F}$	1.000000
$\alpha_{P \rightarrow U}$	1.000000
$\alpha_{E \rightarrow M}$	1.000000

TABLE 18.4: Coefficients de fractionnement déterminés par la méthode de Monte-Carlo

tous les réservoirs de fer du corps humain à l'échelle de plusieurs dizaines d'années.

18.2.4 Mise en équation

Le modèle ici présenté est à l'équilibre stationnaire en terme de masse. Pour chaque réservoir i , on a donc :

$$\frac{dM_i}{dt} = \sum_{j \neq i}^{j=1,n} F_{j \rightarrow i} - \sum_{j \neq i}^{j=1,n} F_{i \rightarrow j} = 0$$

où M_i est la masse de fer dans le réservoir i et $F_{i \rightarrow j}$ le flux de fer allant du réservoir i à j .

L'évolution du rapport R_i qui correspond au $^{54}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ dans le réservoir i peut être prédit par l'équation [Balter *et al.*, 2005].

$$\frac{dR_i}{dt} = - \left[\sum_{j \neq i}^{j=1,n} \frac{F_{i \rightarrow j} \alpha_{i \rightarrow j}}{M_i} - \sum_{j \neq i}^{j=1,n} \frac{F_{i \rightarrow j} - F_{j \rightarrow i}}{M_i} \right] R_i - \left[\sum_{j \neq i}^{j=1,n} \frac{F_{j \rightarrow i} \alpha_{j \rightarrow i}}{M_i} \right] R_j$$

où $\alpha_{i \rightarrow j}$ est le coefficient de fractionnement du rapport $^{54}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ entre le réservoir i et j .

Etant donné que l'on a fixé l'hypothèse d'un équilibre des flux entrants et sortants pour chaque réservoir, on obtient :

$$\frac{dR_i}{dt} = - \left[\sum_{j \neq i}^{j=1,n} \frac{F_{i \rightarrow j} \alpha_{i \rightarrow j}}{M_i} \right] R_i - \left[\sum_{j \neq i}^{j=1,n} \frac{F_{j \rightarrow i} \alpha_{j \rightarrow i}}{M_i} \right] R_j$$

18.3 Résultats des modélisations numériques

18.3.1 Modélisation pour un homme de 70 kg : influence du régime alimentaire

Plus la quantité de fer absorbée par un homme de 70 kg est importante, plus le $\delta^{54}\text{Fe}$ de ses érythrocytes tend à diminuer. Cependant, cette tendance est quasiment négligeable au regard de la variabilité engendrée par la composition isotopique du régime alimentaire. En effet, une variation du $\delta^{54}\text{Fe}$ du régime alimentaire entre 0 et 3 ‰ engendre en l'espace de 11 ans un décalage isotopique du même ordre de grandeur sur le $\delta^{54}\text{Fe}$ érythrocytes (Figure 18.3.1). Il s'agit ici d'une corrélation positive.

18.3.2 Modélisation pour une femme menstruée de 70 kg

18.3.2.1 Modèle de « l'absorption intestinale »

Lors du modèle d'absorption intestinale, l'augmentation de la quantité de fer absorbée équivalait celle des pertes menstruelles. Le modèle teste une variation de ce flux comprise entre 0 et 0.7 mg. Étant donné que les femmes présentent des réserves hépatiques plus faibles que les hommes, la masse de fer dans le foie a été fixée en parallèle comme une variable, allant de 0 à 1000 mg. La figure 18.3.2 présente les valeurs de $\delta^{54}\text{Fe}$ dans les érythrocytes de femmes après deux périodes d'évolution : 11 ans (Figure 18.3.3a) et 38 ans (Figure 18.3.3b) après l'apparition des menstruations. Ces valeurs ($\delta^{54}\text{Fe}_{RBC}^{final}$) sont une fonction de la masse de réserves hépatiques (M_L) et de l'intensité des pertes menstruelles.

On observe un enrichissement isotopique en ^{56}Fe quelle que soit la masse du foie, cet enrichissement allant jusqu'à 0.3 ‰ pour un foie sans réserves de fer et un flux menstruel de 0.7 mg/jour (Figure 18.3.2). Le flux moyen menstruel de 0.40 ‰ correspond à un fractionnement isotopique de 0.2 ‰ que ce soit pour une période d'évolution de 4000 jours (environ 11 ans) ou de 38 ans.

18.3.2.2 Modèle de « la sollicitation hépatique »

Pour le modèle de la sollicitation hépatique, la variation du flux menstruel et de M_L va également de 0 à 0,7 mg/j et 0 à 1000 mg respectivement (Figure 18.3.3). Le $\delta^{54}\text{Fe}_{RBC}^{final}$ est également représenté comme une fonction de ces deux paramètres par un graphique de contour. Cette fois-ci, l'enrichissement isotopique en ^{56}Fe va jusqu'à 0.65 ‰ pour un foie sans réserves de fer et un flux menstruel de 0.7 mg/jour. Le flux moyen menstruel de 0.40 mg/jour correspond à un fractionnement isotopique de l'ordre de 0.35 ‰, que ce soit pour une période de 11 ou 38 ans.

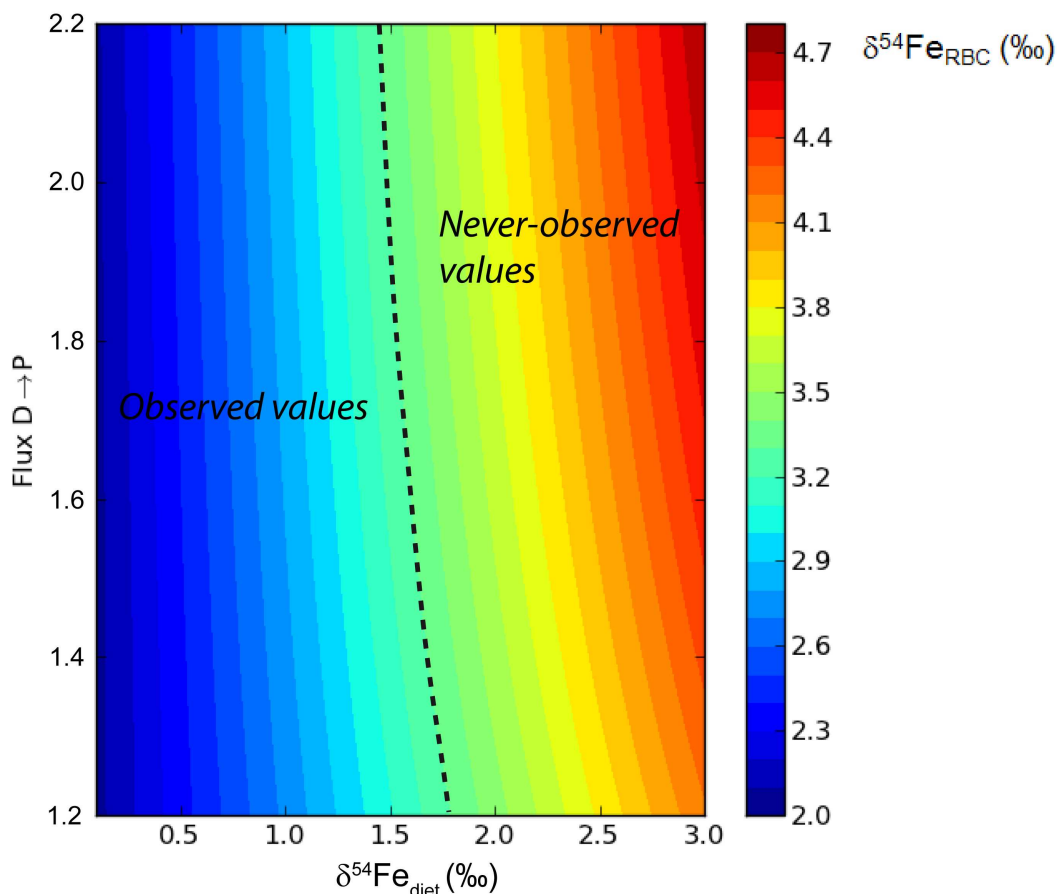


FIGURE 18.3.1: $\delta^{54}\text{Fe}$ dans les RBC d'un homme de 70 kg en fonction de la composition isotopique de son alimentation et de la quantité de fer absorbée par jour pendant 4000 jours (≈ 11 ans). La ligne pointillée délimite la zone correspondant aux valeurs observées dans la littérature dans les érythrocytes humains « observed values » et celle correspondant aux valeurs n'ayant jamais été observées « never observed values ». Flux $D \rightarrow P$ désigne le flux de fer entre le régime alimentaire et le plasma.

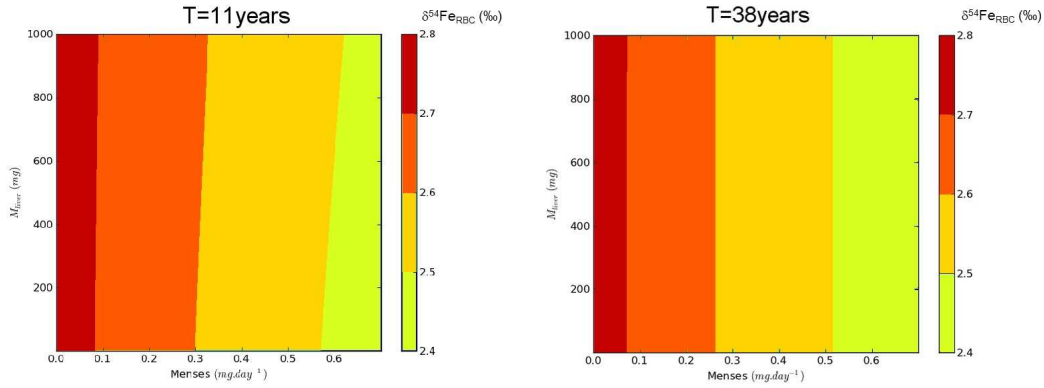


FIGURE 18.3.2: $\delta^{54}\text{Fe}$ des érythrocytes en fonction du flux périodique et de la quantité de réserves de fer hépatique après une période d'évolution de 11 ans (à gauche) et 38 ans (à droite), dans le cadre du modèle de « l'absorption intestinale ».

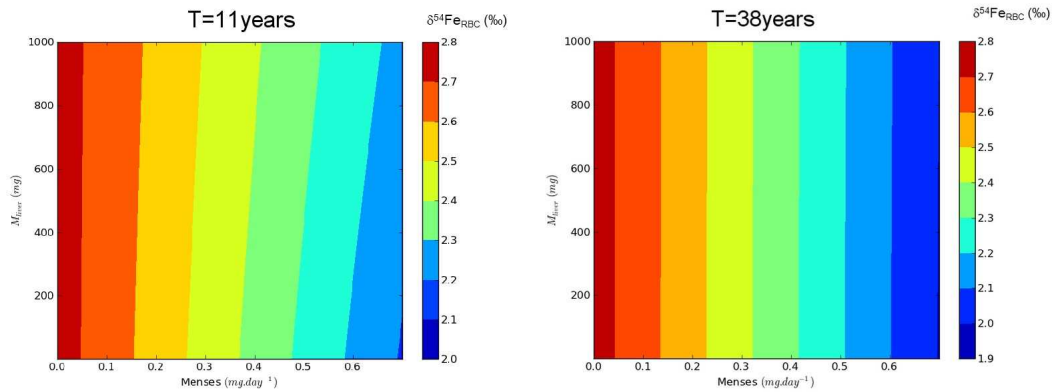


FIGURE 18.3.3: $\delta^{54}\text{Fe}$ des érythrocytes en fonction du flux périodique et de la quantité de réserves de fer hépatique après une période d'évolution de 11 ans (à gauche) et 38 ans (à droite), dans le cadre du modèle de « la sollicitation hépatique ».

18.3.3 Évolution du rapport isotopique du sang après la ménopause

Pour modéliser l'évolution du $\delta^{54}\text{Fe}$ du sang après la ménopause, nous avons considéré six cas différents afin de tenir compte de la variabilité isotopique du sang des femmes après la ménopause. Pour cela, nous avons simplement choisi différentes valeurs typiques de la gamme féminine et réaliser la modélisation de base (sans menstruations) avec ces valeurs pour $\delta^{54}\text{Fe}_{RBC}$ initiaux. On s'aperçoit que la valeur à l'équilibre (2.74 ‰) n'est atteinte qu'au bout d'une vingtaine d'années (Figure 18.3.4). Au bout de 10 ans, les $\delta^{54}\text{Fe}$ sanguins compris entre 2.0 et 2.5 ‰ à la ménopause auront tous atteint la gamme de valeurs typiquement masculines (définie par rapport à la moyenne des valeurs masculines \pm un écart-type. Étendue de la gamme : 2.56 à 2.92 ‰).

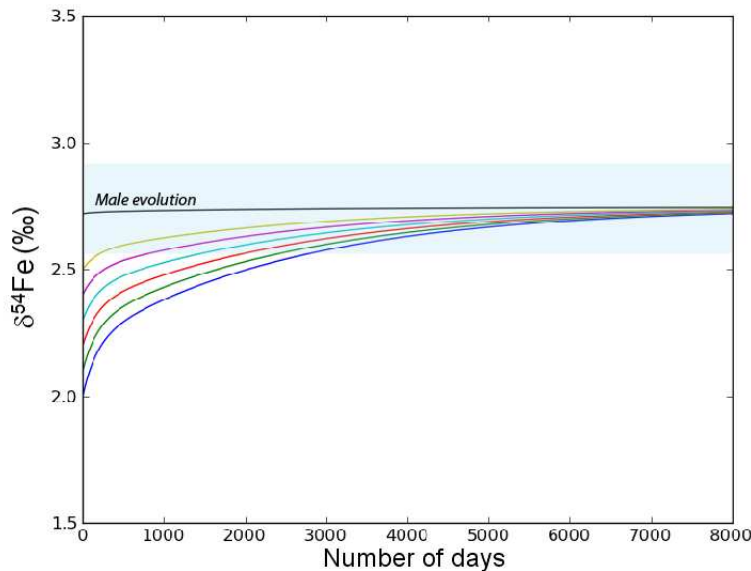


FIGURE 18.3.4: Évolution du $\delta^{54}\text{Fe}_{RBC}$ après la ménopause en fonction du temps. Plusieurs valeurs initiales sont représentées. En noir, on observe l'évolution de la composition isotopique du sang d'un homme pour la même gamme de temps. La zone bleue claire correspond à la gamme de valeurs de $\delta^{54}\text{Fe}$ typiquement masculine, c'est à dire la moyenne \pm un écart-type. Chaque couleur représente une modélisation pour une valeur particulière du $\delta^{54}\text{Fe}_{RBC}$ à la ménopause.

18.4 Discussion

18.4.1 Sollicitation hépatique ou absorption intestinale ?

Les modèles de « l'absorption intestinale » et de la « sollicitation hépatique » prédisent tous les deux un enrichissement isotopique en ^{56}Fe dans le sang des femmes au cours du temps. En ce qui concerne les données mesurées directement à partir du sang, le fractionnement isotopique entre homme et femme est du même ordre de grandeur dans les deux études publiées à ce jour : 0.26 ‰ dans la population lyonnaise [Albarède *et al.*, 2011] et 0.27 ‰ pour la population zurichoise. Cette valeur est comprise entre celles prédites par nos modèles pour une perte menstruelle moyenne (0.40 mg/jour) et une période d'évolution de 10 ans. Le modèle de l'absorption la sous-estime et celui de la sollicitation hépatique la surestime. Les ordres de grandeur sont cependant très similaires. En principe, on peut donc supposer que chacun des modèles constitue une hypothèse fiable pour rendre compte de la différence isotopique sexuelle. Néanmoins, on s'aperçoit que le modèle de la sollicitation hépatique rend compte de la diversité des compositions isotopiques du sang féminin, avec des $\delta^{54}\text{Fe}$ pouvant aller jusqu'à 0.7 ‰ en l'espace de 38 ans quand la variabilité observée avec le modèle de l'absorption intestinale plafonnera à 0.35 ‰.

Quel que soit le modèle, on prédit également une influence de l'abondance des pertes menstruelles sur la composition isotopique. Parmi les 10 Lyonnaises ayant répondu à un questionnaire, la corrélation entre l'abondance des flux menstruels et le $\delta^{54}\text{Fe}$ du sang ne se vérifie pas. Cependant, on sait que l'appréciation de ce flux est très subjective [Fraser *et al.*, 1984]. Ces données préliminaires nécessitent donc une vérification par une étude quantitative.

18.4.2 Evolution isotopique après la ménopause

Le renouvellement isotopique du fer dans le sang humain est un processus lent. D'après le modèle, il faut attendre plus d'une vingtaine d'années après la ménopause avant d'observer des valeurs proches du $\delta^{54}\text{Fe}$ à l'équilibre. Au bout de 5 ans, seules les femmes ayant un $\delta^{54}\text{Fe}$ supérieur à 2.3 ‰ à l'âge de la ménopause auront atteint le champ des valeurs typiquement masculines (Figure 18.3.4) . En cela, le modèle corrobore les observations réalisées chapitre 12, où les femmes ménopausées depuis moins de 5 ans présentaient des valeurs caractéristiques des femmes menstruées. Si l'on représente le $\delta^{54}\text{Fe}$ de ces femmes en fonction du nombre de jours s'étant écoulés depuis leur ménopause (Figure 18.4.1), on remarque cependant que 42 % des valeurs sont sur-estimées et 20 % des valeurs sous-estimées. Cela peut s'expliquer par plusieurs facteurs :

- la variabilité du $\delta^{54}\text{Fe}$ à l'équilibre en fonction des individus, celle du modèle étant prise arbitrairement à 2.74 ‰ .
- la variabilité de la taille des réservoirs du fer, qui modifie les vitesses de renouvellement

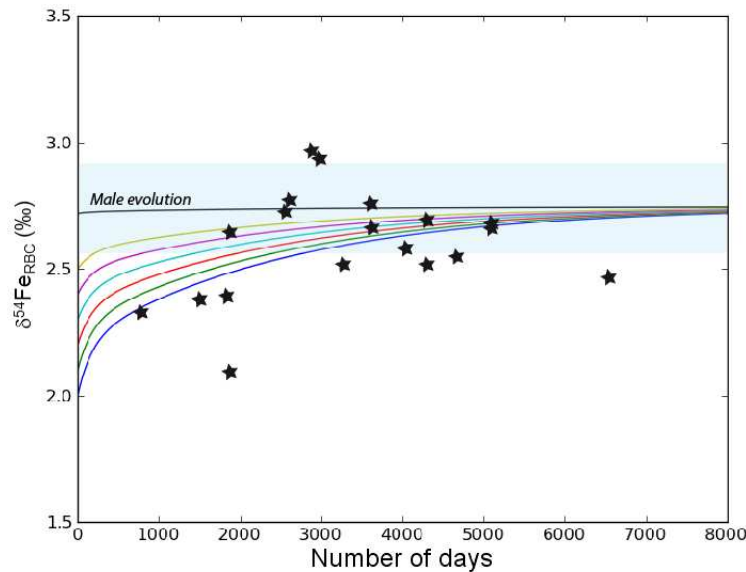


FIGURE 18.4.1: Comparaison entre le modèle et la réalité : les étoiles représentent le $\delta^{54}\text{Fe}$ des femmes ménopausées étudiées chapitre 12 en fonction du nombre de jour entre leur ménopause et le prélèvement sanguin.

- l'absence de la prise en compte par le modèle de la reconstitution progressive des réserves hépatiques en fer après la ménopause.
- l'influence de l'alimentation

Les trois premiers facteurs sont inhérents au choix des conditions de modélisation. Par contre, l'influence de l'alimentation peut être discutée.

18.4.3 Influence de la composition isotopique de l'alimentation

D'après notre modèle, l'alimentation, et plus exactement la composition isotopique de l'alimentation, est le facteur majeur de la variabilité isotopique du corps humain. Une alimentation variant entre 0 et 3 ‰ est susceptible d'engendrer une variabilité isotopique de la même ampleur (Figure 16.3.3). On remarque que les valeurs observées chez les hommes habitants les zones tempérées, sont comprises entre 2.3 ‰ et 3.2 ‰. Cela suppose donc que le $\delta^{54}\text{Fe}$ de l'alimentation humaine n'excède pas 1.7 ‰, ce qui semble pertinent au regard de la composition isotopique des végétaux, des produits marins et animaux terrestres [Walczyk et von Blanckenburg, 2005].

Le fait que le $\delta^{54}\text{Fe}$ de l'alimentation engendre une plus grande variabilité isotopique que ne peuvent le faire les menstruations pose plusieurs questions :

- La différence isotopique homme/femme ne pourrait-elle pas simplement résulter d'une plus grande proportion de produits animaux terrestres consommée par les

hommes ?

- Pourquoi n’y a-t-il pas de corrélation entre $\delta^{54}\text{Fe}$ et $\delta^{15}\text{N}$ alors que ces deux systèmes isotopiques sont sensibles à la proportion de produits marins consommés ?
- Le choix des paramètres de modélisation ne biaise-t-il pas l’influence de l’alimentation ?

Un certain nombre d’éléments de réponses peuvent d’ores et déjà être apportés. La proportion de protéines animales et végétales ne diffère pas entre le régime alimentaire des hommes et des femmes en France et en Suisse. Par contre, fractionnement isotopique prenant place lors de l’absorption intestinale n’est pas de la même ampleur s’il s’agit de viande animale ou de végétaux. Cette différence n’est pas prise en compte dans le modèle. Elle pourrait donc engendrer un biais sur l’appréciation de l’impact de l’alimentation sur le $\delta^{54}\text{Fe}$ corporel. Cette explication justifierait également l’absence de relation entre $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{54}\text{Fe}$. De plus, il n’a pas non plus été observé de corrélation entre la consommation de produits animaux terrestres et le $\delta^{54}\text{Fe}$ des douze Lyonnais. L’alimentation est probablement un facteur de variabilité isotopique surestimé par ce modèle.

18.4.4 Conclusion

Le modèle mathématique présenté ici va dans le sens d’une différence isotopique sexuelle liée à une plus forte sollicitation des réserves hépatiques pour les femmes menstruées. L’absorption intestinale peut cependant participer à ce fractionnement isotopique, tel que le suggèrent Hotz *et al.* (2012). L’évolution du $\delta^{54}\text{Fe}$ des érythrocytes est prédite comme étant un processus lent, conformément aux observations exposées chapitre 12. Néanmoins, le résultat du modèle contredit les observations de la littérature en un point : la composition isotopique de l’alimentation semble être un facteur majeur de variabilité isotopique, alors que les travaux de cette thèse mettent plutôt en avant le sexe, l’âge et le métabolisme de base. A l’avenir, il convient donc de réaliser une étude du $\delta^{54}\text{Fe}$ isotopique sur des individus dont le $\delta^{54}\text{Fe}$ de l’alimentation est contrôlé. Il serait également nécessaire de quantifier les fractionnements isotopiques lors de l’absorption intestinale en fonction du type d’aliment consommé (présence ou non de fer hémique), afin de restreindre les biais de ce modèle.

Conclusion et perspectives

Dans l'ensemble, les résultats obtenus au cours de cette thèse confirment l'intérêt de l'analyse des isotopes des métaux de transition dans les restes humains, qu'il s'agisse du fer, du cuivre et du zinc. Les facteurs de variations sont liés à des paramètres biologiques cruciaux en anthropologie : l'âge de l'individu, son métabolisme propre, son sexe, son alimentation ou encore son statut hormonal. Devant cette énumération de facteurs de variation, on comprend également la complexité du déchiffrement du message isotopique du corps humain.

De manière plus détaillée, la composition isotopique des os s'est révélée différente, en moyenne, entre les os des hommes et des femmes pour l'élément fer et l'élément cuivre. Il est apparu que les os enregistrent la signature isotopique du sang. En revanche, cette différence est absente de l'émail dentaire des troisièmes molaires car l'amélogénèse se déroule généralement avant l'apparition des menstruations. Cela constitue la principale limite pour l'application de la détermination du sexe des restes humains anciens à partir du $\delta^{56}\text{Fe}$ et $\delta^{65}\text{Cu}$. Cependant, nous avons constaté une réponse isotopique aux changements métaboliques plus rapide dans le cas du cuivre que celui du fer. Ce constat ouvre la voie à la détection de la précocité de la ménarche chez les populations archéologiques à partir de l'analyse du $\delta^{65}\text{Cu}$ de l'émail dentaire. Enfin, l'étude du sang de femmes âgées a révélé l'occurrence d'un décalage isotopique pour le cuivre à la ménopause, suivi plus tardivement par celui du fer. Le sang de ces femmes est donc caractérisé par une signature isotopique intermédiaire entre celui des hommes et des femmes menstruées.

Les analyses réalisées sur les populations actuelles ont permis de mettre en lumière différents facteurs de variation du $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ et $\delta^{66}\text{Zn}$. L'étude de la population yakoute a montré une corrélation entre la composition isotopique en cuivre et en zinc avec l'âge des individus, probablement liée à l'accumulation du ^{63}Cu et ^{66}Zn au cours de la vie. Cette tendance ne se retrouve pas dans la population française. Le métabolisme de base est en effet moins élevé chez les volontaires français qui vivent dans des zones tempérées. De plus, leurs régimes alimentaires, non soumis aux contraintes de l'importation, sont diversifiés. Mais le résultat majeur de cette étude reste la mise en évidence d'une originalité isotopique en cuivre et en zinc du sang des volontaires yakoutes.

Enfin, un modèle mathématique de boîtes a permis de tester les différentes hypothèses et interprétations élaborées au cours de cette thèse. Ses résultats confirment l'idée que la sollicitation hépatique du foie est responsable de forts $\delta^{56}\text{Fe}$ et faibles $\delta^{65}\text{Cu}$ sanguins

observés de manière récurrente chez les femmes. Nous estimons donc que la sollicitation hépatique est à l'origine de la différence isotopique en cuivre et en fer entre les sexes.

Ce travail de thèse a été inspiré par l'étude de Walczyk et von Blanckenburg sur les isotopes du fer dans le sang humain. Étonnamment, les isotopes de l'élément cuivre semblent offrir des perspectives bien plus prometteuses pour l'anthropologie. Leur renouvellement dans le corps humain étant plus rapide, ils possèdent une meilleure réactivité face aux bouleversements hormonaux que sont la ménarche et la ménopause. La dépendance de leur variabilité isotopique en fonction du sexe peut également être perçue dans les os corticaux ou spongieux, ce qui n'a pas été le cas des isotopes du fer. De plus, l'accumulation du ^{63}Cu dans le corps humain au cours du temps fait du cuivre un élément connaissant un « vieillissement isotopique ». Le fer, quant à lui, apparaît insensible à l'alimentation, au métabolisme de base et au vieillissement. Il possède néanmoins une forte inertie isotopique, ce qui lui confère l'avantage de conserver la signature isotopique féminine plusieurs années après la ménopause.

Les suites de ce travail peuvent être envisagées d'un point de vue biomédical. Le lien entre fractionnement isotopique, état redox et métabolisme des métaux fait naître l'espoir de nouveaux traceurs des dérégulations des cycles métaboliques du fer, du cuivre et du zinc dans des pathologies telles que l'anémie, l'hémochromatose, la maladie de Wilson ou les cancers. Les perspectives de ce travail de thèse résident également dans des aspects anthropologiques :

A court terme, il convient d'étudier précisément l'influence de l'alimentation sur la composition isotopique des os et du sang des mammifères. En effet, le lien entre isotopie des métaux de transition, régime alimentaire et lieu de vie n'a pas été complètement élucidé. C'est pourtant une étape nécessaire afin de distinguer chaque facteur susceptible de modifier les abondances naturelles des isotopes des métaux de transition. D'autre part, cela pourrait contribuer à faire des métaux de transition un nouvel outil isotopique de reconstitution du régime alimentaire.

A moyen terme, l'analyse de restes humains de populations circumpolaires permettrait de déterminer si les compositions isotopique du cuivre et du zinc correspondent à une signature isotopique du stress thermique. Si tel était le cas, on pourrait alors envisager des études sur des restes de Néandertal et les comparer à ces résultats. En effet, dans les publications scientifiques, le métabolisme de base de l'Homme de Néandertal est généralement assimilé à celui des populations circumpolaires, sans qu'aucune observation ne permettent de l'affirmer.

Enfin, afin de vérifier le potentiel des isotopes du cuivre comme traceur de l'âge de la ménarche dans les populations passées, l'étude systématique du $\delta^{65}\text{Cu}$ de l'émail dentaire dans diverses populations semble être une piste à exploiter. Il s'agit là d'un travail de longue haleine, mais qui, en cas de succès, marquerait un apport majeur de la géochimie à l'anthropologie.

Glossaire

BIOAPATITE : Apatite biologique constituant la partie minérale des os, de l'émail dentaire et de la dentine.

BIOMINÉRAL : Minéral formé dans ou par un organisme vivant.

CUSPIDE : Sommet des dents.

ÉLÉMENTS FIGURÉS : Cellules et plaquettes du sang.

ENDOMÈTRE : Muqueuse interne de l'utérus.

ENTÉROCYTE : Cellule de la paroi intestinale.

ÉRYTHROCYTE : Cellule du sang anuclée (chez les mammifères) contenant l'hémoglobine. Également appelée hématie ou globule rouge.

HÈME : Cofacteur contenant un atome de fer au sein d'une structure dite porphyrique.

HÉPATOCTE : cellules du foie.

MÉNARCHE : Âge auquel débute les menstruations.

MÉTABOLISME DE BASE : Besoins énergétiques minimaux d'un organisme au repos. En anglais on distingue le basal metabolic rate (métabolisme de base) du resting metabolic rate (métabolisme au repos). Le premier requiert le repos total de l'organisme et l'absence de stimulation du système nerveux sympathique quand le deuxième ne nécessite pas des conditions de repos aussi strictes.

PODZOL : Type de sol lessivé, très peu fertile, qui se forme dans les régions froides et humides.

Annexes

Annexe A

Articles annexes :

A.1 Article : « *Isotopic evidence of unaccounted for Fe and Cu erythropoietic pathways* »

L'article suivant a été publié dans Metallomics en 2011. (doi :10.1039/C1MT00025J)

Cite this: *Metallomics*, 2011, **3**, 926–933

www.rsc.org/metallomics

PAPER

Isotopic evidence of unaccounted for Fe and Cu erythropoietic pathways†

Francis Albarède,* Philippe Telouk, Aline Lamboux, Klervia Jaouen and Vincent Balter

Received 24th February 2011, Accepted 4th July 2011

DOI: 10.1039/c1mt00025j

Despite its potential importance for understanding perturbations in the Fe–Cu homeostatic pathways, the natural isotopic variability of these metals in the human body remains unexplored. We measured the Fe, Cu, and Zn isotope compositions of total blood, serum, and red blood cells of ~50 young blood donors by multiple-collector ICP-MS after separation and purification by anion exchange chromatography. Zinc shows much less overall isotopic variability than Fe and Cu, which indicates that isotope fractionation depends more on redox conditions than on ligand coordination. On average, Fe in erythrocytes is isotopically light with respect to serum, whereas Cu is heavy. Iron and Cu isotope compositions clearly separate erythrocytes of men and women. Fe and Cu from B-type men erythrocytes are visibly more fractionated than all the other blood types. Isotope compositions provide an original method for evaluating metal mass balance and homeostasis. Natural isotope variability shows that the current models of Fe and Cu erythropoiesis violate mass balance requirements. It unveils unsuspected major pathways for Fe, with erythropoietic production of isotopically heavy ferritin and hemosiderin, and for Cu, with isotopically light Cu being largely channeled into blood and lymphatic circulation rather than into superoxide dismutase-laden erythrocytes. Iron isotopes provide an intrinsic measuring rod of the erythropoietic yield, while Cu isotopes seem to gauge the relative activity of erythropoiesis and lymphatics.

Introduction

Although still at the exploratory stage, the study of natural isotopic variability of metallic elements may help identify some critical aspects of the homeostatic regulation of metals. Fractionation of stable isotopes is a quantum mechanical effect, rooted in the Heisenberg uncertainty principle, which requires that the lowest level of vibrational energy of the compound is non-vanishing. The existence of zero-point energy favors the concentration of heavy isotopes in the tighter bonds. The development of multi-collector inductively-coupled plasma source mass spectrometry (MC-ICP-MS) has made it possible to assess the isotopic variability of metals, such as Cu, Zn,^{1,2} and Fe.³ Isotope fractionation in excess of the permil level has been observed for Fe isotopes within the human body⁴ and for Zn isotopes among the organs and the body fluids of sheep.⁵ Biological fractionation of metal isotopes often exceeds the range of isotope fractionation in inorganic natural processes. The metal-rich organs, notably the liver, are depleted in the light isotopes of Fe and Zn isotopes with respect to blood and skeletal muscle. In the iron overload

disease known as hemochromatosis, the ⁵⁶Fe/⁵⁴Fe isotope ratio of blood correlates with iron accumulation.⁶ Although it is still to be understood whether such a strong fractionation of metal isotopes results from kinetic effects or from different coordinations in biological media, *e.g.*, ferritin *versus* hemoglobin for Fe, there is strong incentive to map isotopic effects in organs and in blood. The present investigation reports the Fe, Cu, and Zn isotope compositions of total blood, serum, and red blood cells from ~50 young anonymous blood donors and attempts to relate the isotopic variability to the available gender and blood-group information.

Experimental

Reagents

Macroporous anion-exchange resin AGMP-1 100–200 mesh were purchased from Biorad Laboratories. Concentrated technical HCl and HNO₃ provided by Merck 64271 Darmstadt, Germany, were redistilled at low temperature in Pico-trace fluoropolymer stills. H₂O₂ 30% Suprapur was purchased from Merck. Demineralized water is produced in a Millipore Synergy system.

Procedures

The samples were provided as congealed splits by the Etablissement Français du Sang in Lyon. All experiments

Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard, and CNRS, 46 allée d'Italie, 69007 Lyon, France.

E-mail: albarede@ens-lyon.fr; Fax: +33 47272 8677;

Tel: +33 47272 8414

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c1mt00025j

Table 1 Summary of analytical conditions

Instrument	Agilent 7500 cx	Nu500 HR	Nu1700
RF power	1500 W	1350 W	1350 W
External flow	15 L min ⁻¹	14 L min ⁻¹	14 L min ⁻¹
Nebuliser gas flow rate	1.1 L min ⁻¹	1 L min ⁻¹	1 L min ⁻¹
Integration time per isotope	0.1 s	10 s per cycle	10 s per cycle
Total integration time	120 s	2 × 20 cycles	2 × 20 cycles
Collision/reaction gas	He	N/A	N/A
Flow rate	6 mL min ⁻¹	N/A	N/A
Nebuliser	GE AR351FM04	GE AR351FM01	GE AR351FM02
DSN neb pressure	N/A	30 psi	31 psi
Sample cone	Ni	Ni	Ni
Skimmer cone	Ni	Ni	Ni

were performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines. An aliquot of about 0.5 mL of each sample was mineralized in PFA vessels at 130 °C using a mixture of HNO₃ and H₂O₂ and evaporated twice in concentrated HCl at 120 °C in a laminar flow hood. The metals analyzed here were separated on quartz columns containing 3 mL macroporous anion-exchange resin following the technique of Maréchal *et al.*² Samples were loaded onto the columns in 7 N HCl and rinsed in 10 mL 7 N HCl + H₂O₂ 0.001%. Copper was eluted by 20 mL 7 N HCl + H₂O₂ 0.001%, iron by 10 mL 2 N HCl + H₂O₂ 0.001%, and zinc by 10 mL 0.5 N HNO₃. Each fraction was evaporated again, converted to nitrates and taken up in 0.05 N HNO₃ prior to analysis.

Cu and Zn isotope compositions were determined on a Nu HR multiple-collector inductively-coupled plasma mass spectrometer (MC-ICP-MS) using a wet plasma, while Fe was run on a large radius Nu 1700 MC-ICP-MS operated at a

resolution of 4500 as dry plasma after desolvation in a Nu DSN. Free aspiration mode and a sample uptake rate of 100 µL min⁻¹ were used throughout. Gas flow instrumental mass fractionation was controlled both by dual standard-sample bracketing and addition of an external standard (Cu to Zn samples and Zn to Cu samples). The isotope reference solutions used were NIST 976 (Cu), JMC 3-0749 L (Zn), and IRMM 014 (Fe). The precision (external reproducibility, two-sigmas) on the isotopic ratios is 0.05‰. Na, K, Mg, Ca, Fe, Cu and Zn concentrations were determined on an Agilent 7500 CX quadrupole ICP-MS. The run conditions are listed in Table 1.

Results

The complete dataset is reported in Table A1 of ESI.† Average values of isotope compositions and Student-*t* are given in Table 2. The δ notation indicating the deviation in parts per 1000 of a particular isotopic ratio, here ⁵⁶Fe/⁵⁴Fe, ⁶⁶Zn/⁶⁴Zn,

Table 2 Average isotope compositions in delta units (permil or ‰) and 95% range (2 s) for the isotope compositions of Zn, Cu, and Fe in the serum, erythrocytes, and total blood of 49 blood donors. Typical analytical uncertainties are 0.05‰. Men–women comparison: *t* is the Student–Fisher parameter and *p* the probability that the two sets are identical

	<i>n</i>	av δ ⁶⁶ Zn	2 s	av δ ⁶⁵ Cu	2 s	av δ ⁵⁶ Fe	2 s	Fe/Cu	2 s
<i>Serum</i>									
Women	28	0.18	0.28	-0.24	0.36	-1.35	0.93	1.06	0.96
Men	21	0.16	0.10	-0.28	0.40	-1.71	1.55	1.83	1.32
All	49	0.17	0.26	-0.26	0.40	-1.51	1.24	1.44	1.37
Outliers	3			2		0			
<i>t</i> men/women		0.78		1.06		2.11		-3.30	
<i>p</i> value		0.45		0.30		0.05		2.10 ⁻⁵	
<i>Erythrocytes</i>									
Women	28	0.46	0.17	0.46	0.47	-2.49	0.39	1317	578
Men	21	0.43	0.45	0.67	0.36	-2.72	0.36	1410	396
All	49	0.44	0.33	0.56	0.5	-2.59	0.47	1361	504
Outliers	1			2		3			
<i>t</i> men/women		0.86		-3.87		4.44		-0.92	
<i>p</i> value		0.39		0		0		0.21	
<i>Total blood</i>									
Women	28	0.41	0.16	0.01	0.16	-2.58	0.18	409	254
Men	21	0.39	0.41	0.17	0.33	-2.72	0.4	648	180
All	49	0.4	0.37	0.09	0.32	-2.65	0.38	500	327
Outliers	3			2		3			
<i>t</i> men/women		1		-2.88		2.83		-5.36	
<i>p</i> value		0.32		0.02		0		3.10 ⁻⁹	
Liver ^a		-1.13		-0.4		-1.63		17.43	23.08
<i>t</i> serum/erythrocytes									
Women		-12.76		-17.48		12.9		-27.64	
Men		-9.28		-23.24		7.91		-33.30	
All		-15.61		-24.84		14.63		-36.86	

Outliers have been eliminated using a 99% probability *t*-filter. ^a Data from Jaouen *et al.* (submitted).

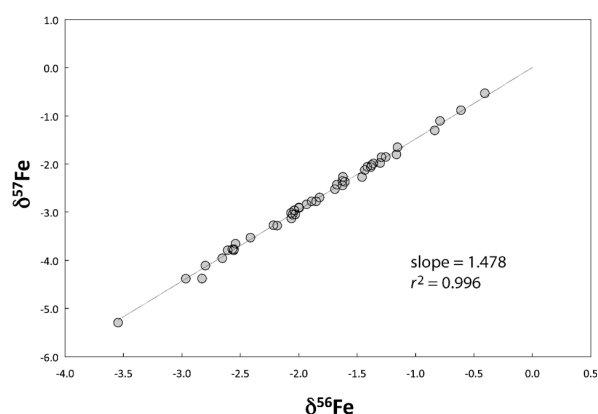


Fig. 1 Isotopic variations of $^{57}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ and $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ follow a mass-dependent fractionation relationship with a slope not significantly different from the theoretical value of $\ln(57/54)/\ln(56/54) \approx 1.487$.

and $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$, with respect to a reference material, is used throughout.

The mass-dependent character of isotope fractionation, which has been repeatedly documented for Zn (*e.g.*, ref. 2), is demonstrated here for Fe in Fig. 1 by the linear relationship between $\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{57}\text{Fe}$. The slope of the straight-line is, as expected, of $\sim 3/2$, *i.e.*, within error bars equal of the theoretical value of $\ln(57/54)/\ln(56/54) = 1.487$.

The Fe, Cu, and Zn concentrations are consistent with literature values.⁷ Average values are listed in Table 2 together with data averages on liver tissue discussed elsewhere (Jaouen *et al.*, submitted). Mass balance applied to Fe concentration data indicates that RBC makes up ~ 50 percent of the blood volume. Mass balance applied to the Mg/Fe (or Ca/Fe) and Mg/Cu ratios also shows that RBC accounts for most ($99.8 \pm 0.1\%$, 95% uncertainty) of the total Fe in blood, and $34 \pm 14\%$ of Cu. Using the Ca/Zn ratios, the mean proportion of $89 \pm 6\%$ Zn in erythrocytes is compatible with literature findings.⁸ All of these values are mutually consistent, regardless of the normalizing element (Na, Ca, Fe, Mg).

Zinc

Concentrations in serum tend to be more concentrated for men than for women, whereas the Zn isotope compositions overlap for both genders (Table 2). In contrast, Zn tends to be more concentrated in the red blood cells of female subjects. The erythrocyte Zn shows no sex-related isotopic difference. The spread of $\delta^{66}\text{Zn}$ is twice as large for men. The lack of gender bias for Zn contents in total blood reflects that women have fewer erythrocytes than men. Zn is on average 0.2 permil heavier in erythrocytes with respect to serum. Erythrocyte–serum isotopic differences for Cu and Zn are not visibly correlated.

Iron

Concentrations in serum do not differ between men and women in contrast to Fe isotope compositions ($p = 0.05$). Iron is less concentrated in the red blood cells of men relative to women but total blood shows almost complete overlap because women's blood carries fewer erythrocytes. The $\delta^{56}\text{Fe}$ of both the serum and erythrocytes is negative, which is a feature common to all

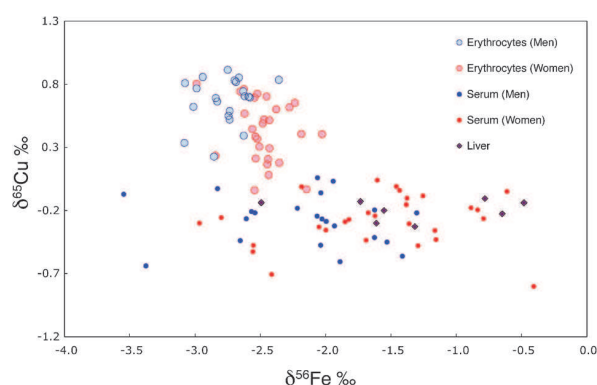


Fig. 2 Iron and Cu isotope fractionation in erythrocytes and serum of men and women (see ESI† for the data). Also shown are the liver data from Jaouen *et al.* (submitted). The gender effect reflects faster processing and smaller iron stores in women. Caveat: as a result of very different Cu and Fe apportionments ϕ , mass conservation upon combination of blood components, notably that of serum and erythrocytes into total blood, does not produce straight-lines but strongly curved arrays, which accounts for the overall L-shape of the data distribution. The overlap of isotope compositions between liver and serum reflects the production of ceruloplasmin in the liver.

biological material.⁴ The $\delta^{56}\text{Fe}$ of erythrocytes is conspicuously lower than in serum by about 1–2 permil (Table 2 and Fig. 1). Iron of men's erythrocytes and whole blood is isotopically lighter. In women's serum, it is only marginally heavier than for men's ($p = 0.05$), but the spread of the data is large. The liver $\delta^{56}\text{Fe}$ data of Jaouen *et al.* (submitted) overlap with the serum values.

Copper

The present concentration data confirm earlier observations⁷ that Cu is more concentrated in women's relative to men's serum. The large spread of Cu concentrations for female subjects is known to be related to estrogen intake.⁹ Copper isotope compositions in serum show no significant gender bias. On average, Cu is 0.35 permil heavier in women's erythrocytes with respect to serum, and this figure increases to 0.48 permil for men. On average, Cu is isotopically 0.8 permil heavier in erythrocytes with respect to serum (Fig. 2). The liver $\delta^{65}\text{Cu}$ data of Jaouen *et al.* (submitted) (mean value -0.4%) overlap with those of the mean serum (mean value -0.28%).

ABO blood type

There is no observable systematics in the Fe, Cu, and Zn isotope compositions related to the ABO blood type in women except possibly for a smaller spread of group O with respect to groups A and B (Fig. 3). For men, however, a Kruskal–Wallis non-parametric test shows that B-type men erythrocytes are significantly fractionated with respect to the other blood types. This difference is shown in Fig. 4, where the statistical ('Mahalanobis') distances to the mean values in the $\delta^{65}\text{Cu}$ – $\delta^{56}\text{Fe}$ space are arranged by blood types. O-type erythrocyte isotope variability for men and B-type variability for women seem to be more restricted than for other groups.

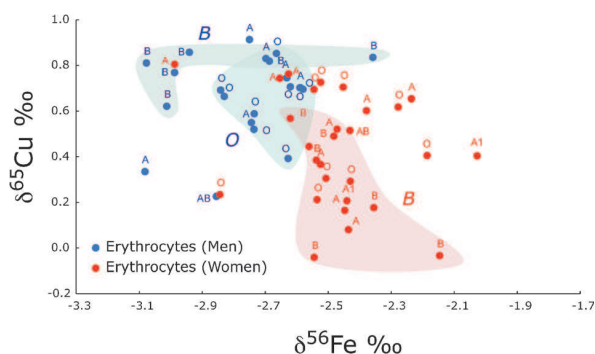


Fig. 3 Blood-type variability of Fe and Cu isotope compositions in men and women erythrocytes. The extreme composition of B-type men erythrocytes is not explained. B-type erythrocyte isotope variability of both genders is more restricted than for other groups.

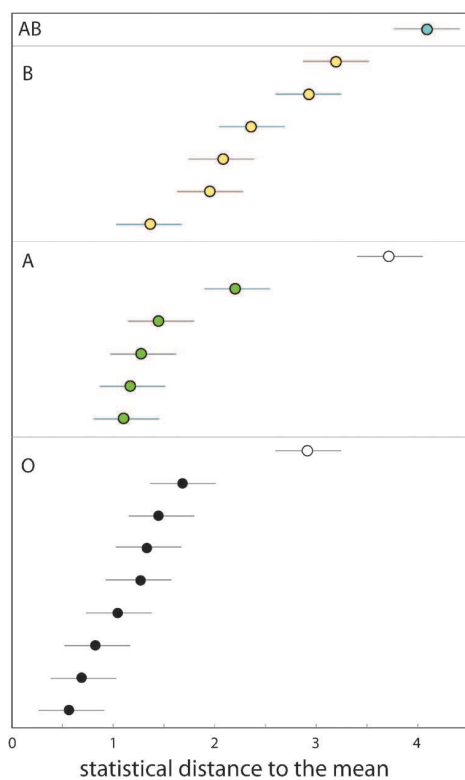


Fig. 4 Statistical ('Mahalanobis') distance in the $\delta^{65}\text{Cu}$ – $\delta^{56}\text{Fe}$ space of each erythrocyte sample to the mean value (men only) arranged by the blood type. A value of one corresponds to a standard deviation along each coordinate. The B-type stands out against the other groups. The open symbols are probable outliers. The analytical uncertainties are shown as horizontal bars (0.05%).

Discussion

Whether in intracellular or extracellular material, the free ions Fe^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} are toxic to cells and therefore move around in the body as complexes within metalloproteins. Isotope fractionation of metals among their various complexes has so far been explored neither experimentally nor theoretically, and the interpretation of the isotopic variability must, therefore, resort to general principles. The energy of a bond increases with

its vibration frequency and, hence, decreases with the atomic weight of the binding metal isotope. The preferential concentration of heavy isotopes into stronger over weaker bonds therefore minimizes the overall energy of the system. As a consequence, the two major potential factors of isotopic fractionation are the oxidation state and the nature of ligands. Fe(III) has a stronger electrostatic field than Fe(II) and, to a first order, oxidized compounds should be isotopically heavier than their reduced equivalent. The isotopic variability among blood components will depend on steps involving oxidoreductases, pairs of redox ions, such as Fe and Cu, and cysteine redox chemistry.¹⁰ Likewise, ligands that are strong Lewis bases should pull their bonds more strongly than soft bases: typically, for amino acid residues, histidine with its imidazole N-bonds makes harder bonds than cysteine and methionine with their thiol and thioether S-bonds,¹¹ and is therefore expected to concentrate heavy isotopes. Lastly, it must be emphasized that a chemical reaction with full conversion of one single reactant into one single product cannot induce isotope fractionation. For example, little or no isotope fractionation is expected during transport by ferroportin (Fe) or Atox1 (antioxidant protein 1, Cu). In order for isotope fractionation to take place, a metal-bearing compound must dissociate, whether at equilibrium or kinetically, into two distinct metal-bearing products, as for example during partial uptake of a metal into the cell from the blood stream.

Blood-types and isotope fractionation

The Mn-loaded glycosyltransferases GTA and GTB synthesizes A and B antigens on erythrocytes.¹² The functions of the ABO blood group antigens are not known. A feature potentially relevant to erythrocytes activity is that, although GTA and GTB only differ from each other by two substitutions, one of them involves the replacement of a leucine by a methionine residue. Whether the synthesis of blood types is in some way connected to uptake of Fe by erythrocytes is not known.

Zinc

About 99% of the total zinc from the body is intracellular. Once absorbed from the gastrointestinal tract into the circulation, zinc is taken up by the liver within three hours and eventually appears in the pancreas, kidneys, and other tissues.¹³ Carbonic anhydrase, in which Zn is coordinated with three histidine residues, accounts for most of this metal endowment of erythrocytes, while Zn preferentially binds loosely to albumin in the serum. In metallothionein, Zn is bound to cysteine.¹⁴ The weak $\delta^{66}\text{Zn}$ variability in erythrocytes and serum is probably due to hard histidine *versus* soft cysteine bonding contrasts. The much weaker $\delta^{66}\text{Zn}$ contrast between erythrocytes and plasma with respect to the $\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{65}\text{Cu}$ contrasts suggests that, to a large extent, the metal oxidation state is more effective at fractionating isotopes than mere conformational differences.

Iron

Most of the bodily Fe resides as Fe(II) in hemoglobin and myoglobin, while the rest is stored largely as Fe(III) in ferritin (a ferrihydrite analog broadly distributed in tissues) and hemosiderin¹⁵ in the cytosol of liver, spleen, and bone marrow

cells. Dietary Fe(III) iron is reduced to Fe(II) by duodenal ferric reductase (Dcytb)¹⁶ and transported into the enterocytes by the metal transporter DMT1. Reductive uptake is a straightforward explanation for the overall negative $\delta^{56}\text{Fe}$ of all the bodily iron with respect to diet Fe.⁴ Fe is released from enterocytes by ferroportin into the blood stream,¹⁷ where it is oxidized into transferrin-bound Fe(III) by Cu-based ferroxidases hephaestin and ceruloplasmin.¹⁸ Iron is stored in hepatocytes as ferritin-bound Fe(III) and released from the liver as serum transferrin, which is used by erythropoiesis upon Fe reduction by Cu-bearing Steap3 (six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3) ferrireductases.¹⁹ The present observations confirm the higher serum ferritin/hemoglobin ratio in men²⁰ and the large size of their iron stores.²¹

The Fe and Cu isotope differences between erythrocyte and serum must originate in erythropoiesis. Since we are dealing with blood from young adults, we assume that erythropoiesis is restricted to bone marrow.²² We also consider that the turnover of erythrocytes is fast enough for steady-state to be achieved, or, equivalently, that there is no substantial accumulation or loss of Fe in the bone marrow. With such simple assumptions, the erythropoietic role of other homeostatic compartments, such as the bile or the spleen, can safely be disregarded. A simple examination of isotopic mass balance demands that the reduction of serum transferrin, hereafter labeled 'up', into low- $\delta^{56}\text{Fe}$ ferrous hemoglobin ($\delta^{56}\text{Fe}_{\text{up}}$ is therefore the value for serum), leaves a high- $\delta^{56}\text{Fe}$ ferric residue (the precise nature of which, ferritin or hemosiderin, being immaterial to the breakdown of the Fe inventory) and hereafter labeled 'down'. For a given individual, the isotopic mass balance equation reads

$$\delta^{56}\text{Fe}_{\text{up}} = \phi_{\text{Hb}}^{\text{Fe}} \delta^{56}\text{Fe}_{\text{Hb}} + \phi_{\text{down}}^{\text{Fe}} \delta^{56}\text{Fe}_{\text{down}} \quad (1)$$

(*e.g.*, ref. 23), where $\phi_{\text{Hb}}^{\text{Fe}}$ and $\phi_{\text{down}}^{\text{Fe}} = 1 - \phi_{\text{Hb}}^{\text{Fe}}$ represent the proportion of transferrin Fe (Tf) converted to hemoglobin (Hb) and ferric residue (Ft) (ferritin plus hemosiderin), respectively. For a given individual, the efficiency of hemoglobin conversion (iron utilization) during erythropoiesis may therefore be obtained from $\phi_{\text{Hb}}^{\text{Fe}}$ which is simply:

$$\phi_{\text{Hb}}^{\text{Fe}} = \frac{\delta^{56}\text{Fe}_{\text{up}} - \delta^{56}\text{Fe}_{\text{down}}}{\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Hb}} - \delta^{56}\text{Fe}_{\text{down}}} \quad (2)$$

The bone analyses by Jaouen *et al.* (submitted) suggest that $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{down}} \approx -0.45\text{‰}$ for men and -0.12‰ for women. The values of $\phi_{\text{Hb}}^{\text{Fe}}$ plotted in the histograms of Fig. 5 correspond to a surprisingly broad range (20–100%) of transferrin–hemoglobin conversion. The magnitude of the denominator ($>2\text{‰}$) is large enough that analytical uncertainties do not affect $\phi_{\text{Hb}}^{\text{Fe}}$ by more than 10 percent. The donors, having been deemed healthy from their blood counts, provide no indication that the variability of $\phi_{\text{Hb}}^{\text{Fe}}$ entails any pathological condition such as anemia. The difference of hemoglobin conversion efficiency between men and women is not significant.

Homeostatic Fe cycles (*e.g.*, ref. 24) do not, so far, include the ferric residue pathway. Such cycles violate the isotopic mass balance and need to be amended accordingly. It is only recently that ferritin has been suspected to play a significant role in Fe transport.²⁵ Even if physiology may have

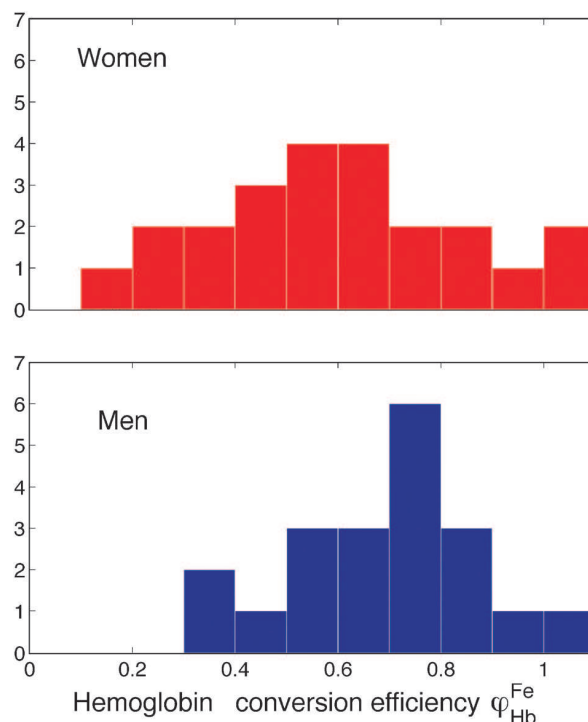


Fig. 5 Erythropoietic conversion of transferrin into hemoglobin: histograms of the yields $\phi_{\text{Hb}}^{\text{Fe}}$ calculated from the isotopic data listed in ESI† and eqn (2). Blue: men. Red: women.

underestimated the weight of the ferritin pathway, it did not escape histological observation. The erythroblastic islands of the bone marrow are composed of erythroblasts surrounding a central macrophage.²⁶ Whether these macrophages play a role in secreting high- $\delta^{56}\text{Fe}$ ferritin²⁵ or rather themselves handle the transport of ferritin to the liver and the spleen, they participate in large Fe fluxes of the same magnitude as those associated with hemoglobin (Fig. 6).

Copper in serum is hosted at 70–80% by ceruloplasmin with six Cu(II) ions,²⁷ a ferroxidase secreted in hepatocytes. The rest of the serum copper is bound to albumin and histidine. Ceruloplasmin is synthesized in the liver by the Cu(I)-loaded ATPase ATP7B,²⁸ which also eliminates excess hepatic Cu into the bile.²⁹ Metallothionein is also used for Cu storage in the liver. The similar $\delta^{65}\text{Cu}$ (-0.33‰) values of the liver and serum (-0.28‰) suggest a lack of Cu isotope fractionation within the liver among different exports. Serum therefore transports unfractionated liver copper, regardless of its oxidation state (Fig. 2). The isotopically lighter Cu in both the serum and the erythrocytes of women clearly reflects smaller iron stores and the much higher ($\times 2.5$) turnover rate of iron previously described in the literature.²⁰ Women process copper more rapidly than men and therefore produce more ceruloplasmin.

In contrast, intracellular Cu is bound first to redox-active Cu(I–II)–Zn superoxide dismutase, an antioxidant enzyme, through histidine bonds.³⁰ Cu–Zn superoxide dismutase is especially abundant in liver, kidney, and red blood cells.³¹

As for Fe, the conspicuous 0.82‰ difference in $\delta^{65}\text{Cu}$ values between serum and erythrocytes leaves erythropoiesis

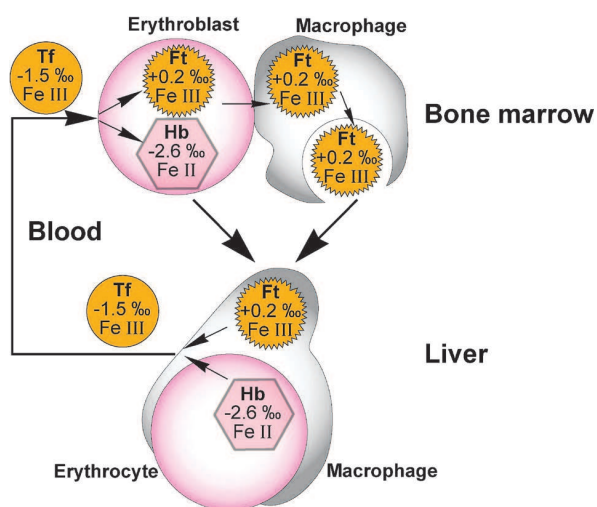


Fig. 6 Iron isotope fractionation during erythropoiesis: the missing Fe pathway. Wholesale conversion of transferrin (Fe(III), $\delta^{56}\text{Fe} = -1.2\text{‰}$) to hemoglobin (Fe(II), $\delta^{56}\text{Fe} = -2.6\text{‰}$) is not allowed isotopically. A quite substantial part of the transferrin iron must be converted into isotopically heavy ferritin (tentatively $\delta^{56}\text{Fe} = +0.2\text{‰}$) and disposed of by macrophages.

grossly imbalanced isotopically (Fig. 7). Ceruloplasmin-dominated serum Cu, which is again labelled 'up', enters bone marrow with $\delta^{65}\text{Cu}_{\text{CP}} \approx -0.26\text{‰}$, whereas CuZn-superoxide

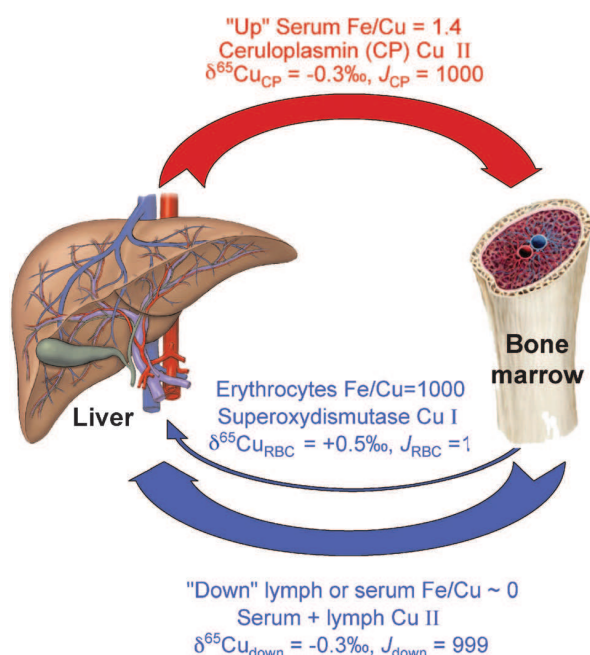


Fig. 7 Copper isotopes and Cu/Fe fractionation during erythropoiesis: the missing Cu pathway. Wholesale conversion of the plasma ceruloplasmin produced by the liver ($\delta^{65}\text{Fe} = -0.3\text{‰}$) to the CuZn superoxide dismutase present in erythrocytes ($\delta^{65}\text{Fe} = +0.5\text{‰}$) is not allowed isotopically. 99.9 percent of the copper present in serum before erythropoiesis is not used. It must be returned with a very different Cu/Fe ratio and either carried by the lymph or mixed back into post-erythropoietic serum. The variable J stands for Cu fluxes with respect to an input of ceruloplasmin of 1000.

dismutase-dominated erythrocytes move out with $\delta^{65}\text{Cu}_{\text{RBC}}$ values of $\sim +0.56\text{‰}$. A major complementary flow downstream from the bone marrow, hereafter labeled 'down', with very negative $\delta^{65}\text{Cu}$ is therefore required for closure. Using the same assumptions as for Fe, isotopic Cu mass balance reads:

$$\delta^{65}\text{Cu}_{\text{up}} = \varphi_{\text{RBC}}^{\text{Cu}} \delta^{65}\text{Cu}_{\text{RBC}} + \varphi_{\text{down}}^{\text{Cu}} \delta^{65}\text{Cu}_{\text{down}} \quad (3)$$

while for the elemental Fe/Cu ratio:

$$\left(\frac{\text{Fe}}{\text{Cu}}\right)_{\text{up}} = \varphi_{\text{RBC}}^{\text{Cu}} \left(\frac{\text{Fe}}{\text{Cu}}\right)_{\text{RBC}} + \varphi_{\text{down}}^{\text{Cu}} \left(\frac{\text{Fe}}{\text{Cu}}\right)_{\text{down}} \quad (4)$$

in which $\varphi_{\text{RBC}}^{\text{Cu}}$ and $\varphi_{\text{down}}^{\text{Cu}} = 1 - \varphi_{\text{RBC}}^{\text{Cu}}$ represent the proportion of seric ('up') Cu converted to RBC Cu and directed to the missing pathway, respectively. Therefore

$$\begin{aligned} \varphi_{\text{RBC}}^{\text{Cu}} &= \frac{\delta^{65}\text{Cu}_{\text{up}} - \delta^{65}\text{Cu}_{\text{down}}}{\delta^{65}\text{Cu}_{\text{RBC}} - \delta^{65}\text{Cu}_{\text{down}}} \\ &= \frac{(\text{Fe/Cu})_{\text{up}} - (\text{Fe/Cu})_{\text{down}}}{(\text{Fe/Cu})_{\text{RBC}} - (\text{Fe/Cu})_{\text{down}}} \end{aligned} \quad (5)$$

The combination of 4 and 5 shows that $\delta^{65}\text{Cu}$ and Fe/Cu, RBC, serum ('up'), whole blood, and the missing 'down' component are linearly related. The conditions $(\text{Fe/Cu})_{\text{RBC}} > 1000$ and $(\text{Fe/Cu})_{\text{up}} \approx 1$ require that $(\text{Fe/Cu})_{\text{down}} < 1$ and $\varphi_{\text{RBC}}^{\text{Cu}} \ll 0.001$. Again, the uncertainty on these estimates is fairly small. Less than one part per mil of the serum Cu is therefore utilized by erythropoiesis. The huge, unaccounted for 'down' pathway, which makes up over 99.9 percent of the 'up' flow, is physiologically unexplained. Copper excess may be disposed of at other erythropoietic centers, such as the spleen, or may be entrained in the lymphatic circulation, possibly refluxed with the serum downstream from the bone marrow.³² Copper fixation in the cytochrome oxidase of the erythroid mitochondrion membrane is clearly involved in Cu cycling.²⁴ A histological Cu model parallel to the erythroblastic islands model used for Fe is, however, not available and, in particular, the role of macrophages with respect to such a large Cu flux is unknown.

Potential usefulness of isotopic studies

Iron and copper isotopes carry information on erythropoiesis that cannot be superseded by more easily gathered concentration data. Collecting Fe and Cu concentrations characteristic of the different blood compartments, notably 'up' and 'down' the sites of erythrocytes production and destruction, is a formidable challenge, whereas a single anomalous isotope composition of any tissue biopsy may reveal a shift in metal processing. The similarity of $\delta^{56}\text{Fe}$ and $\delta^{65}\text{Cu}$ between liver and serum, and that of $\delta^{65}\text{Cu}$ in bone and serum (Jaouen *et al.*, submitted), determines a baseline for the 'normal' isotope compositions of these metals in bone and liver. This baseline is now in place to be used to detect anomalous conditions.

The present work clearly should be complemented by isotopic work on metal in ferritin, hemoglobin, ceruloplasmin, and membranes. Examples of potential applications abound. The Menkes and Wilson disease are controlled by perturbed Cu-ATPase activity and ceruloplasmin production³³ and would benefit from Cu isotopic analysis. The well-documented coupled imbalance of Fe and Cu in Alzheimer patients³⁴

warrants further isotopic investigations to search for a distant echo of a severe erythropoietic condition. The buildup of resistance against cisplatin cancer drug may indicate that malignant cells may be able to redirect Cu-ATPases ATP7A and ATP7B³⁵ to modify the Cu-dependent uptake of Pt compounds through cellular membranes.³⁶ The apparent control of blood type may also deserve further attention since, for example, patients with blood groups A, AB, and B are 50 percent more likely to develop pancreatic cancer than those of the group O.³⁷

Conclusions

The present work shows that the strong isotopic contrast of Fe and Cu between erythrocytes and serum reflects the redox conditions prevailing during erythropoiesis. The gender isotopic effect is accounted for by the different dynamics of iron stores between men and women. Full conversion of transferrin into hemoglobin is not permitted by isotopic observations and another pathway (possibly through ferritin) accounting for a substantial part of iron transit through the bone marrow is suspected, yet remains to be established. Likewise, isotopic constraints require the existence of an unknown Cu erythropoietic pathway.

Acknowledgements

We thank Francis Camoin from the Etablissement Français du Sang in Lyon who provided the samples. The Institut de Biologie, with Patrick Netter and Annie LeChevallier and Institut des Sciences de l'Univers with Dominique Le Quéau, the Ecole Normale Supérieure de Lyon and its leadership Jacques Samarut and Chantal Rabourdin, the Fondation Bullukian, the Lyonnaise de Banque with Yves Manet, the Fondation Mérieux with personal support from Christian Bréchet are all gratefully acknowledged for funding an unusual project run by isotope geochemists with no prior credentials in the field of biology. Particularly encouraging were the continuous efforts and friendly prodding of François Juillet, who was always there to help confront endless sources of practical and financial problems. We wish to express our gratitude to Philippe Gillet for encouragements at the early stages of the project. Janne Blichert-Toft kindly edited the manuscript. We thank the anonymous reviewers for useful suggestions. This is a contribution of the UMR CNRS 5276.

References

- 1 F. Albarède, P. Telouk, J. Blichert-Toft, M. Boyet, A. Agranier and B. Nelson, Precise and accurate isotopic measurements using multiple-collector ICPMS, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2004, **68**, 2725–2744.
- 2 C. Maréchal, P. Télouk and F. Albarède, Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry, *Chem. Geol.*, 1999, **156**, 251–273.
- 3 X. K. Zhu, Y. Guo, R. J. P. Williams, R. K. O'Nions, A. Matthews, N. S. Belshaw, G. W. Canters, E. C. de Waal, U. Weser, B. K. Burgess and B. Salvato, Mass fractionation processes of transition metal isotopes, *Earth Planet. Sci. Lett.*, 2002, **200**, 47–62.
- 4 T. Walczyk and F. von Blanckenburg, Natural iron isotope variations in human blood, *Science*, 2002, **295**, 2065–2066.
- 5 V. Balter, A. Zazzo, A. P. Moloney, F. Moynier, O. Schmidt, F. J. Monahan and F. Albarède, Bodily variability of zinc natural isotope abundances in sheep, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2010, **24**, 605–612, DOI: 10.1002/rcm.4425.
- 6 P. A. Krayenbuehl, T. Walczyk, R. Schoenberg, F. von Blanckenburg and G. Schulthess, Hereditary hemochromatosis is reflected in the iron isotope composition of blood, *Blood*, 2005, **105**, 3812–3816, DOI: 10.1182/blood-2004-07-2807.
- 7 G. V. Iyengar, Reevaluation of the trace element content in Reference Man, *Radiat. Phys. Chem.*, 1998, **51**, 545–560.
- 8 R. J. Cousins, Absorption, transport, and hepatic-metabolism of copper and zinc-special reference to metallothionein and ceruloplasmin, *Physiol. Rev.*, 1985, **65**, 238–309.
- 9 D. B. Milne, Copper intake and assessment of copper status, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, **67**, 1041S–1045S.
- 10 L. Banci, I. Bertini, F. Cantini and S. Ciofi-Baffoni, Cellular copper distribution: a mechanistic systems biology approach, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2010, **67**, 2563–2589, DOI: 10.1007/s00018-010-0330-x.
- 11 A. K. Katz, L. Shimon-Livny, O. Navon, N. Navon, C. W. Bock and J. P. Glusker, Copper-binding motifs: structural and theoretical aspects, *Helv. Chim. Acta*, 2003, **86**, 1320–1338.
- 12 L. L. Lairson, B. Henrissat, G. J. Davies and S. G. Withers, Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms, *Ann. Rev. Biochem.*, 2008, **77**, 521–555, DOI: 10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322.
- 13 B. L. Vallee and K. H. Falchuk, The biochemical basis of zinc physiology, *Physiol. Rev.*, 1993, **73**, 79–118.
- 14 N. Dimakis, M. J. Farooqi, E. S. Garza and G. Bunker, Zinc cysteine active sites of metalloproteins: a density functional theory and X-ray absorption fine structure study, *J. Chem. Phys.*, 2008, **128**, 115104.
- 15 M. Worwood, The laboratory assessment of iron status—An update, *Clin. Chim. Acta*, 1997, **259**, 3–23.
- 16 A. T. McKie, The role of Dcytb in iron metabolism: an update, *Biochem. Soc. Trans.*, 2008, **36**, 1239–1241, DOI: 10.1042/BST0361239.
- 17 N. C. Andrews, Understanding heme transport, *N. Engl. J. Med.*, 2005, **353**, 2508–2509; R. E. Fleming and B. R. Bacon, Orchestration of iron homeostasis, *N. Engl. J. Med.*, 2005, **352**, 1741–1744.
- 18 H. J. Chen, G. Huang, T. Su, H. Gao, Z. K. Attieh, A. T. McKie, G. J. Anderson and C. D. Vulpe, Decreased hephaestin activity in the intestine of copper-deficient mice causes systemic iron deficiency, *J. Nutr.*, 2006, **136**, 1236–1241.
- 19 R. S. Ohgami, D. R. Campagna, E. L. Greer, B. Antiochos, A. McDonald, J. Chen, J. J. Sharp, Y. Fujiwara, J. E. Barker and M. D. Fleming, Identification of a ferrioreductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells, *Nat. Genet.*, 2005, **37**, 1264–1269, DOI: 10.1038/ng1658.
- 20 J. R. Hunt, C. A. Zito and L. K. Johnson, Body iron excretion by healthy men and women, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2009, **89**, 1792–1798, DOI: 10.3945/ajcn.2009.27439.
- 21 J. D. Cook, C. H. Flowers and B. S. Skikne, The quantitative assessment of body iron, *Blood*, 2003, **101**, 3359–3364, DOI: 10.1182/blood-2002-10-3071.
- 22 J. E. Hall, *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*, Elsevier, Amsterdam, 2011, p. 1091.
- 23 F. Albarède, *Introduction to Geochemical Modeling*, Cambridge University Press, Cambridge, 1995, p. 543.
- 24 J. F. Collins, J. R. Prohaska and M. D. Knutson, Metabolic crossroads of iron and copper, *Nutr. Rev.*, 2010, **68**(3), 133–147.
- 25 L. A. Cohen, L. Gutierrez, A. Weiss, Y. Leichtmann-Bardoogo, D.-I. Zhang, D. R. Crooks, R. Sougrat, A. Morgenstern, B. Galy, M. W. Hentze, F. J. Lazaro, T. A. Rouault and E. G. Meyron-Holtz, Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway, *Blood*, 2010, **116**, 1574–1584, DOI: 10.1182/blood-2009-11-253815.
- 26 J. A. Chasis and N. Mohandas, Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis, *Blood*, 2008, **112**, 470–478, DOI: 10.1182/blood-2008-03-077883.
- 27 D. J. Kosman, in *Copper-Containing Proteins*, Academic Press Inc, San Diego, 2002, vol. 60, pp. 221–269.
- 28 S. Lutsenko, E. S. LeShane and U. Shinde, Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007, **463**, 134–148, DOI: 10.1016/j.abb.2007.04.013; E. A. Roberts and B. Sarkar, Liver as a key organ in the supply, storage, and excretion of copper, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, **88**, 851S–854S.
- 29 K. Terada, N. Aiba, X. L. Yang, M. Iida, M. Nakai, N. Miura and T. Sugiyama, Biliary excretion of copper in LEC rat after

-
- introduction of copper transporting P-type ATPase, ATP7B, *FEBS Lett.*, 1999, **448**, 53–56.
- 30 L. Leinartaitė, K. Saraboji, A. Nordlund, D. T. Logan and M. Oliveberg, Folding Catalysis by Transient Coordination of Zn^{2+} to the Cu Ligands of the ALS-Associated Enzyme Cu/Zn Superoxide Dismutase 1, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 13495–13504, DOI: 10.1021/ja1057136.
- 31 M. C. Linder and M. HazeghAzam, Copper biochemistry and molecular biology, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1996, **63**, S797–S811.
- 32 I. Cavill, Erythropoiesis and iron, *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2002, **15**, 399–409, DOI: 10.1053/beha.2002.0004.
- 33 T. Y. Tao and J. A. Gitlin, Hepatic copper metabolism: insights from genetic disease, *Hepatology*, 2003, **37**, 1241–1247, DOI: 10.1053/jhep.2003.50281.
- 34 J. R. Connor, S. L. Menzies, S. M. St Martin and E. J. Mufson, A histochemical study of iron, transferrin, and ferritin in Alzheimer's diseased brains, *J. Neurosci. Res.*, 1992, **31**, 75–83; J. R. Connor, P. Tucker, M. Johnson and B. Snyder, Ceruloplasmin levels in the human superior temporal gyrus in aging and Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.*, 1993, **159**, 88–90.
- 35 G. Samimi, R. Safaei, K. Katano, A. K. Holzer, M. Rochdi, M. Tomioka, M. Goodman and S. B. Howell, Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells, *Clin. Cancer Res.*, 2004, **10**, 4661–4669; K. Leonhardt, R. Gebhardt, J. Mossner, S. Lutsenko and D. Huster, Functional interactions of Cu-ATPase ATP7B with cisplatin and the role of ATP7B in the resistance of cells to the drug, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 7793–7802, DOI: 10.1074/jbc.M805145200.
- 36 D. Wang and S. J. Lippard, Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2005, **4**, 307–320, DOI: 10.1038/nrd1691.
- 37 B. M. Wolpin, P. Kraft and C. S. Fuchs, Response: Re: ABO Blood Group and the Risk of Pancreatic Cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, 2009, **101**, 1286–1287, DOI: 10.1093/jnci/djp250.

A.2 Article « Iron, copper and zinc isotopic fractionation up mammal trophic chains »

L'article « Iron, copper and zinc isotopic fractionation up mammal trophic chains a été soumis en juin 2012 au journal *Earth and Planetary Science Letters*.

Résumé

La composition en isotopes stables du carbone et de l'azote au sein des tissus animaux est couramment utilisée pour le traçage des sources alimentaires dans les études archéologiques et écologiques. Cependant, il existe de plus en plus d'indices indiquant que les isotopes non-traditionnels possèdent des compositions isotopiques distinctes entre les produits végétaux et animaux, ce qui ouvre la voie à de nouveaux marqueurs potentiels de l'alimentation. Nous présentons ici des données pour les compositions en isotopes stables du fer (Fe), cuivre (Cu) et zinc (Zn) dans des plantes et des os d'herbivores et de carnivores. Les échantillons proviennent de réseaux trophiques localisés dans la région du Western Cape et du parc national Kruger en Afrique du Sud. Les caractéristiques isotopiques en Fe, Cu et Zn sont similaires entre les deux parcs. Cependant, les valeurs isotopiques locales du sol influencent les compositions isotopiques des plantes et des niveaux trophiques supérieurs pour le Cu, voire le Zn. Entre les plantes et les os des herbivores, les compositions isotopiques en zinc sont enrichies en ^{66}Zn de 0.8 ‰ alors qu'aucun enrichissement trophique significatif n'est observé pour le Fe et Cu. Entre les os des herbivores et ceux des carnivores, les compositions isotopiques du fer sont appauvries en ^{56}Fe d'environ 0.6 ‰, celles du cuivre sont enrichies en ^{65}Cu de 1 ‰ et celles du zinc sont légèrement appauvries en ^{66}Zn de 0.2 ‰. La répartition isotopique des métaux dans le corps peut être partiellement expliquée par les caractéristiques isotopiques trophiques observées. Cependant, il est également nécessaire d'invoquer le rôle de l'absorption intestinale différentielle des métaux entre herbivores et carnivores pour rendre compte des résultats. Des études ultérieures sont nécessaires pour comprendre dans sa totalité la régulation de la circulation des isotopes du Fe, Cu, Zn au sein des chaînes trophiques. Toutefois, ces données suggèrent déjà leur réel potentiel comme nouvel outil paléoalimentaire et paléoécologique.

IRON, COPPER AND ZINC ISOTOPIC FRACTIONATION UP MAMMAL TROPHIC CHAINS

Klervia Jaouen, Marie-Laure Pons, Vincent Balter

Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard, and CNRS, Lyon, France

Abstract

The stable isotope compositions of carbon and nitrogen in animal tissues are commonly used to infer dietary sources in ecological and archaeological studies. However, there is a growing body of proofs that some non-traditional elements exhibit stable isotope compositions that are distinct in vegetal and animal products, providing potential new tracers for diet reconstructions. Here, we present data for iron (Fe), copper (Cu) and zinc (Zn) stable isotope compositions in plants and bones of herbivores and carnivores. The samples come from trophic chains located in the Western Cape area and in the Kruger National Park in South Africa. The Fe, Cu and Zn isotope systematics are similar in both parks. However, local Cu, and possibly Zn, isotopic values of soils influence that of plants and of higher trophic steps. Between plants and bones of herbivores, the Zn isotope compositions are ^{66}Zn -enriched by about 0.8 ‰ whereas no significant trophic enrichment is observed for Fe and Cu. Between bones of herbivores and bones of carnivores, the Fe isotope compositions are ^{56}Fe -depleted by about 0.6 ‰, the Cu isotope compositions are ^{65}Cu -enriched by about 1 ‰, and the Zn isotope compositions are slightly ^{66}Zn -depleted by about 0.2 ‰. The isotopic distributions of the metals in the body partly explain the observed trophic isotopic systematics. However, it is also necessary to invoke differential intestinal metal absorption between herbivores and carnivores to account for the observed results. Further studies are necessary to fully understand how is regulated the traffic of Fe, Cu and Zn isotopes up trophic chains, but the data already suggests significant potential as new paleodietary and paleoecological proxies.

1. Introduction

Since the pioneering works of DeNiro and Epstein thirty years ago on the influence of diet on the distribution of carbon (C) and nitrogen (N) isotopes in animals (DeNiro and Epstein, 1978, 1981), the utilization of C and N isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, respectively) as dietary tracers has produced an abundant literature in agronomy (e.g. Jahren and Kraft, 2008), ecology (e.g. Cerling et al., 2009), paleontology (e.g. Palmqvist et al., 2003) and paleoanthropology (e.g. Richards and Trinkaus, 2009). The rationale is based on the existence of a more or less constant fractionation of C and N isotope compositions between the diet and tissues of animals, allowing to predict the C and N

isotope composition of an animal's diet given the values measured in its tissues. Theoretically, three food sources can be partitioned using the C and N isotopic ratios. The situation can be matched for simple trophic relationships in laboratory and mesocosm experiments but it rarely exists in natural contexts because the diet of an animal is most often composed of more than three isotopically distinct sources. As only C and N isotopes are measured routinely, this leads in cases of complex diet to under-determined systems that are impossible to resolve.

However, thanks to the recent development of inductively-coupled plasma mass spectrometers equipped with a magnetic sector and multiple collection (MC-ICPMS), precise measurements of non-traditional stable isotopes (i.e. not ^2H , ^{13}C , ^{15}N and ^{18}O) has been possible (e.g. Albarède and Beard, 2004). Iron (Fe), copper (Cu) and zinc (Zn) are three 58 essential elements for life and are bounded to a variety of ligands to form metalloenzymes. Although at a very early stage, the variation of $\delta^{56}\text{Fe}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ and $\delta^{66}\text{Zn}$ values in biological tissues already exceed most of the variability known for geological terrestrial material (Beard and Johnson, 1999; Albarède 2004, Cloquet et al., 2008). In plants, the metal isotope $\delta^{65}\text{Cu}=[(^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu})_{\text{sample}}/(^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu})_{\text{standard}}-1].10^3$. All $\delta^{65}\text{Cu}$ values in the text are with respect to the NIST-SRM 976 standard. $\delta^x\text{Fe}=[(^x\text{Fe}/^{54}\text{Fe})_{\text{sample}}/(^x\text{Fe}/^{54}\text{Fe})_{\text{standard}}-1].10^3$ and $x=56$ or 57). All $\delta^x\text{Fe}$ values in the text are with respect to the IRMM 14 standard. $\delta^x\text{Zn}=[(^x\text{Zn}/^{64}\text{Zn})_{\text{sample}}/(^x\text{Zn}/^{64}\text{Zn})_{\text{standard}}-1].10^3$ and $x=66, 67$ or 68). All $\delta^x\text{Zn}$ values in the text are with respect to the JMC 3-0749 L standard. 4 compositions vary between seeds, stem and leaves, all these organs being isotopically different than the growth media (Weiss et al., 2005; Guelke and von Blanckenburg, 2007; Moynier et al., 2009; Weinstein et al., 2011; Jouvin et al., 2012). The overall variability reported so far for plants ranges from 0‰ to -1.6‰ for $\delta^{56}\text{Fe}$ (Guelke and von Blanckenburg, 2007), from -1‰ to +0.4‰ for $\delta^{65}\text{Cu}$ (Weinstein et al., 2011; Jouvin et al., 2012), and from -0.6‰ to +1.3‰ for $\delta^{66}\text{Zn}$ (Weiss et al., 2005; Moynier et al., 2009). In animals, metal isotope compositions vary among organs (Walczyk and von Blanckenburg, 2002; Balter et al., 2010; Albarède et al., 2011; Hotz et al., 2011; Jaouen et al., 2012; Balter et al., submitted; Jaouen et al., submitted). For iron, the whole body is ^{56}Fe -depleted relative to the diet due to a strong isotopic fractionation during Fe intestinal absorption (Walczyk and von Blanckenburg, 2002). In experimental pigs, the $\delta^{56}\text{Fe}$ values range from -0.4‰ in liver to -1.8‰ in blood for a dietary $\delta^{56}\text{Fe}$ value of 0‰ (Hotz et al., 2011). In humans, the $\delta^{56}\text{Fe}$ values can range from -3.5‰ in hair and muscle (Walczyk and von Blanckenburg, 2002) to +0.4‰ in bone (Jaouen et al., 2012). Concerning Cu, the $\delta^{65}\text{Cu}$ values range from -1.5‰ in liver to +1.5‰ in kidney of experimental sheep and mice for a diet $\delta^{65}\text{Cu}$ value of 0‰ (Balter et al., submitted). Human blood is characterized through its constituents, serum and erythrocytes, by a range of the Cu isotope compositions of about 1.6‰, the lowest $\delta^{65}\text{Cu}$ value of serum being -0.7‰ and the highest $\delta^{65}\text{Cu}$ value of erythrocytes being +0.9‰ (Albarède et al., 2011). Bodily variations of the $\delta^{66}\text{Zn}$ values range from -0.5‰ in liver to +0.5‰ in bone, muscle and serum, for a diet $\delta^{66}\text{Zn}$ value of +0.2‰ (Balter et al., 2010). The spread of the $\delta^{66}\text{Zn}$ value is about

2‰ in humans, liver being characterized by negative value down to -1‰ and bone by positive values up to +1‰ (Albarède et al., 2011; Jaouen et al., submitted).

The above preliminary data suggest that biological activity heterogeneously redistributes metals isotopes in the organism (whether animal or vegetal), leading the different organs to be fractionated. The two major potential factors of the isotopic fractionation of metals are thought to be the oxidation state and the nature of ligands. Briefly, for metals bearing various oxidation states (as for Fe and Cu), oxidized compounds should be isotopically heavier than their reduced equivalent (Bigeleisen and Mayer, 1947). Zinc exists as Zn^{2+} solely, and Zn isotopic fractionation is expected to occur only during Zn exchange between ligands of distinct bond energies.

The existence of widespread isotopic fractionations of Fe, Cu and Zn between diet and animal organs, suggests that the metal isotope compositions can be used as potential dietary tracers in natural contexts, provided that the isotopic effects observed at the scale of an organism are cumulated up trophic chains. In the present study, we report the results of Fe, Cu and Zn stable isotope compositions for plants and bones of herbivores and carnivores coming from two trophic chains in South Africa, the Kruger National Park (KNP) and Western Cape (WC).

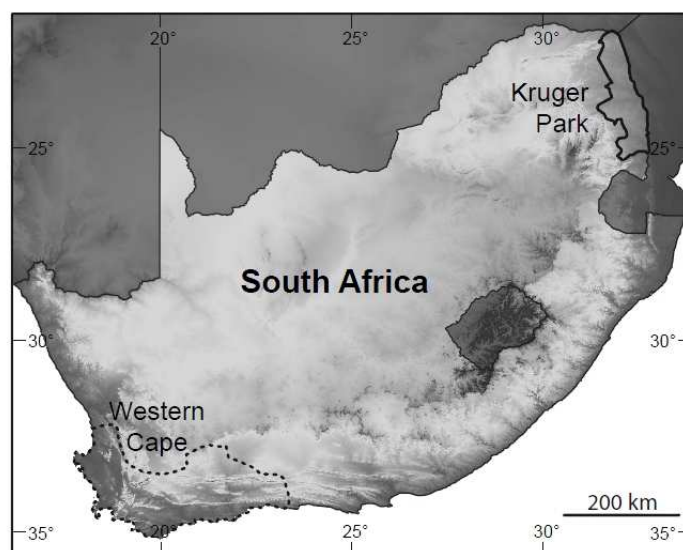


FIGURE A.1: Localisation of the Kruger National Park (KNP) and Western Cape (WC) areas in South Africa

2. Material and method

The sampling consists in bones of herbivores and carnivores coming from the Kruger National Park (KNP) and Western Cape (WC), South Africa (Fig. A.1). Also included are samples of plants debris that were found stuck into the teeth of herbivores. The samples were collected at the Ditsong National Museum of Natural History (Pretoria, South Africa). Bone aliquots were sampled in jaws. All the samples belonging to protected species by the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) were exported to France and re-exported to South Africa according to the international agreements between the French and the South African governments.

Samples were dissolved in a 1 :1 mixture of sub-boiled distilled concentrated HNO_3 and 30% H_2O_2 (analytical grade), evaporated to dryness and further redissolved in 1 mL of 7N $\text{HCl} + 0.001\% \text{H}_2\text{O}_2$. The solution was processed for isotope analysis according to the technique of Maréchal and Albarède (2002) on a column filled with the AG MP-1 anion exchange resin (100–200 mesh, Bio-Rad). Copper was eluted with 20 mL of 7 N $\text{HCl} + 0.001\% \text{H}_2\text{O}_2$, Fe with 10 mL of 2 N $\text{HCl} + 0.001\% \text{H}_2\text{O}_2$, and Zn with 10 mL of 0.5 N HNO_3 . This procedure constitutes the first method (thereafter labeled method M1) for extracting Zn from the matrix. A second method (thereafter labeled method M2) was also tested for comparative purposes. The starting solution is evaporated to dryness and re-dissolved in 1 mL of 1.5 N HBr , and Zn is further purified on 0.5 mL of AG-1x8 resin (200–400 mesh) using 3 mL of 0.5 N HNO_3 . Whatever the procedure and the element, the chemical extraction was once repeated to reduce the amount of matrix.

Metal isotopic ratios were measured by multiple-collector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICPMS) at ENS-Lyon, using either a VG Plasma 54 (P54) or a Nu Plasma HR (Nu500) for Zn, a Nu500 for Cu, and a large radius Nu Plasma 1700 (Nu1700) for Fe. Analytical conditions for Zn isotopic ratios are provided in Maréchal et al. (1999) and in Balter et al. (2010) for measurements by means of the P54 and the Nu500 MC-ICPMS, respectively. In both cases, instrumental mass fractionation was corrected using Cu-doping (Cu NIST-SRM 976) and standard-sample bracketing (Zn JMC 3-0749L). Copper isotopic ratios were determined on the Nu500 Zn-doping (Zn JMC 3-0749L) and standard-sample bracketing (Cu NIST-SRM 976). The Cu/Zn doping technique imposed the measure Cu and Zn isotopic ratios using wet plasma due to large isotopic effects on the desolvator devices (Aridus and DSN). For Fe, isotopic ratios were run using dry plasma and instrumental mass fractionation was controlled by standard-sample bracketing (Fe IRMM14). The precision (external reproducibility, two-sigmas) on the isotopic ratios is typically 50 ppm for all isotopic systems. Metal concentrations were measured at ENS-Lyon using a Agilent 7500CX quadrupole ICPMS.

3. Results

The metal isotope compositions and concentrations are given in Table A.1.

A.2 Article « Iron, copper and zinc isotopic fractionation up mammal trophic chains »

Taxon	Area	#Museum	# Chem	$\delta^{66}\text{Zn}$ ‰	$\pm 2\sigma$	$\delta^{67}\text{Zn}$ ‰	$\pm 2\sigma$	$\delta^{68}\text{Zn}$ ‰	$\pm 2\sigma$	[Zn] μg/g	$\delta^{65}\text{Cu}$ ‰	$\pm 2\sigma$	[Cu] μg/g	$\delta^{56}\text{Fe}$ ‰	$\pm 2\sigma$	$\delta^{57}\text{Fe}$ ‰	$\pm 2\sigma$	[Fe] μg/g		
Carnivores																				
Hyaena brunnea	KNP	TM4404	ML10#	1.11		1.59		2.11												
			ML7#	1.14		1.60		2.26												
			ML9#	1.18		1.53		2.09												
			432nt	0.98		1.69		2.13												
Panthera leo	KNP	TM4403	362nt	0.99	0.10	1.62	0.16	2.12	0.17	8				-0.87		-1.41		1.6		
			Zn8§	1.00		1.49		1.94												
			Zn9§	1.03		1.45		2.06												
			Zn9§	0.94		1.32		1.93												
Panthera leo	KNP	TM13924	Zn14§	0.94		1.22		1.87		87	0.19	10	-1.28		-1.99		273			
			Zn18§	0.51		0.83		1.09						-0.31		-0.47				
Panthera leo	WC	TM38253	422nt	0.54		0.78		0.98						-0.25		-0.34				
			Zn18§	0.62	0.05	0.80	0.05	1.04	0.10	145				-0.89		-1.34		167		
Herbivores																				
Hippotragus niger	KNP	TM17003a	ML12#	1.01		1.39		1.94												
			ML12#	1.02		1.44		2.03												
			372nt	1.07		1.86		2.07												
Hippotragus niger	KNP	TM17003b	ML4#	1.22		1.79		2.42												
			372nt	1.22		1.75		2.26												
Hippotragus niger	KNP	TM16999	452nt	0.85	0.002	1.77	0.05	2.34	0.23											
			ML5#	0.95		1.37		1.91												
			ML5#	0.93		1.53		1.96												
			ML50ts#	0.94		1.25		1.81												
Sylvicapra grimmia	KNP	TM4081	ML50ts#	0.99		1.29		1.96												
			312nt	1.01		1.50		1.97												
			312nt	1.03		1.45		1.92												
			312nt	1.01		1.43		2.04												
Damaliscus lunatus	KNP	TM17007	ML1#	1.49		2.03		2.85												
			ML11#	1.36		1.96		2.79												
Equus burchelli	KNP	AZ1132	352nt	0.94	0.10	2.00	0.10	2.82	0.08											
			Zn1§	0.93		1.31		1.89												
Equus burchelli	KNP	TM16690	Zn15§	1.46		2.45		2.73												
			ML5#	1.28		1.79		2.86												
Redunca arundinum	KNP	TM16699	ML5#	1.18		1.69		2.36												
Syncerus caffer	KNP	TM17009	ML8#	1.18		1.69		2.36												
Aepyceros melampus	KNP	AZ2137	ML3#	1.62		2.24		3.20												
Aepyceros melampus	KNP	AZ2131	L10s#	0.99		1.43		2.11												
Aepyceros melampus	KNP	AZ2138	L30s#	1.18		1.60		2.19												
Aepyceros melampus	KNP	AZ2126	L30s#	1.21		1.87		2.34												
Aepyceros melampus	KNP	TM17687	L4#	1.10		1.54		2.36												
Aepyceros melampus	KNP	TM17696	L7#	1.34		1.70		2.42												
Aepyceros melampus	KNP	TM17677	L8#	1.15		1.74		2.05												
Aepyceros melampus	KNP	TM17679	L8#	1.08		1.54		1.98												
Aepyceros melampus	WC	TM13260	L10#	0.60		0.97		1.14												
Philantomba monticola	WC	TM3051	Zn3§	0.96		1.27		1.87												
Philantomba monticola	WC	TM3059	Zn4§	1.01		1.51		2.03												
			Zn4§	1.00		1.56		1.98												
Philantomba monticola	WC	TM3146	382nt	0.93		1.22		1.68												
			Zn5§	0.95	0.09	1.45	0.42	1.90	0.37	82										
Raphicerus melanotis	WC	TM9333	402nt	0.75		1.19		1.31												
			Zn6§	0.85		0.92		1.07												
Tragelaphus scriptus	WC	TM3220	Zn6§	0.89		1.29		1.22												
			Zn6§	0.87		1.17		1.38												
			332nt	0.70		1.13		1.35												
Tragelaphus scriptus	WC	TM3220	Zn6§	0.89	0.03	1.20	0.17	1.31	0.17											
			332nt	0.69		0.92		1.07												
Plant residues																				
Taurotragus oryx	KNP	TM16994PR	L31#	0.07		0.07		-0.04												
			L18#	0.14		0.35		0.42												
			L33#	-0.03	0.10	0.21	0.40	0.19	0.64											
Redunca Arundinum	KNP	TM16699PR	L32#	-0.04		0.09		0.09												
			L29#	-0.09		0.24		0.16												
			462nt	0.05		0.15		0.24												
Equus burchelli	KNP	TM16690PR	L21#	0.35	0.12	0.13	0.20	0.09	0.32	116										
			472nt	0.47		0.84		1.10												
Equus burchelli	KNP	TM16699PR	472nt	0.52		1.03		1.21												
			Zn15§	0.45	0.10	0.79	0.65	0.97	0.63	43	-0.85	0.23	12	0.11		0.09		5665		
Hippotragus niger	KNP	TM16999PR	442nt	0.41		0.48		0.75												
			442nt	0.42		0.62		0.71												
Sylvicapra grimmia	KNP	TM16661PR	L26#	0.25	0.01	0.65	0.19	0.73	0.05	54										
			Zn17§	0.27		0.41		0.51												
Aepyceros melampus	KNP	TM17679PR	Zn17§	0.28		0.46		0.51												
			Zn7§	0.28		0.46		0.48												
Sylvicapra grimmia	KNP	TM4081PR	Zn7§	0.28		0.46		0.48												
			Zn7§	0.28		0.46		0.48												
Equus burchelli	KNP	AZ1132PR	L23#	0.33		0.41		0.66												
			L14#	0.21		0.42		0.58												
Giraffa camelopardalis	KNP	TM12254PR	L14#	0.21		0.42		0.58												
Tragelaphus scriptus	WC	TM3220PR	322nt	0.05		0.00		0.35												
			Zn6§	0.05		0.00		0.35												
Aepyceros melampus	WC	TM13260PR	342nt	0.25		0.33		0.63												

Method M2 and P54 measurement
 § Method M1 and Nu500 measurement
 § Method M2 and Nu500 measurement

TABLE A.1: Zinc (Zn), copper (Cu) and iron (Fe) isotopic compositions and concentrations of the samples

3.1. Zinc

Isotopic fractionation was mass dependent for Zn whatever the MC-ICPMS used for analysis. The $\delta^{67}\text{Zn}$ and the $\delta^{66}\text{Zn}$ values fall on a mass fractionation line of slope 1.43 and 1.52 for the P54 and Nu500, respectively, close to the theoretical value of 1.5. The offsets are 0.15 and -0.002 for the P54 and Nu500, respectively. The slope for the $\delta^{68}\text{Zn}$ vs $\delta^{66}\text{Zn}$ mass fractionation, which must equals 2, is 1.89 and 1.84 for the P54 and Nu500, respectively. The offsets are 0.01 and 0.10 for the P54 and Nu500, respectively. The least square distances between the $\delta^{66}\text{Zn}$ and the $\delta^{67}\text{Zn}$ values and their regression line were not correlated to those calculated with the $\delta^{66}\text{Zn}$ and the $\delta^{68}\text{Zn}$ values, indicating that for all the samples, the relative proportions of ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn and ^{68}Zn are controlled by mass fractionation only. For a given sample, the Zn isotope compositions are very similar whatever the method used for purifying Zn from the matrix (M1 for HCl; M2 for HBr), and the type of MC-ICPMS used for analysis (P54 or Nu500). Reproducibility is on average 10 ppm between 15 samples measured either using M1+Nu500 or M2+Nu500, and is on average 100 ppm between 21 samples measured either using M1+Nu500 and M1+P54. Zinc concentrations range from 8 to 335 $\mu\text{g/g}$ in bones and from 43 to 116 $\mu\text{g/g}$ in plants. There is no patterning of Zn concentrations between carnivores, herbivores and plants, and the concentrations are not correlated to the isotopic compositions. At KNP, the Zn isotope compositions for plants ranges from -0.09‰ to 0.52‰ with an average value of 0.22 ± 0.37 ‰. Two $\delta^{66}\text{Zn}$ data for plant at WC gives an average value 158 of 0.15 ± 0.14 ‰. The Zn isotope compositions bones of herbivores range from 0.84‰ to 1.62‰, with an average value of 1.18 ± 0.20 at KNP, and from 0.55‰ to 1.01‰, with an average value of 0.75 ± 0.18 ‰ at WC. At KNP, the Zn isotope compositions of the bones of carnivores range from 0.94 to 1.18, with a mean value of 0.95 ± 0.16 to 1.20. Statistical comparisons for the KNP samples show that the herbivores are significantly ^{66}Zn -enriched relative to plants (t-test, $P < 10^{-4}$), and that carnivores are slightly ^{66}Zn -depleted relative to herbivores (t test, $P = 0.06$; Fig. A.2). This Zn isotopic pattern holds for WC also, despite a smallest number of samples, the herbivores being significantly ^{66}Zn -enriched relative to plants (t-test, $P = 0.04$), and the unique carnivore analyzed so far being the lowest $\delta^{66}\text{Zn}$ value of all the animals.

3.2. Copper

The Cu concentrations range from 0.9 to 297 $\mu\text{g/g}$ in bones and from 1.6 to 12 $\mu\text{g/g}$ in plants. They are not distinctive of a trophic position nor they are correlated to the isotopic compositions. These first data, yet preliminary, clearly show that the patterning of the Cu isotope compositions in plants and animals is very different from that of Zn. The Cu isotopic compositions of plants at KNP range from -0.94‰ to -0.78‰. These are distinct from the single plant measured at WC, which yields a $\delta^{65}\text{Cu}$ value of -0.11‰. Herbivores are characterized by $\delta^{65}\text{Cu}$ values ranging from -1.20‰ to -0.68‰ at KNP and from -0.17‰ to -0.07‰ at WC. The two carnivores of KNP have $\delta^{65}\text{Cu}$ values

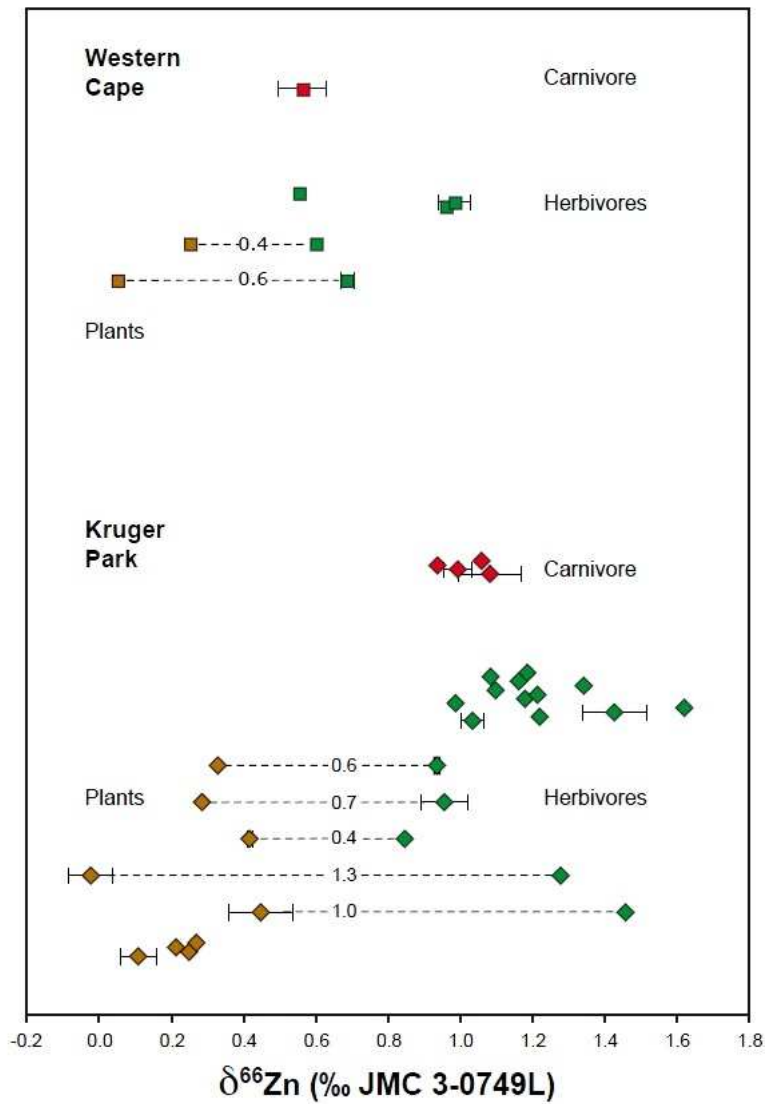


FIGURE A.2: $\delta^{66}\text{Zn}$ values in carnivores, herbivores and plants in KNP and WC. Errors bars are the 2σ deviation of replicates

of -0.14‰ and 0.19‰ . Therefore, there is no apparent Cu isotopic fractionation between plants and herbivores, but carnivores are highly ^{65}Cu -enriched relative to herbivores (Fig. A.3).

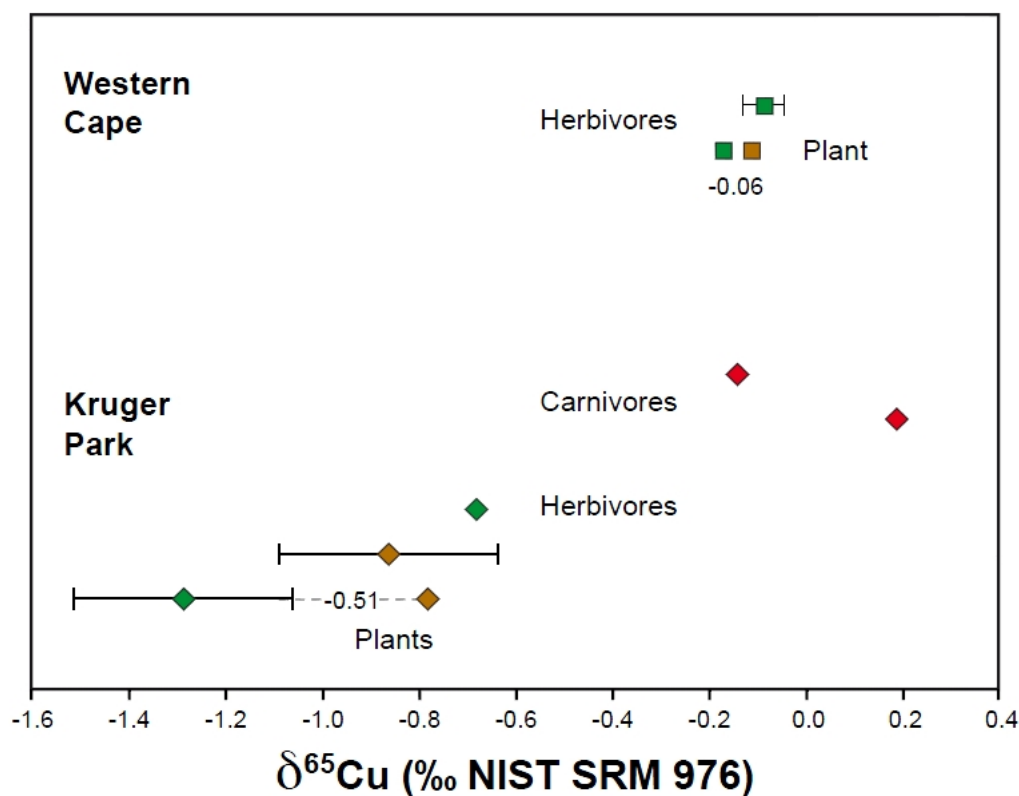


FIGURE A.3: $\delta^{65}\text{Cu}$ values in carnivores, herbivores and plants in KNP and WC. Errors bars are the 2σ deviation of replicates

3.3. Iron

The $\delta^{56}\text{Fe}$ and the $\delta^{57}\text{Fe}$ values fall on a mass fractionation line of slope 1.54 close to the theoretical value of 1.5, with an offset of 0.004. The Fe concentrations range from 1.6 to 311 $\mu\text{g/g}$ in bones and from 2080 to 5665 $\mu\text{g/g}$ in plants. Plants Fe isotopic compositions range from -0.08‰ to 0.19‰ at KNP and are not different from a single $\delta^{65}\text{Cu}$ value of 0.07‰ measured at WC. Herbivores are characterized by $\delta^{56}\text{Fe}$ values ranging from -0.61‰ to 0.44‰ at KNP, encompassing the single $\delta^{56}\text{Fe}$ value (-0.12‰) reported for WC. However, carnivores are ^{56}Fe -depleted relative to herbivores : at KNP, the $\delta^{56}\text{Fe}$ of carnivores ranges from -1.29‰ to -0.25‰ , and the only carnivore measured at WC has a $\delta^{56}\text{Fe}$ value of -0.89‰ . The $\delta^{56}\text{Fe}$ values of herbivores are therefore not fractionated relative to plants, while carnivores are (Fig. A.4).

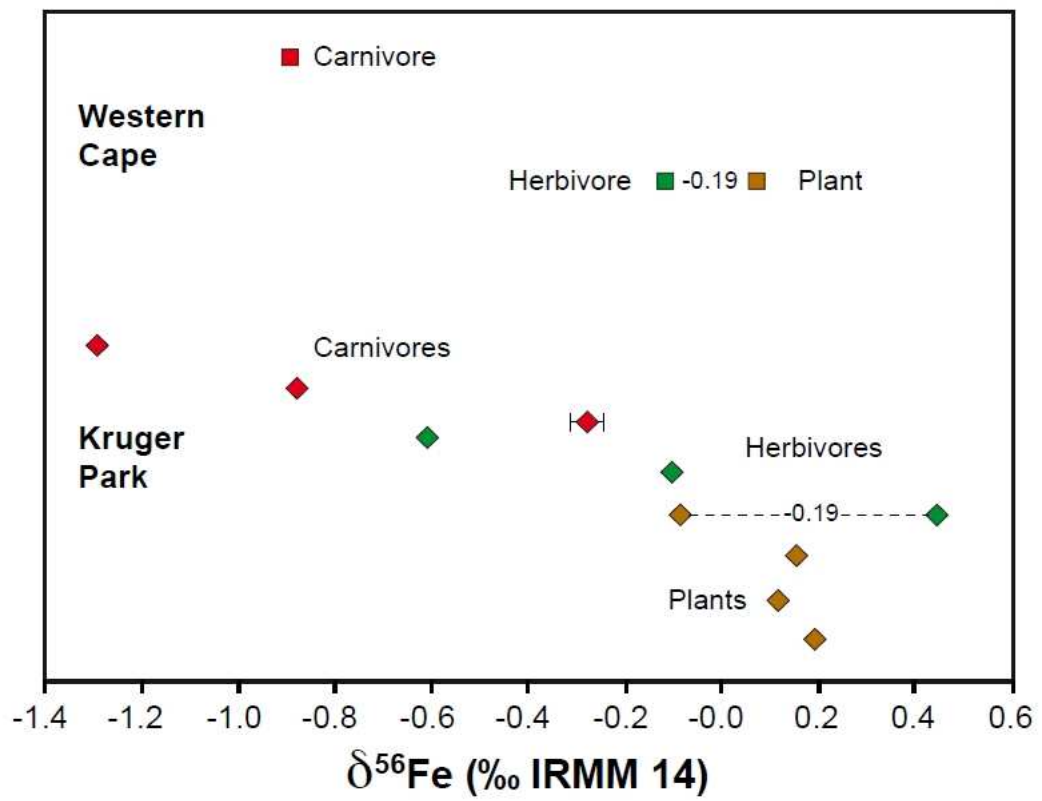


FIGURE A.4: $\delta^{56}\text{Fe}$ values in carnivores, herbivores and plants in KNP and WC. Errors bars are the 2σ deviation of replicates

4. Discussion

4.1. Regional metal isotopic signatures.

One of the most conspicuous features of the results is the consistency of the Zn, Cu and Fe isotopic distributions between the KNP and WC (Fig. 2 and 3). In both trophic chains, the bones of herbivores do not seem to be fractionated in Cu and Fe relative to plants, while they are ^{66}Zn -enriched, relative to plants. Moreover, in both trophic chains, the bones of carnivores are ^{65}Cu -enriched, ^{56}Fe -depleted, and ^{66}Zn -depleted, relative to bones of herbivores. Meanwhile, a Cu and a possible Zn isotopic offset exist between the KNP and WC for a given trophic step. For example, the "plant/herbivore's bones" trophic step at WC is ^{65}Cu -enriched by about 0.7‰ relative to the equivalent trophic step at KNP. Unfortunately, no bone of carnivore was measured at WC. This would have permit to test whether the carnivores at WC are shifted by 0.7‰ compared to those at KNP. For Zn, the observed isotopic offset is of lesser intensity, and could be due to the small number of analysis performed at WC. Nevertheless, the herbivores at WC are ^{66}Zn -depleted compared to the herbivores at KNP by about 0.33‰, and the sole carnivore at WC is ^{66}Zn -depleted by about 0.50‰ relative to those at KNP. Contrary to Cu and possibly Zn, there is no Fe isotopic offset between KNP and WC for a given trophic step.

It is likely that the Cu and Zn isotope signatures of plants are transferred up trophic chains. As we do not have measured the soils Cu and Zn isotope compositions of the KNP 10 and WC areas, it is not possible to state univocally whether the offset Cu and Zn isotope systematics at KNP and WC derived from distinct soils isotopic compositions. However, KNP and WC are characterized by different geological substrates. At KNP, the geological substrates are mainly composed by granites of the Murchinson Sequence and by the Lebombo Volcanic Group of the Karoo Sequence (Schutte, 1986), while those of WC are composed by sedimentary rocks of the Palaeozoic Cape Supergroup (Shone and Booth, 2005). Igneous rocks are characterized by $\delta^{65}\text{Cu}$ and $\delta^{66}\text{Zn}$ values close to 0‰ and 0.2-0.3‰, respectively (Li et al., 2009; Albarède, 2004; Maréchal et al., 2000), and sedimentary rock by $\delta^{65}\text{Cu}$ and $\delta^{66}\text{Zn}$ values both close to 0‰ (Albarède, 2004). The slight Zn isotopic offset between the KNP and WC trophic chains can be explained by the difference of Zn isotope compositions of igneous and sedimentary rocks. For Cu, the similar isotopic compositions of igneous and sedimentary rocks cannot explain the Cu isotopic offset between KNP and WC. We therefore speculate that differential Cu isotopic fractionations between soils and plants occur at KNP and WC. At KNP, there is a very long dry season resulting in a savanna landscape composed of grassland with scattered shrubs and isolated acacia trees. The climate is under oceanic influences at WC and is characterized by the fynbos biome, which comprises evergreen heathlands with fine leafed low shrubs and typical leafless tufted grasslike plants. The types of plants at KNP and WC are therefore very different, leading to possible distinct Cu uptake intensities and Cu isotopic fractionations.

4.2. Bodily isotopic fractionation

The distribution of the metal isotope compositions in the trophic chains is the result of isotopic fractionation processes that occur at the level of the organism. Data coming from animal experiments can shed light on the origin of the isotopic fractionations (Balter et al., 2010; Balter et al., submitted; Hotz et al., 2011). These are synthesized in Fig. 5.

Laboratory experiments on mammals fed a controlled diet give consistent results for sheep and mice (Balter et al., 2010; Balter et al., submitted). Bone and muscle have similar $\delta^{66}\text{Zn}$ values that are ^{66}Zn -enriched by about 0.2-0.3‰ relative to diet. Here, the ^{66}Zn -enrichment between the bone of an herbivore and the plants it consumed ($\Delta^{66}\text{Zn}_{p-b}$), exhibits values ranging from 0.4‰ to 1.3‰ with a mean $\Delta^{66}\text{Zn}_{p-b}$ value of 0.8 ± 0.4 ‰ (Fig. A.2). The origin of the discrepancy between natural and experimental $\Delta^{66}\text{Zn}_{p-b}$ is so far unknown, but should probably rely on the intra-plant Zn isotopic variability, which can exceed 1‰ (Weiss et al., 2005; Moynier et al., 2009). As the plants sampled into the teeth represent only what the animal ate the days before it died, the plants $\delta^{66}\text{Zn}$ values are a partial, and most probably heterogeneous, snapshot of the overall diet. The fact that bone and muscle are ^{66}Zn -enriched relative to diet predicts constant ^{66}Zn -enrichment up trophic chains (Fig. A.5). This predicted trophic ^{66}Zn -enrichment well exists between plants and bones of herbivores but not, surprisingly, between bones of herbivores and bones of carnivores. One mechanism can explain both observations. It involves a reduced bioavailability of Zn in the presence of inhibitory substances found in plant products, such as phytates (Lönnerdal, 2000). The partial binding of dietary Zn to phytate into the lumen might be associated with isotope fractionation processes during plant digestion by herbivores. This fractionation processes is not relevant for carnivores because of the absence of phytate in animal dietary products. Carnivores absorb quantitatively Zn and therefore resemble herbivores.

Experimental data on sheep and mice show that bone $\delta^{65}\text{Cu}$ values are consistently not fractionated relative to diet, while those of muscles are ^{65}Cu -depleted relative to diet (Balter et al., 2010; Balter et al., submitted; Fig. A.5). Therefore, a trophic ^{65}Cu -depletion is predicted to occur between bones of herbivores and bones of carnivores, but not between plants and bones of herbivores. Strikingly, the natural data shown here suggest the opposite, in other words, that bones of carnivores are ^{65}Cu -enriched, not ^{65}Cu -depleted, relative to bones of herbivores and plants. The similarity of the $\delta^{65}\text{Cu}$ values of plants and bones of herbivores argues for a quantitative absorption of Cu by herbivores, which is in contrast with the absorption of Zn. However, Zn-phytate complexes precipitate at pH characteristic of the gastrointestinal tract, whereas phytates complexes involving Cu do not (Champagne and Fisher, 1990; Lönnerdal, 1996). This can explain the lack of Cu isotopic fractionation during plants digestion. The origin of the ^{65}Cu -enrichment between herbivores and carnivores remains unsolved and requires further experimental investigations.

The progressive ^{56}Fe -depletion up trophic chain is expected since the whole body of mammal is ^{56}Fe -depleted relative the diet (Walczyk and von Blanckenburg, 2002;

Hotz et al., 2011). The Fe isotopic fractionation is likely to occur in the digestive tract, during the reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} by Fe-reductase (Andrews, 2005). The reduction of Fe, whether organic or inorganic, is accompanied by a depletion of the $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ ratio (Anbar et al., 2000). Because muscle is ^{56}Fe -depleted relative to bone, the bones of carnivores are ^{56}Fe -depleted compared to that of herbivores. The trophic distributions of the $\delta^{56}\text{Fe}$ values are therefore well predicted by experimental data (Fig. A.5).

5. Concluding remarks : a call for the study of metal isotope compositions in apatite along with C and N in collagen

Collagen C and N isotope compositions are routinely measured in archeology for paleodietary and paleoecological purposes. The measurement of the C and N isotope compositions in bone collagen involves the extraction of approximately 5 mg of collagen, which means that more than 200 mg of bone need to be dissolved for a comfortable measurement of the C and N isotopic ratios. After collagen extraction, the remaining mineral phase formed by apatite is discarded. This is regrettable because the wasted apatite material could be used for the study of the metal isotopic ratios. However, the collagen extraction protocol includes a demineralization step that uses HCl 1M (Tuross et al., 1988), resulting in the mixing of dissolved apatite and diagenetic phases, mainly calcite and oxyhydroxides that contain diagenetic metals (Kohn et al., 1999). A step should be envisaged to purify with a dilute acid the fossil apatite from exogenous phases prior to sample demineralization. The amount of apatite saved by this technique would be at least twice to four times more than necessary for the measurements of the metal isotope compositions, which is approximately 50 mg. The measurements of the Fe, Cu and Zn isotopic ratios along with those of C and N, will certainly give more constrained paleodietary and paleoecological reconstructions.

Acknowledgements

Many thanks are due to Teresa Kearney and the Ditsong National Museum of Natural History (formerly Transvaal Museum, Northern Flagship Institution), for facilitating access to the samples.

References

- ANBAR A.D., ROE J.E., BARLING J., NEALSON K.H. (2000) Nonbiological Fractionation of Iron Isotopes. *Science* 288, 126-128.
- ANDREWS N.C. (2005) Understanding heme transport. *N. Engl. J. Med.* 353, 2508-2509.
- ALBARÈDE F. (2004) The stable isotope geochemistry of copper and zinc. *Rev. Mineral. Geochem.* 55, 409-427.
- ALBARÈDE F. AND BEARD B.L. (2004) Analytical Methods for Non-Traditional Isotopes. *Rev. Mineral. Geochem.* 55, 113-152.

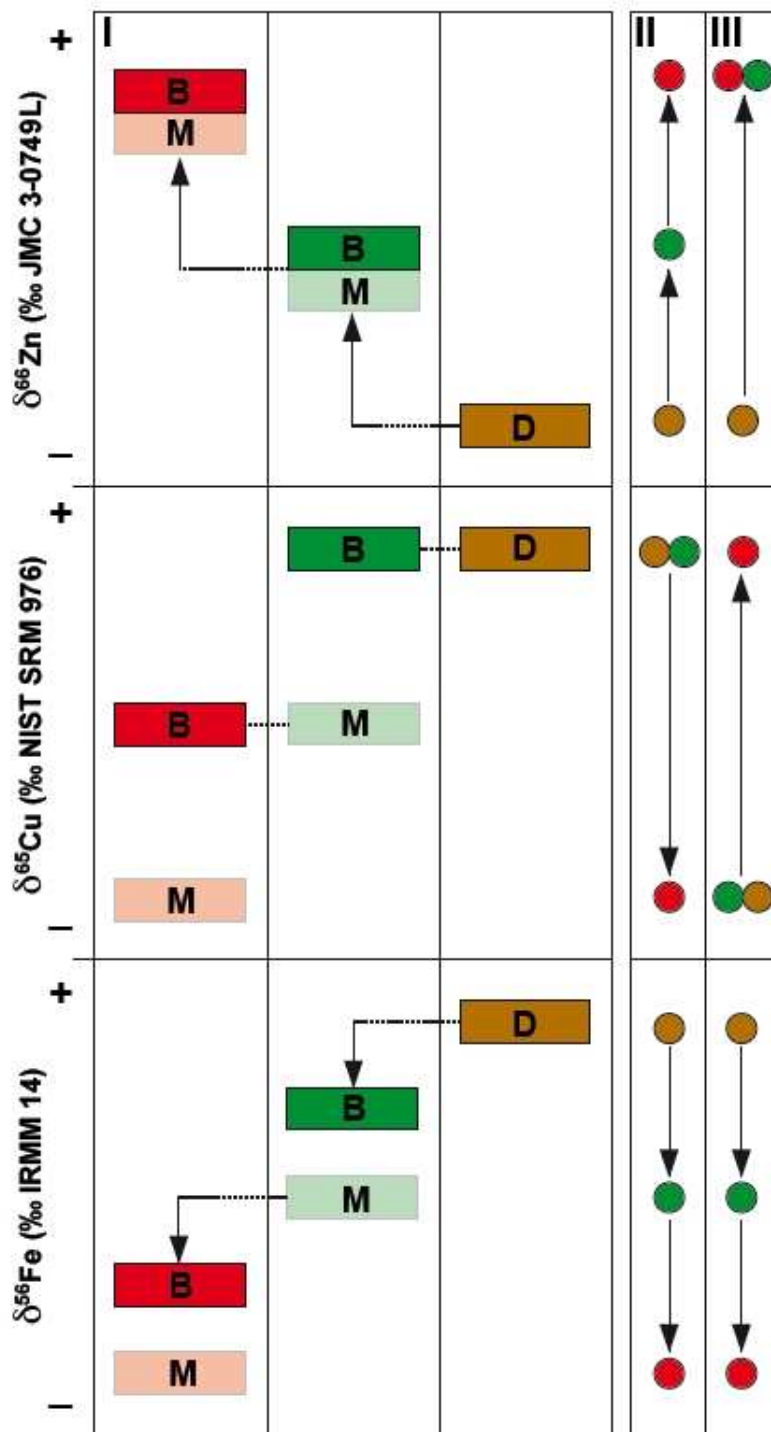


FIGURE A.5: Panel I : schematic distribution of the $\delta^{66}\text{Zn}$, $\delta^{65}\text{Cu}$ and $\delta^{56}\text{Fe}$ values in experimental animals (sheep and mice, Balter *et al.*, submitted), between diet (D), muscle (M) and bone (B). Muscle of herbivores has been assumed to be the dietary source for carnivores. Panel II : expected trophic Zn, Cu and Fe isotopic fractionations from bodily isotopic distributions. Panel III : observed trophic Zn, Cu and Fe isotopic fractionations

ALBARÈDE F., TÉLOUK P., LAMBOUX A., JAOUEN K., BALTER V. (2011) Isotopic evidence of unaccounted ^{329}Fe and ^{64}Cu erythropoietic pathways. *Metallomics* 3, 926-933.

BALTER V., ALBARÈDE F., TÉLOUK P., LAMBOUX A., JAOUEN K., ZAZZO A., MOLONEY A., SCHMIDT O., 331 MONAHAN F. (submitted) Isotopic mapping of iron, copper and zinc in mice and sheep. *J. Anal. At. Spectrom.*

BALTER V., ZAZZO A., MOLONEY A., MOYNIER F., SCHMIDT O., MONAHAN F., ALBARÈDE F. (2010) Bodily variability of zinc natural isotope abundances in sheep. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 605-612.

BEARD B.L. AND JOHNSON C.M. (1999) High precision iron isotope measurements of terrestrial and lunar materials. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63, 1653-1660.

BIGELEISEN J. AND GOEPPERT MAYER M. (1947) Calculation of equilibrium constants for isotopic exchange reactions. *J. Chem. Phys.* 15, 261-267.

CERLING T.E., WITTEMYER G., J.R. EHLERINGER, C.H. REMIEN, DOUGLAS-HAMILTON I. (2009) History of Animals using Isotope Records (HAIR) : A 6-year dietary history of one family of African elephants. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 8093-8100.

CHAMPAGNE E.T. AND FISHER M.S. (1990) Binding differences of Zn(II) and Cu(II) ions with phytate. *J. Inorg. Biochem.* 38, 217-223.

CLOQUET C., CARIGNAN J., LEHMANN M., VANHAECKE F. (2008) Variation in the isotopic composition of zinc in the natural environment and the use of zinc isotopes in biogeosciences : a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 392, 319-319.

DENIRO M.J. AND EPSTEIN S. (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta* 42, 495-506.

DENIRO M.J. AND EPSTEIN S. (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta* 45, 341-351.

GUELKE M. AND VON BLANCKENBURG F. (2007) Fractionation of stable iron isotopes in higher plants. *Env. Sci. Technol.* 41, 1896-1901.

HOTZ K., AUGSBURGER H., WALCZYK T. (2011) Isotopic signatures of iron in body tissues as a potential biomarker for iron metabolism. *J. Anal. At. Spectrom.* 26, 1347-1353.

JAOUEN K., BALTER V., LAMBOUX A., TÉLOUK P., ALBARÈDE F. (submitted) Menopause effects on iron and copper stable isotopes in erythrocytes and liver. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*

JAOUEN K., BALTER V., HERRSHER E., LAMBOUX A., TÉLOUK P., ALBARÈDE F. (online first) Fe and Cu stable isotopes in archeological human bones and their relationship to sex. *Am. J. Phys. Anthropol.*

JAHREN A. H. AND KRAFT R.A. (2008) Carbon and nitrogen stable isotopes in fast food : Signatures of corn and confinement. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 17855-17860.

JOUVIN D. ET AL. (2012) Stable isotopes of Cu and Zn in higher plants : evidence for Cu reduction at the root surface and two conceptual models for isotopic fractionation processes. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2652-2660.

KOHN M.J., SCHOENINGER M.J., BARKER W.W. (1999) Altered states : effects of diagenesis on fossil tooth chemistry. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63, 2737-2747.

LI W., JACKSON S.E., PEARSON N.J., ALARD O., CHAPPELL B.W. (2009) The Cu isotopic signature of granites from the Lachlan Fold Belt, SE Australia. *Chem. Geol.* 258, 38–49.

LÖNNERDAL B. (1996) Bioavailability of copper. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 821S-829S.

LÖNNERDAL B. (2000) Dietary Factors Influencing Zinc Absorption. *J. Nutr.* 130, 1378S- 1383S.

MARÉCHAL C., TÉLOUK P., ALBARÈDE F. (1999) Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chem. Geol.* 156, 251-273.

MARÉCHAL C., NICOLAS E., DOUCHET C., ALBARÈDE F. (2000) Abundance of zinc isotopes as a marine biogeochemical tracer. *Geochem Geophys Geosyst* 1.

MARÉCHAL C. AND ALBARÈDE F. (2002) Ion-exchange fractionation of copper and zinc isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66, 1499-1509.

MOYNIER F., PICHAT S., PONS M.L., BALTER V., FIKE D., ALBARÈDE F. (2009) Isotopic fractionation and transport mechanisms of Zn in plants. *Chem. Geol.* 267, 125-130.

PALMQVIST P., GRÖCKE D.R., ARRIBAS A. AND FARIÑA R. (2003) Paleocological reconstruction of a lower Pleistocene large mammal community using biogeochemical ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$, Sr :Zn) and ecomorphological approaches. *Paleobiology* 29, 205–229.

RICHARDS M.P. AND TRINKAUS E. (2009) Isotopic evidence for the diets of European Neanderthals and early modern humans. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 16034-16039.

SCHUTTE I.C. (1986) *The general geology of the Kruger National Park*. Koedoe 29, 13–37.

SHONE R.W. AND BOOTH P.W.K. (2005) The Cape Basin, South Africa : A review. *J. Afr. Earth Sci.* 43, 196–210

TUROSS N., FOGEL M.L., HARE P.E. (1988) Variability in the preservation of the isotopic composition of collagen from fossil bone *Geochim. Cosmochim. Acta* 42, 929-935.

WALCZYK T., VON BLANCKENBURG F. (2002) Natural Iron Isotope Variations in Human Blood. *Science* 295, 2065-2067.

WEINSTEIN C., MOYNIER F., WANG K., PANIELLO R., FORIEL J., CATALANO J., PICHAT S. (2011) Isotopic fractionation of Cu in plants. *Chem. Geol.* 286, 266-271.

WEISS D.J., MASON T.F.D., ZHAO F.J., KIRK G.J.D., COLES B.J., HORSTWOOD M.S.A. (2005) Isotopic discrimination of zinc in higher plants. *New Phytol.* 165, 703-710.

Annexe B

Données complémentaires des articles

- B.1 Article « *Fe and Cu stable isotopes in archeological human bones and their relationship to sex* »
- B.2 Article « *Iron and copper isotope budgets at menopause* »
- B.3 Article « *Basal metabolic rate, aging, and the Cu and Zn stable isotope compositions in blood of a remote Yakut population* »

Annexe B Données complémentaires des articles

#	Sex Assessment			Age assessment				$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	Mn	Fe	Cu	Zn
	Sex A	Sex B	Sex	Age	Age B	Age C	Age						
T01	M 91%	M 0.99	M	A	VI-VII	-	OA	-19.5	8.6	3	28	1.6	92
T02	M 91%	-	M		VI	>50	OA	-19.3	8.7	5	77	4.5	88
T03	M 91%	M 0.98	M		II-III	20-59	YA/MA	-19.6	7.6	2	22	0	75.6
T04*	M <91%	-	M*		IV-V	>30	MA/OA	-20.0	7.7	864	1474	9.3	163
T05	M 91%	M 1.00	M		VI-VII	>50	OA	-19.5	7.6	48	38	54.6	357
T06	M 91%	-	M		-	20-39	YA/MA	-19.4	10.5	23	45	5	70.4
T07	M 91%	-	M		VI-VII	-	OA	-19.3	8.0	26.5	293	42.9	292
T08	M 91%	-	M		VI-VII	-	OA	-19.7	7.5	14	63	6.8	47
T09	M 91%	ND/F	M	X	IV-V	-	YA	-19.7	7.2	183	204	65.2	353
		0.56											
T10*	M 91%	-	M		II	20-39	YA	-19.7	12.7	491	760	98	507
T12	M 91%	-	M	X	-	-	YA	-19.4	8.4	28.6	180	33.5	180
T13	M <91%	-	M*	X	II	>40	YA	-19.7	8.1	19.4	102	18.2	202
T15	M 91%	M 0.98	M		II	>40	U	-19.8	7.8	33	61	3.9	48.1
T16	F 91%	F 0.99	F		VI	>50	OA	-19.5	8.3	23.2	130	12.2	72.7
T17	F 91%	M 0.97	No		V	-	MA	-19.5	7.1	17.1	157	33.1	207
			sex										
T18	F 91%	-	F		III-IV	20-49	YA/MA	-19.6	7.6	2	64	-	-
T19	F 91%	F 0.96	F		VI-VII	>60	OA	-19.8	7.7	15	196	5.3	39.5
T20	F 91%	ND/M	F		-	-	U	-19.6	9.0	59.7	376	14.4	348
		0.91											
T21	F 91%	-	F		II	-	YA	-19.6	6.4	4.1	163	29.6	214
T22	F 91%	F 0.99	F		V-VI		MA/OA	-19.1	9.9	47	289	18.4	208
T23	F <91%	-	F*		IV	>50	MA/OA	-19.2	10.9	11.9	291	68	355
T24	F 95%	F 1.00	F		V	-	MA	-20.0	8.2	0	560	41.2	214
T25	F 91%	-	F		IV-V	30-59	MA/OA	-19.9	7.9	6.8	56	20.7	116
T26	M 95%	-	M		IV-V	-	MA	-19.4	9.0	23.2	237	7.6	243
T27	M 91%	-	M		VI-VII	-	OA	-19.5	7.9	0	524	4.8	39.8
T28	M 91%	-	M		V	>30	MA/OA	-20.1	6.5	4.5	35	17.1	189
T29	M 91%	M 1.00	M		II-III	-	YA	-19.6	9.0	17.7	139	20.7	257
T30	M 95%	M 1.00	M		II-III	20-29	YA	-19.2	8.2	9.6	171	80.9	280
T31	M 95%	M 1.00	M		VI	-	OA	-19.7	10.1	12.1	122	19.2	194
T32	M <91%	-	M*		III-II	-	YA	-19.9	9.5	4.1	48	22.5	127
T33	M 91%	-	M		V-VI	>50	MA/OA	-19.6	8.2	5.5	89	31	-
T34*	M 91%	M 0.99	M		III-IV	-	YA/MA	-19.0	8.9	7.1	278.2	31	493.5

TABLE B.1: Individual anthropological information, carbon and nitrogen isotopic ratios and concentration data. (Sex A : Bruzek 2002, result associated with percentage of correct diagnosis ; Sex B : Murail et al 2005, result associated with the posterior probability; Sex : Sex retained ; * : Probable sex. Age A : no fusion of spheno-occipital synchondrosis, iliac crest and/or medial extremity of clavicle ; Age B : Lovejoy et al 1985 ; Age C : Schmitt 2005 ; Age : Age groups are Young adult (YA=under 35 years old), Mature adult (MA=between 35 and 45 years old), Old adult (OA=more than 45 years old) and Unknown (U). # : * and italic = individual rejected.

B.3 Article « Basal metabolic rate, aging, and the Cu and Zn stable isotope compositions in blood of a remote Yakut population »

#	Sex Assessment			Age Assessment				$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	Mn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Zn (ppm)
	Sex A	Sex B	Sex	Age A	Age B	Age C	Age						
T35	M <91%	-	M*		IV	-	MA	-19.5	8.6	0	66	9.2	115
T36	F 91%	ND/ F 0.88	F		III	20-39	MA	-19.4	9.2	4.8	83	23.1	188
T37	M 91%	M 1.00	M		IV-V	-	MA	-19.6	8.8	10.8	37	-	253
T38	M 91%	M 0.99	M		VII	-	OA	-19.7	8.2	0	33	12.1	119
T39	M 91%	-	M		IV-V	-	MA	-19.8	6.8	2	158	29.8	150
T41	M 91%	-	M		-	-	MA/OA	-19.9	8.7	7.9	126	60.1	340
T42	M 91%	-	M		III	20-49	YA/MA	-19.5	9.1	0.1	50	6.8	186
T43	F 91%	F 1.00	F		IV-V	-	MA	-19.5	9.8	9.9	267	43	-
T44	F 91%	-	F	X	III-IV	-	YA	-19.5	7.8	15.5	396	92.8	351
T45	M 91%	M 0.96	M		VI-VII	>50	OA	-19.3	10.7	12.1	233	17	232
T46	F 91%	-	F	X	II	-	YA	-20.2	6.6	39.3	340	31.3	162
T47	F 91%	F 0.99	F		II-III	-	YA	-19.8	8.0	3.4	58	10.3	161
T48	F 91%	F 1.00	F		II	-	YA	-19.5	8.9	5.2	88	9	164
T49*	F 91%	ND/ F 0.86	F		V	20-59	YA/MA	-20.0	7.5	4	55	584	537
T50*	F 91%	-	F		-	-	U	-19.6	8.4	21.4	585	118	457

TABLE B.2: suite : Individual anthropological information, carbon and nitrogen isotopic ratios and concentration data. (Sex A : Bruzek 2002, result associated with percentage of correct diagnosis; Sex B : Murail et al 2005, result associated with the posterior probability; Sex : Sex retained; * : Probable sex. Age A : no fusion of spheno-occipital synchondrosis, iliac crest and/or medial extremity of clavicle; Age B : Lovejoy et al 1985; Age C : Schmitt 2005; Age : Age groups are Young adult (YA=under 35 years old), Mature adult (MA=between 35 and 45 years old), Old adult (OA=more than 45 years old) and Unknown (U). # : * and italic = individual rejected.

Annexe B Données complémentaires des articles

Sample name	$\delta^{65}\text{Cu}$	2SD	$\delta^{56}\text{Fe}$	2SD	$\delta^{57}\text{Fe}$	2SD	$\delta^{66}\text{Zn}$	2SD	$\delta^{67}\text{Zn}$	2SD	$\delta^{68}\text{Zn}$	2SD
T01	-	-	-1.48	0.12	-2.15	0.21	0.61	0.1	1.0	0.41	1.21	0.29
T02	-	-	-0.16	0.22	-0.22	0.37	-	-	-	-	-	-
T03	-	-	-0.2	0.23	-0.4	0.3	-	-	-	-	-	-
T05	-0.09	0.09	-0.46	0.23	-0.57	0.3	0.8	0.09	1.19	0.41	1.58	0.29
T06	0.02	0.06	-0.6	0.17	-1.0	0.31	0.66	0.08	0.87	0.26	1.23	0.17
T07	0.02	0.08	-0.13	0.16	-0.17	0.28	0.88	0.08	1.49	0.38	1.8	0.14
T08	-	-	-0.29	0.16	-0.5	0.26	-	-	-	-	-	-
T09	-0.09	0.08	-1.0	0.09	-1.41	0.23	0.78	0.05	1.4	0.3	1.54	0.15
T12	-0.14	0.07	-0.6	0.13	-0.89	0.23	0.74	0.06	1.12	0.26	1.5	0.17
T13	-0.2	0.11	-0.94	0.22	-1.51	0.4	-	-	-	-	-	-
T15	-	-	-1.08	0.22	-1.51	0.4	-	-	-	-	-	-
T16	-0.18	0.08	-0.08	0.12	-0.17	0.18	0.86	0.08	1.34	0.26	1.63	0.17
T17	-0.06	0.08	-0.23	0.1	-	-	0.74	0.08	1.15	0.38	1.48	0.14
T18	-	-	0.36	0.15	0.53	0.25	-	-	-	-	-	-
T19	-0.17	0.08	-0.24	0.22	-0.41	0.55	0.87	0.08	1.2	0.26	1.72	0.17
T20	-0.07	0.06	0.08	0.25	0.17	0.35	0.78	0.08	1.22	0.38	1.54	0.14
T21	-0.1	0.09	-0.34	0.22	-0.49	0.55	0.88	0.09	1.13	0.28	1.54	0.15
T22	-0.2	0.11	-0.07	0.09	-0.1	0.2	0.53	0.08	0.82	0.26	1.13	0.17
T23	-0.42	0.08	-0.36	0.16	-0.47	0.28	0.74	0.08	1.13	0.26	1.44	0.17
T24	-0.42	0.09	-0.12	0.09	-0.16	0.23	0.78	0.08	1.06	0.26	1.54	0.17
T25	-0.32	0.09	-0.46	0.13	-0.65	0.19	0.55	0.09	0.83	0.4	1.26	0.2
T26	-0.14	0.11	-0.27	0.22	-0.42	0.55	0.88	0.08	1.49	0.38	1.8	0.14
T27	-	-	-0.13	0.15	-0.21	0.25	0.71	0.18	0.83	0.35	1.28	0.36
T28	-0.21	0.04	0.48	0.15	0.66	0.25	-	-	-	-	-	-
T29	-0.13	0.09	-0.7	0.15	-0.99	0.25	0.86	0.08	1.33	0.28	1.6	0.15
T30	0.03	0.08	-1.12	0.13	-1.71	0.23	0.91	0.08	1.38	0.38	1.76	0.14
T31	-	-	-0.31	0.13	-0.49	0.23	-	-	-	-	-	-
T32	-0.1	0.07	-0.36	0.13	-0.54	0.23	0.94	0.07	1.27	0.3	1.87	0.2
T33	-	-	0.37	0.22	0.63	0.33	-	-	-	-	-	-
T35	-0.13	0.09	-0.34	0.13	-0.47	0.2	0.85	0.09	1.27	0.2	1.53	0.15
T36	-0.08	0.09	-0.86	0.13	-1.31	0.23	0.72	0.09	1.1	0.33	1.38	0.13
T37	-	-	-0.48	0.07	-0.66	0.19	-	-	-	-	-	-
T38	-0.09	0.09	-0.54	0.08	-0.71	0.15	0.74	0.06	1.04	0.26	1.42	0.17
T39	-0.15	0.09	-0.54	0.23	-0.8	0.38	0.82	0.09	1.23	0.28	1.47	0.15
T40	-0.26	0.11	-0.45	0.25	-0.76	0.52	0.72	0.08	1.07	0.26	1.36	0.17
T41	-0.04	0.09	-0.14	0.13	-0.19	-0.13	0.95	0.09	1.27	0.4	1.83	0.2
T42	-0.12	0.09	-0.47	0.13	-0.66	0.2	1.01	0.09	1.41	0.4	1.98	0.2
T43	-	-	0.38	0.12	0.55	0.21	-	-	-	-	-	-
T44	-0.13	0.09	0.39	0.07	0.59	0.18	0.9	0.09	1.18	0.28	1.73	0.15
T45	-0.14	0.09	-0.21	0.13	-0.32	0.2	0.69	0.09	0.99	0.28	1.31	0.15
T46	-0.28	0.09	-0.15	0.07	-0.27	0.18	0.68	0.09	1.06	0.38	1.29	0.14
T47	-0.14	0.09	-0.03	0.25	-0.16	0.37	0.94	0.09	1.37	0.33	1.81	0.13
T48	-	-	-0.23	0.15	-0.36	0.25	-	-	-	-	-	-

TABLE B.3: Isotopic data for bone samples

B.3 Article « Basal metabolic rate, aging, and the Cu and Zn stable isotope compositions in blood of a remote Yakut population »

Id	Sex	Age	AM	$\Delta A-AM$	GS
M1	H	60	NA	NA	A1
M2	H	62	NA	NA	A1
M3	F	55	53	2	O
M4	F	56	49	7	O
M5	H	64	NA	NA	A1
M6	H	65	NA	NA	O
M7	H	61	NA	NA	A1
M8	H	64	NA	NA	A1
M9	H	62	NA	NA	A2
M10	H	61	NA	NA	A2
M11	F	63	56	7	NA
M12	F	58	40	18	A1
M13	F	55	51	4	O
M14	H	65	NA	NA	O
M15	H	65	NA	NA	A1
M16	H	62	NA	NA	A
M17	H	60	NA	NA	A2
M18	H	63	NA	NA	O
M19	H	64	NA	NA	O
M20	H	63	NA	NA	O
M28	F	60	55	5	A1
M29	F	62	50	12	O
M30	F	65	52	13	O
M31	F	61	53	8	A1
M32	F	60	50	10	B
M33	F	59	54	5	A
M34	F	62	52	10	O
M35	F	66	52	14	O
M36	F	60	55	5	A1
M37	F	62	48	14	B
M38	F	64	53	11	A
M39	F	63	51	12	O
M40	F	64	55	9	B
M41	F	63	55	8	O

TABLE B.4: Sex, age, age at menopause (AM) and blood type groups of volunteers (GS) older than 50 y.o. $\Delta A-AM$ corresponds to the number of years since the menopause

Id	sexe	Age	GS	$\delta^{65}\text{Cu}^*$	$\delta^{66}\text{Zn}^*$	$\delta^{56}\text{Fe}^*$	[Cu]ppm	[Zn]ppm	[Fe]ppm
A1	F	32	A1	0,40	0,44	-2,03	1,82	25	3025
A2	F	19	A	0,08	0,54	-2,44	1,50	20	2297
A3	F	20	O	0,70	0,48	-2,45	1,64	28	3025
A4	F	20	B	-0,04	0,51	-2,54	3,42	33	2759
A5	F	19	O	0,41	0,38	-2,19	2,27	29	3442
A6	F	19	O	0,21	0,44	-2,54	1,36	17	2686
A7	F	21	A	0,60	0,55	-2,38	1,95	22	4290
A8	F	20	O	0,73	0,31	-2,52	2,41	69	3753
A9	F	20	B	0,39	0,35	-2,54	2,54	42	3744
A10	F	20	A	0,52	0,29	-2,47	2,36	36	3372
A11	F	31	A	0,65	0,51	-2,24	1,79	34	3036
A12	F	22	O	0,31	0,34	-2,51	1,97	30	1863
A13	F	22	AB	0,52	0,35	-2,43	2,69	53	4146
A14	F	32	A	0,74	0,39	-2,65	2,02	32	2940
A15	F	34	A	0,80	0,45	-2,99	1,45	21	2374
A16	F	21	O	0,29	0,61	-2,43	3,49	41	2650
A17	F	19	O	0,23	0,46	-2,84	2,56	30	3554
A18	F	22	A1	0,21	0,40	-2,44	2,22	24	3412
A19	F	19	B	0,57	0,49	-2,62	2,23	42	4361
A20	F	21	O	0,62	0,55	-2,28	1,26	16	3135
A21	F	20	A	0,16	0,45	-2,45			
A22	F	19	A	0,37	0,50	-2,52			
A23	F	20	A	0,76	0,55	-2,63			
A24	F	20	A	0,45	0,54	-2,56			
A25	F	21	O	0,69	0,53	-2,55			
A48	F	28	B	0,18		-2,36			
A49	F	38	B	-0,03		-2,15			
A50	F	31	B	0,49		-2,48			

TABLE B.5: Sex, age and blood type groups of volunteers (GS), isotopic and elemental data in RBC of individuals younger than 40 y.o. * Data from Albarède *et al.* (2011)

B.3 Article « Basal metabolic rate, aging, and the Cu and Zn stable isotope compositions in blood of a remote Yakut population »

Id	sexe	Age	GS	$\delta^{65}\text{Cu}^*$	$\delta^{66}\text{Zn}^*$	$\delta^{56}\text{Fe}^*$	[Cu]ppm	[Zn]ppm	[Fe]ppm
A26	M	25	B	0,62	0,48	-3,01	2,42	44	3193
A27	M	35	O	0,59	0,48	-2,73	1,75	25	3473
A28	M	18	O	0,71	0,41	-2,62	2,01	27	2928
A29	M	18	O	0,69	0,74	-2,84	1,08	15	3372
A30	M	35	B	0,83	0,45	-2,36	2,30	38	3441
A31	M	20	O	0,52	0,59	-2,74	1,72	28	3227
A32	M	22	B	0,81	0,56	-3,08	1,79	25	3091
A33	M	25	O	0,39	0,53	-2,63	1,32	45	2276
A34	M	22	A	0,83	0,53	-2,70	1,79	28	3362
A35	M	20	B	0,86	1,25	-2,94	1,51	23	3253
A36	M	19	B	0,82	0,59	-2,69	2,02	29	3080
A37	M	21	A	0,33	0,20	-3,08	1,51	29	3426
A38	M	22	A	0,70	0,24	-2,59	1,68	23	2932
A39	M	22	O	0,70	0,17	-2,59	1,78	25	3159
A40	M	21	O	0,85	0,34	-2,66	1,86	31	2654
A41	M	21	A	0,91	0,38	-2,75	1,78	25	3049
A42	M	25	O	0,66	0,39	-2,83	1,62	23	2709
A43	M	22	A	0,75	0,27	-2,63	2,04	45	4422
A44	M	19	A	0,55	0,43	-2,74	2,03	36	2920
A45	M	20	O	0,70	0,36	-2,58	1,25	17	2284
A46	M	21	B	0,77	0,32	-2,99			
A47	M	24	AB	0,23	0,49	-2,86			

TABLE B.6: Sex, age and blood type groups of volunteers (GS), isotopic and elemental data in RBC of individuals younger than 40 y.o. * Data from Albarède *et al.* (2011)

Id	$\delta^{65}\text{Cu}$	SD_{sam}	SD_{std}	Np	Na	$\delta^{56}\text{Fe}$	$\delta^{57}\text{Fe}$	SD_{sam}	SD_{std}	Np	Na	$\delta^{66}\text{Zn}$	$\delta^{67}\text{Zn}$	$\delta^{68}\text{Zn}$	SD_{sam}	SD_{std}	Np	Na
Y01	-0,32		0,05	1	1	-2,97	-4,29	0,04	0,09	2	5	0,70	1,10	1,34	0,13	0,07	2	2
Y02	-0,85		0,14	1	1	-2,42	-3,84	0,08	0,09	2	3	0,81	1,15	1,64	0,09	0,05	2	2
Y03	-0,27		0,05	1	1	-2,47	-3,64	0,04	0,07	1	2	0,72	1,10	1,48	0,03	0,06	2	4
Y04	-0,38	0,11	0,07	3	3	-3,12	-4,72	0,06	0,12	2	4	0,70	1,09	1,37		0,04	1	1
Y05	-0,87	0,08	0,11	2	2	-2,92	-4,32	0,00	0,07	1	2	0,78	1,24	1,58	0,05	0,07	2	4
Y06	-1,01		0,04	1	1	-2,65	-3,67	0,01	0,12	1	2	0,81	1,11	1,59		0,03	1	1
Y07	-0,75		0,06	1	1	-2,74	-4,09	0,01	0,08	1	2	0,62	1,01	1,18	0,02	0,05	1	2
Y08	-0,31		0,05	1	1	-2,94	-4,64	0,04	0,08	2	4	0,74	0,92	1,47	0,03	0,05	1	2
Y09	-1,09		0,07	1	1	-3,16	-4,65	0,13	0,08	2	4	0,84	1,30	1,64		0,06	1	1
Y10	-1,02		0,06	1	1	-1,96	-2,88	0,01	0,07	2	3	0,74	1,01	1,47	0,01	0,07	1	2
Y11	-0,62		0,14	1	1	-2,20	-3,08	0,06	0,06	1	2	0,78	1,01	1,54	0,14	0,07	1	2
Y12	-0,47		0,05	1	1	-2,57	-3,92	0,10	0,06	1	2	0,53	0,80	0,99	0,09	0,07	2	3
Y13	-0,24		0,09	1	1	-2,72	-4,00	0,14	0,06	2	4	0,57	0,69	1,09		0,08	1	1
Y14	-0,59	0,07	0,09	3	3	-2,87	-4,40	0,06	0,06	2	4	0,70	1,10	1,31	0,02	0,06	1	2
Y15	-0,50		0,07	1	1	-2,53	-3,75	0,01	0,07	2	3	0,71	1,03	1,39	0,15	0,07	1	2
Y16	-0,58		0,07	3	3	-2,80	-4,43	0,01	0,07	2	3	0,86	1,38	1,64		0,06	1	1
Y17	-0,98	0,03	0,09	3	3	-1,13	-1,66	0,16	0,07	2	3	0,82	1,15	1,59	0,02	0,09	1	2
Y18	-0,39		0,14	1	1	-2,69	-3,99	0,11	0,04	1	2	0,91	1,21	1,79		0,06	1	1
Y19	-0,47		0,06	1	1	-3,08	-4,50		0,08	1	1	0,66	1,02	1,27	0,01	0,09	1	2
Y20	-0,49	0,10	0,08	2	2	-2,51	-3,71	0,02	0,07	1	2	0,74	1,15	1,54		0,08	1	1
Y21	-0,93		0,05	1	1	-2,22	-3,29	0,00	0,04	1	2	0,75	0,62	1,42		0,05	1	1
Y22	-0,92		0,05	1	1	-2,38	-3,47	0,04	0,08	1	2	0,84	0,87	1,63		0,05	1	1
Y23	-0,22	0,16	0,07	2	2	-1,74	-2,57	0,23	0,07	1	3	0,78	1,21	1,56		0,08	1	1
Y24	-0,64		0,06	1	1	-2,78	-4,11		0,06	1	1	0,36	0,68	0,68		0,05	1	3
Y25	-0,65	0,03	0,05	3	3	-2,66	-3,92		0,06	1	1	0,59	0,05	0,73	0,02	0,05	1	2
Y26	-0,80	0,05	0,05	2	2	-2,66	-3,96		0,06	1	1	0,44	0,47	0,87	0,01	0,04	1	1
Y27	-1,11		0,06	1	1	-2,98	-4,41		0,06	1	1	0,69	1,03	1,35		0,04	1	1
Y28	-0,54	0,06	0,06	2	2	-2,55	-3,77		0,04	1	2	0,62	0,65	1,39	0,03	0,05	1	2
Y29	-0,68	0,03	0,12	1	2	-2,99	-4,37		0,18	1	1	-	-	-	-	-	-	-

TABLE B.7: Isotopic data of blood from French and Yakut individuals for transition metals. Np : number of replicates for the entire protocol, Na : number of isotopic measurements for all the replicates.

Id	$\delta^{65}\text{Cu}$	SD_{sam}	SD_{std}	Np	Na	$\delta^{56}\text{Fe}$	$\delta^{57}\text{Fe}$	SD_{sam}	SD_{std}	Np	Na	$\delta^{66}\text{Zn}$	$\delta^{67}\text{Zn}$	$\delta^{68}\text{Zn}$	SD_{sam}	SD_{std}	Np	Na
Y30	-0,31		0,06	1	1	-2,73	-4,05	0,04	0,06	2	4	0,77	1,65	1,42	0,01	0,06	2	2
Y31	-0,29			1	1	-3,14	-4,62		0,08	1	1	0,64	1,23	1,23		0,04	1	1
Y32	-0,54	0,04	0,12	1	2	-2,99	-4,41	0,07	0,04	1	2	0,82	1,17	1,60		0,06	1	1
Y33	-1,36		0,06	1	1	-2,36	-3,57	0,03	0,04	1	2	0,83	1,21	1,68		0,05	1	1
Y34	-0,59		0,06	1	1	-2,75	-4,01	0,01	0,08	1	2	0,64	0,89	1,28	0,02	0,05	1	3
Y35	-1,37	0,15	0,06	2	3	-2,59	-3,76		0,07	1	1	0,79	1,17	1,67	0,02	0,05	1	3
Y36	-0,88		0,09	1	1	-2,98	-4,45		0,10	1	1	0,20	0,70	0,77		0,05	1	1
Y37	-0,49		0,06	1	1	-2,50	-3,69	0,00	0,08	1	2	0,70	1,00	1,34		0,05	1	2
Y38	-1,14		0,06	1	1	-2,63	-3,85	0,01	0,06	1	2	0,75	1,14	1,50		0,05	1	2
Y39	-0,92		0,09	1	1	-2,32	-3,45		0,06	1	2	0,66	1,03	1,29		0,05	1	1
B	-0,02	0,10	0,05	7	7	-2,47	-3,25	0	0,06	1	2	0,37	0,74	0,83	0,08	0,06	6	10
D	0,10	0,06	0,05	2	2	-2,4	-3,74		0,10	1	1	0,46	0,65	1,27		0,04	1	1
E	-0,19		0,06	1	1	-2,48	-3,87	0,08	0,07	2	3	0,52	0,72	1,2		0,04	1	1
K	0,27		0,06	1	1	-2,25	-3,31		0,10	1	1	0,09	0,25	0,11		0,1	1	1
L1	0,04		0,07	1	1	-2,90	-4,43	0,04	0,07	1	13	0,45	0,69	0,87		0,05	1	1

TABLE B.8: Suite : Isotopic data of blood from French and Yakut individuals for transition metals. Np : number of replicates for the entire protocol, Na : number of isotopic measurements for all the replicates.

Id	$\delta^{15}\text{N}$	SD_{sam}	SD_{std}	Np	Na	$\delta^{13}\text{C}$	SD_{sam}	SD_{std}	Np	Na
Y01	9,66	0,32	0,20	3	3	-24,42	0,29	0,20	3	3
Y02	9,94	0,15	0,20	3	3	-23,96	0,02	0,20	3	3
Y03	9,37	0,25	0,20	3	3	-23,72	0,16	0,20	3	3
Y04	9,07	0,10	0,20	3	3	-23,25	0,09	0,20	3	3
Y05	9,65	0,15	0,20	3	3	-23,90	0,26	0,20	3	3
Y06	9,39	0,21	0,20	3	3	-24,16	0,39	0,20	3	3
Y07	10,09	0,28	0,20	3	3	-24,11	0,43	0,20	2	2
Y08	9,89	0,20	0,20	3	3	-23,75	0,13	0,20	3	3
Y09	9,18	0,05	0,20	2	2	-22,60	0,12	0,20	2	2
Y10	9,45	0,41	0,20	3	3	-23,29	0,08	0,20	3	3
Y11	9,86	0,20	0,20	2	2	-23,17	0,31	0,20	2	2
Y12	9,88	0,06	0,21	3	3	-24,67	0,72	0,23	3	3
Y13	9,38	0,18	0,21	3	3	-23,55	0,28	0,23	3	3
Y14	9,28	0,17	0,21	3	3	-23,98	0,37	0,23	2	2
Y15	9,18	0,26	0,21	3	3	-23,25	0,65	0,23	3	3
Y16	9,82	0,05	0,21	3	3	-23,81	0,18	0,23	3	3
Y17	10,09	0,08	0,21	3	3	-24,30	0,30	0,23	3	3
Y18	9,87	0,22	0,21	3	3	-23,93	0,36	0,23	3	3
Y19	9,56	0,48	0,21	3	3	-24,81	0,94	0,23	3	3
Y20	9,69	0,23	0,21	3	3	-24,09	0,32	0,23	3	3
Y21	9,68	0,12	0,21	3	3	-24,53	0,40	0,23	3	3
Y22	9,86	0,26	0,21	3	3	-24,30	0,42	0,23	3	3
Y23	11,02	0,16	0,21	3	3	-24,41	0,49	0,23	3	3
Y24	10,07	0,04	0,21	3	3	-23,35	0,27	0,23	3	3
Y25	9,81	0,01	0,21	3	3	-24,32	0,19	0,23	3	3
Y26	10,26	0,10	0,21	3	3	-23,96	0,30	0,23	3	3
Y27	10,57	0,10	0,21	3	3	-24,71	0,30	0,23	3	3
Y28	9,22	0,03	0,21	3	3	-23,90	0,08	0,23	3	3

TABLE B.9: Isotopic data of blood from French and Yakut individuals for carbon and nitrogen

B.3 Article « Basal metabolic rate, aging, and the Cu and Zn stable isotope compositions in blood of a remote Yakut population »

Id	$\delta^{15}\text{N}$	SD_{sam}	SD_{std}	Np	Na	$\delta^{13}\text{C}$	SD_{sam}	SD_{std}	Np	Na
Y29	10,24	0,37	0,13	3	3	-24,33	0,03	0,20	2	2
Y30	10,48	0,21	0,13	3	3	-24,22	0,11	0,20	2	2
Y31	9,95	0,13	0,13	3	3	-24,14	0,25	0,20	3	3
Y32	10,42	0,08	0,13	3	3	-24,74	0,25	0,20	3	3
Y33	9,74	0,31	0,13	3	3	-25,08	0,42	0,20	2	2
Y34	9,69	0,25	0,13	3	3	-24,70	0,36	0,20	3	3
Y35	10,29	0,24	0,13	2	2	-25,09	0,35	0,20	3	3
Y36	9,32	0,09	0,13	3	3	-23,79	0,04	0,20	3	3
Y37	9,53	0,34	0,13	3	3	-24,20	0,73	0,20	3	3
Y38	10,58	0,05	0,13	3	3	-24,14	0,64	0,20	2	2
Y39	9,71	0,27	0,13	3	3	-23,73	0,27	0,20	2	2
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L1	8,61	0,11	0,13	3	3	-23,00	0,12	0,20	3	3

TABLE B.10: suite :Isotopic data of blood from French and Yakut individuals for carbon and nitrogen

Annexe B Données complémentaires des articles

Id	Sexe	Menopausal status	Age	Age group
Y1	M		57	MA
Y2	F	Postmenopause	52	MA
Y3	F	Premenopause	32	YA
Y4	M		18	YA
Y5	M		31	YA
Y6	F	Postmenopause	58	MA
Y7	F	Premenopause	43	MA
Y8	F	Premenopause	47	MA
Y9	F	Postmenopause	74	OA
Y10	M		31	YA
Y11	M		54	MA
Y12	F	Premenopause	36	YA
Y13	F	Premenopause	19	YA
Y14	F	Postmenopause	55	MA
Y15	F	Premenopause	18 ?	YA
Y16	F	Premenopause	46	MA
Y17	F	Postmenopause	46	MA
Y18	F	Postmenopause	47	MA
Y19	F	Premenopause	23	YA
Y20	F	Premenopause	44	MA
Y21	M		69	OA
Y22	F	Postmenopause	63	OA
Y23	F	Premenopause	44	MA
Y24	F	Postmenopause	45	MA
Y25	F	Postmenopause	50	MA
Y26	F	Premenopause	38	YA
Y27	F	Postmenopause	57	MA
Y28	F	Premenopause	50	MA
Y29	M		52	MA
Y30	F	Postmenopause	52	MA
Y31	F	Premenopause	39	YA
Y32	F	Postmenopause	51	MA
Y33	F	Postmenopause	60	OA
Y34	F	Premenopause	25	YA
Y35	F	Postmenopause	75	OA
Y36	F	Premenopause	22	YA
Y37	F	Premenopause	46	MA
Y38	M		55	MA
Y39	F	Premenopause	28	YA

TABLE B.11: Sex, hormonal status, age and age group of volunteers.

French				
Id	Sexe	Menopausal status	Age	Age group
B	F	Premenopause	26	YA
D	F	Premenopause	25	YA
E	F	Premenopause	25	YA
K	F	Premenopause	27	YA
L1	M		39	YA

TABLE B.12: Suite : Sex, hormonal status, age and age group of volunteers.

Annexe C

Tableaux des données non publiées

Tableaux disponibles dans la version du manuscrit archivée, mais indisponibles pour la diffusion.

Annexe D

Informations et discussions complémentaires

D.1 Partie III : Diagenèse et ossements de Saint-Laurent

L'analyse isotopique ou élémentaire de restes archéologiques pose le problème majeur d'une potentielle intégration des éléments du sédiment dans les objets d'étude qui efface leur composition biologique. En effet, suite à l'enfouissement d'un cadavre, les os subissent un certain nombre de réactions chimiques liées à la décomposition du corps, aux modifications de l'acidité, et aux circulations de fluides du sol [Price *et al.*, 1992]. La cristallinité de l'os s'en retrouve modifiée. Ainsi, dans certains sites, on observe des changements de la cristallinité de la bioapatite moins de 10 ans après la mort des individus [Shinomiya *et al.*, 1998, Tuross *et al.*, 1989]. Ce changement de cristallinité s'accompagne d'une incorporation d'éléments du sol [Trueman et Tuross, 2002] (Figure D.1). Bien heureusement, les échantillons archéologiques ne sont généralement pas affectés aussi rapidement par ce phénomène de diagenèse. En effet, les conditions taphonomiques et biochimiques des sépultures délibérées sont très différentes des conditions « naturelles » du sol et permettent une meilleure préservation [Trueman et Martill, 2002]. L'étude des isotopes d'ossements ayant été enterrés nécessite en conséquence une vérification de l'absence de diagenèse avant toute interprétation. C'est ce à quoi nous allons maintenant nous attacher pour la population de Saint-Laurent de Grenoble datant du *XVII^{ème}* – *XVIII^{ème}* siècles.

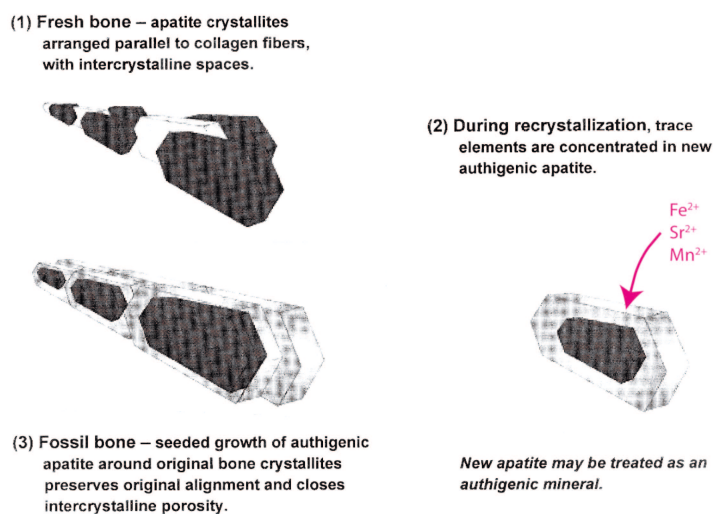


FIGURE D.1: Dégradation de l'apatite post mortem et incorporation de cations du sol. Schéma modifié d'après Trueman et Tuross, 2002.

D.1.1 Absence de corrélations entre rapports isotopiques et concentrations

Dans le cas d'une incorporation d'un polluant dans un objet, plus cette incorporation est importante, plus l'objet obtient une composition proche de celle du polluant, que ce soit au niveau isotopique ou élémentaire. La relation étant proportionnelle, on s'attend à obtenir une corrélation entre concentrations et rapports isotopiques lors d'une pollution. Les extrémités de cette corrélation correspondent à la valeur naturelle de l'objet et celle du polluant. Par l'observation de la figure D.2, on constate qu'une telle corrélation n'existe pas pour les éléments fer, cuivre et zinc dans les os de la population de Saint-Laurent de Grenoble.

On objectera cependant qu'en cas de l'existence de diverses sources de pollution, liée par exemple à un sol de nature hétérogène, la corrélation entre rapports isotopiques et concentrations ne peut apparaître. Seuls deux échantillons de sol ont ici été analysés. La diversité de la composition lithologique du sol du cloître de Saint-Laurent de Grenoble n'a donc pas été examinée d'un point de vue élémentaire et isotopique. Par conséquent, il convient d'appliquer à nos échantillons des tests complémentaires permettant de s'assurer de l'absence de diagénèse.

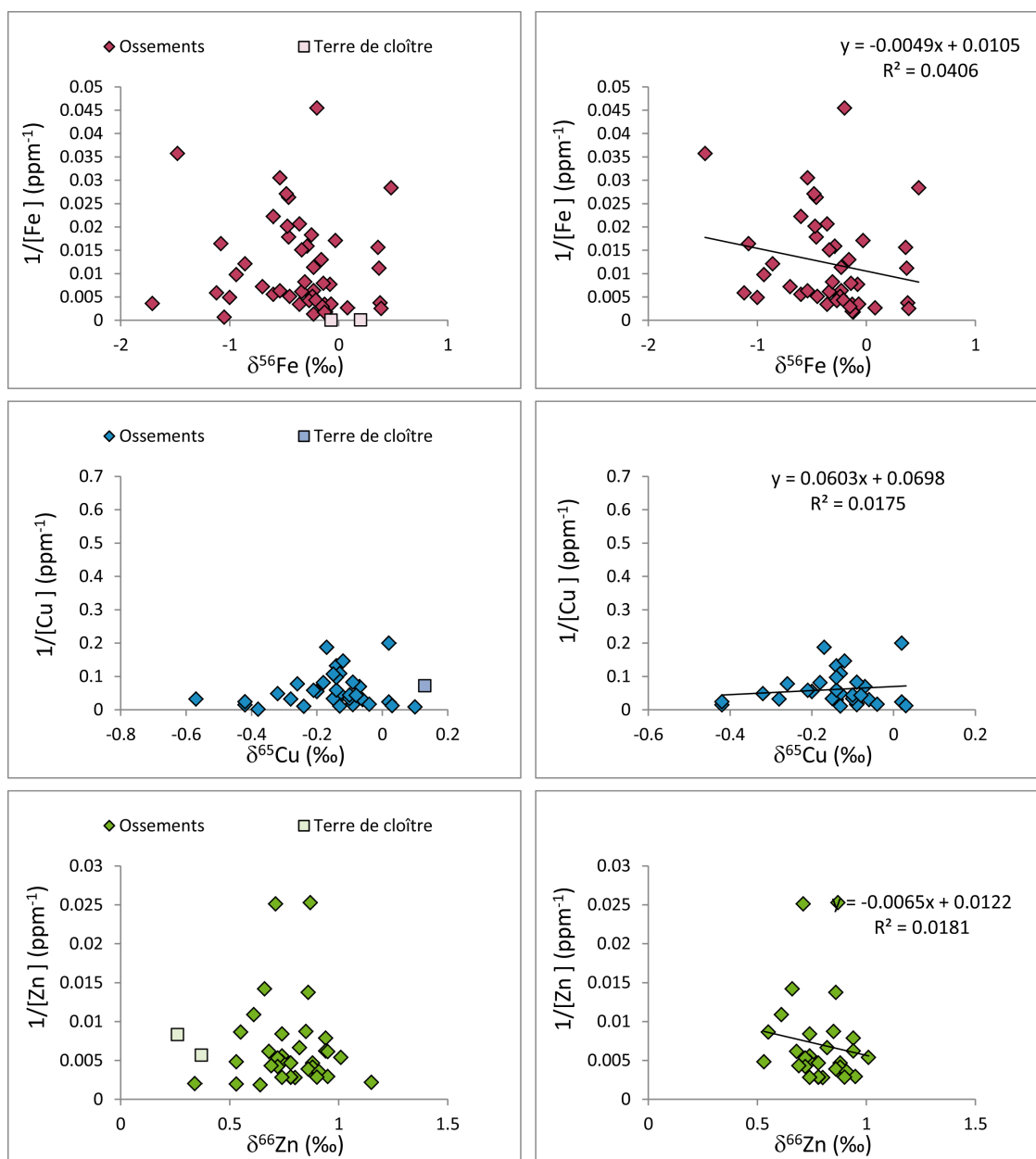


FIGURE D.2: Corrélations entre rapports isotopiques et concentration du fer, cuivre et zinc pour les ossements et la terre du cloître de l'Eglise de St-Laurent de Grenoble

D.1.2 Test de corrélation entre concentrations en fer et en manganèse

Les oxydes de fer du sol sont en grande partie des oxydes ferromanganésiens. De ce fait, l'incorporation du fer dans les ossements archéologiques s'accompagne d'une contamination en manganèse, un élément également facilement substituable aux cations divalents de l'hydroxyapatite. On s'attend donc à obtenir une corrélation entre concentrations en fer et en manganèse dans une série d'ossements plus ou moins affectées par la diagénèse. Nous avons soumis les ossements de St Laurent à ce test (Figure D.3)

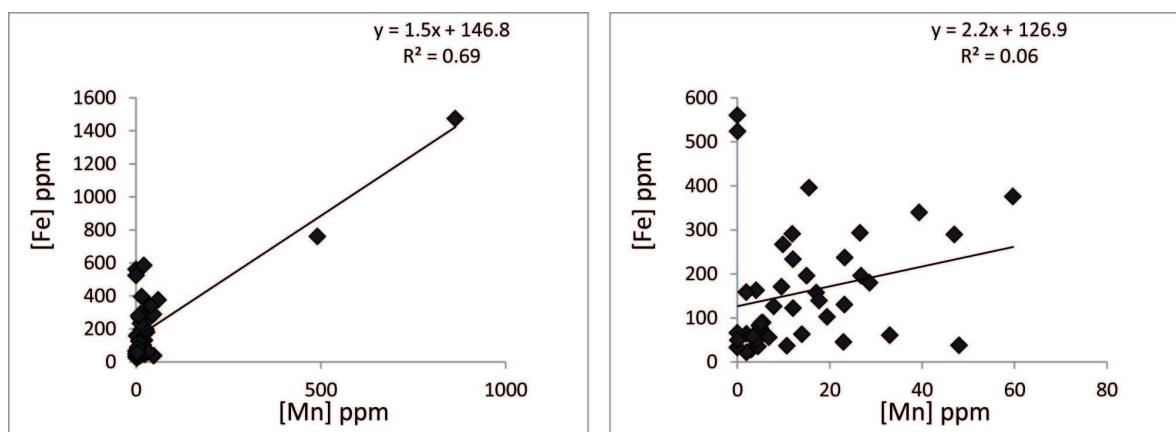


FIGURE D.3: Test de corrélation entre concentrations en fer et en manganèse pour les ossements de St-Laurent de Grenoble. A gauche : avec tous les échantillons. A droite : avec les échantillons considérés comme exempts de contamination post mortem.

La figure D.3 a) atteste d'une corrélation entre les concentrations en fer et en manganèse. Cependant, cette corrélation semble portée par deux échantillons. Si ceux-ci sont retirés, alors la corrélation disparaît (figure D.3 b). Ainsi, il semble qu'à l'exception de deux échantillons, les métaux présents dans les os n'aient pas été contaminés par le sol environnant.

D.1.3 Filtre statistique permettant l'élimination d'échantillons suspects.

Les échantillons présentant des concentrations très élevées en fer, cuivre, zinc ou manganèse sont susceptibles d'indiquer une concentration post mortem de l'os ou une pathologie métabolique de l'individu avant sa mort. Tenir compte de leurs valeurs isotopiques peut donc fausser les interprétations. On sait d'autre part que le risque de contamination des échantillons n'est pas nul étant donné la présence de manganèse dans des concentrations importantes pour deux d'entre eux. L'emploi d'un filtre statistique pour

éliminer les « outliers » est une méthode courante permettant la détection d'échantillons suspects. La méthode repose ici sur l'identification d'échantillons dont les concentrations élémentaires n'entrent pas dans la gamme de la moyenne observée sur la population ± 2 écart-types. Ce filtre a amené à considérer les échantillons T04, T10, T34, T49 et T50 comme suspects.

D.1.4 Comparaisons avec des ossements n'ayant pas été enterrés

Afin de vérifier l'absence de diagenèse dans les échantillons, on peut également chercher à vérifier que les concentrations sont contenues dans la gamme physiologique humaine et que les valeurs isotopiques correspondent aux valeurs types des ossements. L'analyse des échantillons de Saint-Laurent de Grenoble constitue les premières données isotopiques sur des ossements humains. Nous ne pouvons donc que comparer les concentrations à celles précédemment publiées dans la littérature.

Les concentrations types des os de Saint-Laurent de Grenoble, une fois le filtre statistique appliqué, sont de 160 ppm, 25 ppm, et 189 ppm respectivement pour le fer, le cuivre et le zinc. La gamme de distribution entre dans celle issue des données de la littérature pour des os modernes (Tableau D.1). On notera que les os modernes analysés au cours de cette thèse correspondent également à la gamme de variabilité déjà observée. Ces observations argumentent en faveur de l'absence de diagenèse pour les ossements archéologiques de Saint Laurent.

Concentrations osseuses	Type d'os	[Fe] ppm		[Cu] ppm		[Zn] ppm	
		gamme	n	gamme	n	gamme	n
Données bibliographiques	Tous	0.9-1750	-	0.15-100	-	40-414	-
Saint-Laurent de Grenoble	Cortical	22-560	43	1.6-92	41	39.5-357	40
CCEC	Spongieux	29-332	12	0,76-4,14	12	63-140	12
Phalanges non enterrées	Cortical	5.5-46	4	0.58-37.40	4	122-297	3

TABLE D.1: Concentrations élémentaires dans des ossements humains : comparaisons des données obtenues dans cette thèse aux données bibliographiques. Les valeurs bibliographiques synthétisent celles exposées Partie II.1

Cependant, on note que les os crâniens du Centre de Conservation et d'Etude des Collections présentent des concentrations bien plus faibles que les ossements archéologiques puisqu'il existe un ordre de grandeur entre les deux gammes de variations. Cette forte variabilité se retrouve dans la littérature (Tableau 2.1). Les os crâniens étudiés ici présentent la même gamme de valeurs que tous les os présentant une importante partie spongieuse [Lappalainen *et al.*, 1982, Baranowska *et al.*, 1995,

Yoshinaga *et al.*, 1995b, D’Haese *et al.*, 1999, Beneš *et al.*, 2000, Zaichick *et al.*, 2009] à l’exception de ceux ayant été calcinés [Martínez-García *et al.*, 2005]. On peut donc suspecter le rôle de la partie organique de l’os dans ces faibles concentrations.

D.2 Partie VI : Modélisation mathématique du lien entre menstruations et $\delta^{56}\text{Fe}$ au cours du temps.

In order to test the effect of endometrium loss on the women’s blood Fe isotope composition, we used a simple box model with one entrance (diet) and two outputs (endometrium loss and other losses : blood losses, urine, sweat, skin, and feces) (Figure D.1)

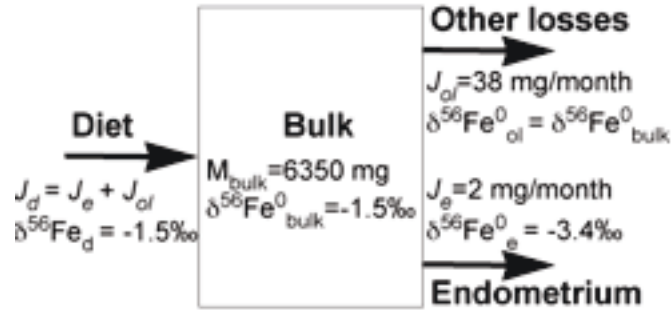


FIGURE D.1: Schematic diagram of a one-box model for Fe isotopes in menstruating women. The input flux in the bulk reservoir is the diet (J_d) which is equal to the sum of the two output fluxes, the endometrium (J_e) and other losses (J_o).

The women’s blood Fe isotope composition is assumed to be in isotopic equilibrium with the bulk Fe isotope composition

D.2.1 Bulk description

The bulk Fe isotope composition is calculated using values of the Fe reservoirs from Andrews, 2009. Iron content and $\delta^{56}\text{Fe}$ initial values for Fe reservoirs are given in Table D2.

We can calculate a bulk Fe isotope composition using the equation :

$$\delta^{56}\text{Fe}_{\text{bulk}} = \frac{\sum_1^n \delta^{56}\text{Fe}_{\text{organ}}(i) * M_{\text{organ}}^{\text{Fe}}(i)}{M_{\text{bulk}}^{\text{Fe}}}$$

where is $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{organ}}(i)$ the Fe isotope composition of reservoir i and $M_{\text{organ}}^{\text{Fe}}(i)$ the mass of Fe in reservoir i .

Iron reservoirs	$\delta^{56}\text{Fe}$ (‰)	M_{Fe} (mg)
Muscles	-2.79	250
Liver	-1.41	1300
Bones	-0.45	2600
Blood	-2.76	2200
Bulk	-1.54	6350

TABLE D.2: Iron content and $\delta^{56}\text{Fe}$ initial values for Fe reservoirs. Iron content are calculated using a body weight of 58 Kg. Iron content of liver and reticulo-endothelial macrophages, and of circulating erythrocytes and bone marrow, have been merged. Bone Fe content is calculated using an average Fe concentration of 160 $\mu\text{g/g}$ and a mass skeleton of 20 Kg. Isotopic data are from this study except for muscles that are from Walczyk & Von Blanckenburg (2002).

D.2.2 For a non-menstruating subject.

According to the Panel of micronutrients, the daily iron requirements (DIR) are equal to 0.014 mg/kg/day. We obtain a DIR value of 0.81 mg/day using a body weight of 58 Kg, which is consistent with data from the literature [Hallberg et Rossander-Hulten, 1991, Andrews, 1999, Harvey *et al.*, 2005]. This is the value of the dietary flux, J_d . At steady state, $J_d = J_{OL}$, where J_{OL} is the amount of Fe lost through other outputs (skin, sweat, urine, bile, feces). Therefore, for one month $J_{diet} = J_{OL} = 24$ mg, which represents 0.4% of the total Fe content ($J_d = J_{OL} = 0.007 M_{bulk}^{Fe}/\text{month}$)

D.2.3 For a menstruating woman

Let us add 0.51 mg/day of menstrual blood losses (11) to the 0.81 mg/day lost with other outputs. We obtain $J_{OL}=38$ mg/month, which represents 0.6% of the total Fe content. Let us also add the endometrium J_{endo} flux. Therefore, $J_d = J_{endo} + J_{OL}$. However, $J_{endo} = M_{endo} * C_{endo}^{Fe}$, where C_{endo}^{Fe} and M_{endo} are the Fe concentration in the endometrium and the mass of the endometrium, respectively. For the estimation of the M_{endo} value, we took an average value of 3.3 mL for the endometrium volume [Philippe, 1991] and assumed that the endometrium density is equal to that of muscle (1.06 g/cm³). We obtained an endometrium mass of 3.5 g. The Fe concentration in endometrium was measured in five subjects of our study (Table C5). Finally, $J_{endo} = 2.8$ mg/month, which represents 7 % of the total iron losses. For the sake of simplicity, the initial bulk and diet Fe isotope compositions ($\delta^{56}\text{Fe}_{bulk}^0$ and $\delta^{56}\text{Fe}_{diet}$, respectively) are supposed to be similar. The "default" parameters are summarized in Table D3 :

Body mass (kg)	58
$^{56}\text{Fe}_{bulk}^0$ (‰)	-1.54
MCL (days)	30
C_{endo}^{Fe} (ppm)	820
$\delta^{56}\text{Fe}_{endo}$ (‰)	-3.44

TABLE D.3: Default parameters of the iron box model. MCL stands for the length of the menstrual cycle.

D.2.4 Model calculation

The rate of change of the ^{54}Fe and ^{56}Fe abundances in the bulk reservoir (B) is described by :

$$\frac{d^{54}\text{Fe}}{dt} = {}^{54}J_D - {}^{54}J_E - {}^{54}J_{OL}$$

$$\frac{d^{56}\text{Fe}}{dt} = {}^{56}J_D - {}^{56}J_E - {}^{56}J_{OL}$$

where J_D , J_E , and J_{OL} are the fluxes of ^{54}Fe and ^{56}Fe from diet (D) toward B and from B toward endometrium (E) and other losses (OL).

The rate of change of the $^{56}\text{Fe} = {}^{54}\text{Fe}$ ratio in the bulk reservoir equals :

$$\frac{d^{56/54}\text{Fe}_B}{dt} = \frac{1}{{}^{54}\text{Fe}_B} \left[\frac{d^{56}\text{Fe}_B}{dt} - \frac{{}^{56}\text{Fe}_B}{{}^{54}\text{Fe}_B} \frac{d^{54}\text{Fe}_B}{dt} \right]$$

Using Eq.1 and Eq.2, Eq.3 becomes :

$$\frac{d^{56/54}\text{Fe}_B}{dt} = \frac{1}{{}^{54}\text{Fe}_B} \left[{}^{56}J_D - {}^{56}J_E - {}^{56}J_{OL} - \left(\frac{{}^{56}\text{Fe}}{{}^{54}\text{Fe}} \right)_B ({}^{54}J_D - {}^{54}J_E - {}^{54}J_{OL}) \right]$$

$$\frac{d^{56/54}\text{Fe}_B}{dt} = \frac{1}{{}^{54}\text{Fe}_B} \left\{ \begin{array}{l} {}^{54}J_D \left[\frac{{}^{56}J_D}{{}^{54}J_D} - \left(\frac{{}^{56}\text{Fe}}{{}^{54}\text{Fe}} \right)_B \right] - {}^{54}J_E \left[\frac{{}^{56}J_E}{{}^{54}J_E} - \left(\frac{{}^{56}\text{Fe}}{{}^{54}\text{Fe}} \right)_B \right] \\ - {}^{54}J_{OL} \left[\frac{{}^{56}J_{OL}}{{}^{54}J_{OL}} - \left(\frac{{}^{56}\text{Fe}}{{}^{54}\text{Fe}} \right)_B \right] \end{array} \right\}$$

Replacing the ratios of fluxes by the corresponding ratios of abundances gives :

$$\frac{d^{56/54}\text{Fe}_B}{dt} = \frac{1}{{}^{54}\text{Fe}_B} \left\{ \begin{array}{l} {}^{54}J_D \left[\left(\frac{{}^{56}\text{Fe}}{{}^{54}\text{Fe}} \right)_D - \left(\frac{{}^{56}\text{Fe}}{{}^{54}\text{Fe}} \right)_B \right] - {}^{54}J_E \left[\left(\frac{{}^{56}\text{Fe}}{{}^{54}\text{Fe}} \right)_E - \left(\frac{{}^{56}\text{Fe}}{{}^{54}\text{Fe}} \right)_B \right] \\ - {}^{54}J_{OL} \left[\left(\frac{{}^{56}\text{Fe}}{{}^{54}\text{Fe}} \right)_{OL} - \left(\frac{{}^{56}\text{Fe}}{{}^{54}\text{Fe}} \right)_B \right] \end{array} \right\}$$

$$\frac{d\delta^{56/54}\text{Fe}_B}{dt} \rightarrow 0$$

At steady-state $\frac{d\delta^{56/54}\text{Fe}_B}{dt}$, leading to :

$$0 = {}^{54}J_D ({}^{56}\text{Fe}_D - {}^{56}\text{Fe}_B) - {}^{54}J_E ({}^{56}\text{Fe}_E - {}^{56}\text{Fe}_B) - {}^{54}J_{OL} ({}^{56}\text{Fe}_{OL} - {}^{56}\text{Fe}_B)$$

Assuming that there is no fractionation between bulk and other loss reservoirs simplifies Eq.7 to :

$$\frac{{}^{54}J_E}{{}^{54}J_D} = \frac{{}^{56}Fe_D - {}^{56}Fe_B}{{}^{56}Fe_E - {}^{56}Fe_B}$$

The value of J_E and J_{OL} are 0.07% and 0.6% of the bulk mass per month unit. Knowing that ${}^{56}Fe_D$ and ${}^{56}Fe_E$ equal -1.54‰ and -3.44‰, respectively, we obtain a steady-state ${}^{56}Fe_B$ value of $\sim -2.14‰$. The bulk ${}^{56}Fe$ -enrichment of 0.2 ‰ due to the loss of ${}^{56}Fe$ -depleted endometrium corresponds to a significant part of the shift observed between the average ${}^{56}Fe$ total blood value of women ($-2.57 \pm 0.19‰$) and men ($-2.74 \pm 0.16‰$) [Walczyk et Von Blanckenburg, 2002].

D.3 Tableau récapitulatif des échantillons analysés.

Annexe D Informations et discussions complémentaires

Nom	Type	Espèce	Collections	Provenance	Sexe	Observations	Compositions isotopiques mesurées				
							$\delta^{65}\text{Cu}$	$\delta^{56}\text{Fe}$	$\delta^{66}\text{Zn}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
T01	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique		X	X		
T02	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique		X			
T03	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique		X			
T04*	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T05	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique		X			
T06	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T07	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T08	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique		X			
T09	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T10*	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T12	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T13	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X			
T15	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique		X			
T16	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T17	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	I	Archéologique	X		X		
T18	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique		X			
T19	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T20	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T21	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T22	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T23	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T24	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T25	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T26	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T27	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique		X	X		
T28	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X			
T29	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T30	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T31	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique		X			
T32	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T33	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique		X			
T34*	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T35	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T36	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T37	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique		X			

TABLE D.4: Informations sur l'ensemble des échantillons analysés. * échantillons éliminés en raison de la présence de concentrations anormales de métaux de transitions. Les données manquantes sont liées à des concentrations en métaux au deçà des limites de détections. CCEC : Centre de Conservation et d'Etude des Collections, CO : condyle occipital, EF : Eléments figurés, EFS : Etablissement français du Sang, HL : Hôpitaux de Lyon, MAG : Musée Archéologique de Grenoble, MAL : Musée d'Anatomie de Lyon, MNHN : Muséum national d'histoire naturelle, RE : Réseau d'entourage, UPS : Université Paul Sabatier, ZP : Zoo de la Palmyre.

D.3 Tableau récapitulatif des échantillons analysés.

Nom	Type	Espèce	Collections	Provenance	Sexe	Observations	Compositions isotopiques mesurées				
							$\delta^{65}\text{Cu}$	$\delta^{56}\text{Fe}$	$\delta^{66}\text{Zn}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
T38	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T39	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T41	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T42	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T43	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique		X			
T44	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T45	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T46	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T47	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T48	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique		X			
T49*	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T50*	Os	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T05	M3	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T09	M3	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T10	M2	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T13	M3	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T16	M3	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T20	M2 ou M3	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T23	M2 ou M3	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T24	M3	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T25	M3	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T29	M3	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T30	M3 ou M2	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T34	M2	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T37	M3	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T38	M2	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T40	M3	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T41	M2	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T42	M3	Homo sapiens	MAG	SLG	M	Archéologique	X	X	X		
T43	M3	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T44	M3	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
T47	M3	Homo sapiens	MAG	SLG	F	Archéologique	X	X	X		
A27	CO	Homo sapiens	CCEC	Luisons	F	Anatomique	X	X	X		
A32	CO	Homo sapiens	CCEC	Strasbourg	H	Anatomique	X	X	X		
A34	CO	Homo sapiens	CCEC	Monleret	H	Anatomique	X	X	X		

TABLE D.5: Informations sur l'ensemble des échantillons analysés. * échantillons éliminés en raison de la présence de concentrations anormales de métaux de transitions. Les données manquantes sont liées à des concentrations en métaux au deçà des limites de détections. CCEC : Centre de Conservation et d'Etude des Collections, CO : condyle occipital, EF : Eléments figurés, EFS : Etablissement français du Sang, HL : Hôpitaux de Lyon, MAG : Musée Archéologique de Grenoble, MAL : Musée d'Anatomie de Lyon, MNHN : Muséum national d'histoire naturelle, RE : Réseau d'entourage, UPS : Université Paul Sabatier, ZP : Zoo de la Palmyre.

Annexe D Informations et discussions complémentaires

Nom	Type	Espèce	Collections	Provenance	Sexe	Observations	Compositions isotopiques mesurées				
							$\delta^{65}\text{Cu}$	$\delta^{56}\text{Fe}$	$\delta^{66}\text{Zn}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
A61	CO	Homo sapiens	CCEC	Chatel de Joux	H	Anatomique	X	X	X		
A78	CO	Homo sapiens	CCEC	Thurins	F	Anatomique	X	X	X		
A84	CO	Homo sapiens	CCEC	Lyon	H	Anatomique	X	X	X		
A94	CO	Homo sapiens	CCEC	St Chamond	F	Anatomique	X	X	X		
A97	CO	Homo sapiens	CCEC	Grilly s/ Gey	F	Anatomique	X	X	X		
D87	CO	Homo sapiens	CCEC	Artix	F	Anatomique	X	X	X		
D92	CO	Homo sapiens	CCEC	Tarare	F	Anatomique	X	X	X		
D94	CO	Homo sapiens	CCEC	Fresnay	H	Anatomique	X	X	X		
D96	CO	Homo sapiens	CCEC	Nimy Maisières	H	Anatomique	X	X	X		
E36	CO	Homo sapiens	CCEC	Beaurepaire	H	Anatomique	X	X	X		
E56	CO	Homo sapiens	CCEC	Védène	H	Anatomique	X	X	X		
E57	CO	Homo sapiens	CCEC	Vesoul	F	Anatomique	X	X	X		
E8	CO	Homo sapiens	CCEC	Baumes l.D.	H	Anatomique	X	X	X		
E88	CO	Homo sapiens	CCEC	Lyon	H	Anatomique	X	X	X		
E9	CO	Homo sapiens	CCEC	Le Balme	F	Anatomique	X	X	X		
F1	CO	Homo sapiens	CCEC	?	H	Anatomique		X			
J30	CO	Homo sapiens	CCEC	Lyon	H	Anatomique	X	X	X		
J67	CO	Homo sapiens	CCEC	Le Tholy ?	F	Anatomique	X	X	X		
J70	CO	Homo sapiens	CCEC	Vienne	H	Anatomique	X	X	X		
M14	CO	Homo sapiens	CCEC	Sermérieu	H	Anatomique	X	X	X		
M18	CO	Homo sapiens	CCEC	Tarare	F	Anatomique	X	X	X		
A27	M3	Homo sapiens	CCEC	Luisons	F	Anatomique	X	X	X		
A32	M3	Homo sapiens	CCEC	Strasbourg	H	Anatomique	X	X	X		
A34	M3	Homo sapiens	CCEC	Monleret	H	Anatomique	X	X	X		
A61	M3	Homo sapiens	CCEC	Chatel de Joux	H	Anatomique	X	X	X		
A78	M3	Homo sapiens	CCEC	Thurins	F	Anatomique	X	X	X		
A84	M3	Homo sapiens	CCEC	Lyon	H	Anatomique	X	X	X		
A94	M3	Homo sapiens	CCEC	St Chamond	F	Anatomique	X	X	X		
A97	M3	Homo sapiens	CCEC	Grilly s/ Gey	F	Anatomique	X	X	X		
D87	M3	Homo sapiens	CCEC	Artix	F	Anatomique	X	X	X		
D92	M3	Homo sapiens	CCEC	Tarare	F	Anatomique	X	X	X		
D94	M3	Homo sapiens	CCEC	Fresnay	H	Anatomique	X	X	X		
D96	M3	Homo sapiens	CCEC	Nimy Maisières	H	Anatomique	X	X	X		
E36	M2	Homo sapiens	CCEC	Beaurepaire	H	Anatomique	X	X	X		
E56	M3	Homo sapiens	CCEC	Védène	H	Anatomique	X	X	X		

TABLE D.6: Informations sur l'ensemble des échantillons analysés. * échantillons éliminés en raison de la présence de concentrations anormales de métaux de transitions. Les données manquantes sont liées à des concentrations en métaux au deçà des limites de détections. CCEC : Centre de Conservation et d'Etude des Collections, CO : condyle occipital, EF : Eléments figurés, EFS : Etablissement français du Sang, HL : Hôpitaux de Lyon, MAG : Musée Archéologique de Grenoble, MAL : Musée d'Anatomie de Lyon, MNHN : Muséum national d'histoire naturelle, RE : Réseau d'entourage, UPS : Université Paul Sabatier, ZP : Zoo de la Palmyre.

D.3 Tableau récapitulatif des échantillons analysés.

Nom	Type	Espèce	Collections	Provenance	Sexe	Observations	Compositions isotopiques mesurées				
							$\delta^{65}\text{Cu}$	$\delta^{56}\text{Fe}$	$\delta^{66}\text{Zn}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
E57	M3	Homo sapiens	CCEC	Vesoul	F	Anatomique	X	X	X		
E8	M3	Homo sapiens	CCEC	Baumes l.D.	H	Anatomique	X	X	X		
E88	M3	Homo sapiens	CCEC	Lyon	H	Anatomique	X	X	X		
E9	M3	Homo sapiens	CCEC	Le Balme	F	Anatomique	X	X	X		
F1	M3	Homo sapiens	CCEC	Ain	H	Anatomique	X	X	X		
J30	M3	Homo sapiens	CCEC	Lyon	H	Anatomique	X	X	X		
J67	M3	Homo sapiens	CCEC	Le Tholy	F	Anatomique		X	X		
J70	M3	Homo sapiens	CCEC	Vienne	H	Anatomique	X	X	X		
M14	M3	Homo sapiens	CCEC	Sermérieu	H	Anatomique	X	X	X		
M18	M3	Homo sapiens	CCEC	Tarare	F	Anatomique	X	X	X		
E1	M3	Homo sapiens	Dentiste	Dieppe	M	Biomédical	X	X	X		
E2	M3	Homo sapiens	Dentiste	Dieppe	F	Biomédical	X	X	X		
E4	M3	Homo sapiens	Dentiste	Dieppe	M	Biomédical		X	X		
E5	M3	Homo sapiens	Dentiste	Lyon	F	Biomédical		X	X		
E6	M3	Homo sapiens	Dentiste	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
P1	Os cortical	Homo sapiens	MAL	?	?	Anatomique		X	X		
P2	Os cortical	Homo sapiens	MAL	?	?	Anatomique	X	X	X		
P3*	Os cortical	Homo sapiens	MAL	?	?	Anatomique	X	X	X		
P4	Os cortical	Homo sapiens	MAL	?	?	Anatomique	X	X	X		
TSL1	Terre	-	MAG	SLG	-	-	X	X	X		
TSL2	Terre	-	MAG	SLG	-	-	X	X	X		
Y01	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	M	Biomédical	X	X	X	X	X
Y02	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y03	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y04	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	M	Biomédical	X	X	X	X	X
Y05	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	M	Biomédical	X	X	X	X	X
Y06	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y07	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y08	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y09	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y10	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	M	Biomédical	X	X	X	X	X
Y11	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	M	Biomédical	X	X	X	X	X
Y12	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y13	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y14	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X

TABLE D.7: Informations sur l'ensemble des échantillons analysés. * échantillons éliminés en raison de la présence de concentrations anormales de métaux de transitions. Les données manquantes sont liées à des concentrations en métaux au deçà des limites de détections. CCEC : Centre de Conservation et d'Etude des Collections, CO : condyle occipital, EF : Eléments figurés, EFS : Etablissement français du Sang, HL : Hôpitaux de Lyon, MAG : Musée Archéologique de Grenoble, MAL : Musée d'Anatomie de Lyon, MNHN : Muséum national d'histoire naturelle, RE : Réseau d'entourage, UPS : Université Paul Sabatier, ZP : Zoo de la Palmyre.

Annexe D Informations et discussions complémentaires

Nom	Type	Espèce	Collections	Provenance	Sexe	Observations	Compositions isotopiques mesurées				
							$\delta^{65}\text{Cu}$	$\delta^{56}\text{Fe}$	$\delta^{66}\text{Zn}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Y15	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y16	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y17	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y18	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y19	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y20	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y21	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	M	Biomédical	X	X	X	X	X
Y22	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y23	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y24	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y25	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y26	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y27	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y28	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y29	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	M	Biomédical	X	X	X	X	X
Y30	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y31	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y32	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y33	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y34	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y35	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y36	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y37	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
Y38	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	M	Biomédical	X	X	X	X	X
Y39	Sang total	Homo sapiens	UPS	Vilïouïsk	F	Biomédical	X	X	X	X	X
A	Sang total	Homo sapiens	RE	Lyon	F	Biomédical		X			
B	Sang total	Homo sapiens	RE	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
C	Sang total	Homo sapiens	RE	Lyon	F	Biomédical		X			
D	Sang total	Homo sapiens	RE	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
E	Sang total	Homo sapiens	RE	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
F	Sang total	Homo sapiens	RE	Lyon	F	Biomédical		X			
G	Sang total	Homo sapiens	RE	Nancy	F	Biomédical		X			
H	Sang total	Homo sapiens	RE	Nancy	F	Biomédical		X			
I	Sang total	Homo sapiens	RE	Nancy	F	Biomédical		X			
K	Sang total	Homo sapiens	RE	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		

TABLE D.8: Informations sur l'ensemble des échantillons analysés. * échantillons éliminés en raison de la présence de concentrations anormales de métaux de transitions. Les données manquantes sont liées à des concentrations en métaux au deçà des limites de détections. CCEC : Centre de Conservation et d'Etude des Collections, CO : condyle occipital, EF : Eléments figurés, EFS : Etablissement français du Sang, HL : Hôpitaux de Lyon, MAG : Musée Archéologique de Grenoble, MAL : Musée d'Anatomie de Lyon, MNHN : Muséum national d'histoire naturelle, RE : Réseau d'entourage, UPS : Université Paul Sabatier, ZP : Zoo de la Palmyre.

D.3 Tableau récapitulatif des échantillons analysés.

Nom	Type	Espèce	Collections	Provenance	Sexe	Observations	Compositions isotopiques mesurées				
							$\delta^{65}\text{Cu}$	$\delta^{56}\text{Fe}$	$\delta^{66}\text{Zn}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
L	Sang total	Homo sapiens	RE	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
L1	Sang total	Homo sapiens	RE	Lyon	M	Biomédical	X	X	X	X	X
C1	Sang total	Pan paniscus	ZP	ZP	F	Biomédical	X	X	X		
C2	Sang total	Pan paniscus	ZP	ZP	M	Biomédical	X	X	X		
G1	Sang total	Gorilla gorilla	ZP	ZP	F	Biomédical	X	X	X		
G2	Sang total	Gorilla gorilla	ZP	ZP	M	Biomédical	X	X	X		
O1	Sang total	Pongo pongo	MNHN	MNHN	M	Biomédical	X	X	X		
O2	Sang total	Pongo pongo	ZP	ZP	M	Biomédical	X	X	X		
1	Liver	Homo sapiens	HL	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
2	Liver	Homo sapiens	HL	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
3	Liver	Homo sapiens	HL	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
4	Liver	Homo sapiens	HL	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
5	Liver	Homo sapiens	HL	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
6	Liver	Homo sapiens	HL	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
7	Liver	Homo sapiens	HL	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
8	Liver	Homo sapiens	HL	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
B	Endometrium	Homo sapiens	RE	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
D	Endometrium	Homo sapiens	RE	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
E	Endometrium	Homo sapiens	RE	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
K	Endometrium	Homo sapiens	RE	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
L	Endometrium	Homo sapiens	RE	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M3	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M4	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M11	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M12	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M28	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M13	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M29	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M30	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M31	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M32	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M33	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M34	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M35	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M36	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		

TABLE D.9: Informations sur l'ensemble des échantillons analysés. * échantillons éliminés en raison de la présence de concentrations anormales de métaux de transitions. Les données manquantes sont liées à des concentrations en métaux au deçà des limites de détections. CCEC : Centre de Conservation et d'Etude des Collections, CO : condyle occipital, EF : Eléments figurés, EFS : Etablissement français du Sang, HL : Hôpitaux de Lyon, MAG : Musée Archéologique de Grenoble, MAL : Musée d'Anatomie de Lyon, MNHN : Muséum national d'histoire naturelle, RE : Réseau d'entourage, UPS : Université Paul Sabatier, ZP : Zoo de la Palmyre.

Nom	Type	Espèce	Collections	Provenance	Sexe	Observations	Compositions isotopiques mesurées				
							$\delta^{65}\text{Cu}$	$\delta^{56}\text{Fe}$	$\delta^{66}\text{Zn}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
M37	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M38	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M39	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M40	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M41	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	F	Biomédical	X	X	X		
M1	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
M2	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
M5	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
M6	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
M7	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
M8	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
M9	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
M10	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
M14	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
M15	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
M16	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
M17	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
M18	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
M19	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		
M20	EF	Homo sapiens	EFS	Lyon	M	Biomédical	X	X	X		

TABLE D.10: Informations sur l'ensemble des échantillons analysés. * échantillons éliminés en raison de la présence de concentrations anormales de métaux de transitions. Les données manquantes sont liées à des concentrations en métaux au deçà des limites de détections. CCEC : Centre de Conservation et d'Etude des Collections, CO : condyle occipital, EF : Eléments figurés, EFS : Etablissement français du Sang, HL : Hôpitaux de Lyon, MAG : Musée Archéologique de Grenoble, MAL : Musée d'Anatomie de Lyon, MNHN : Muséum national d'histoire naturelle, RE : Réseau d'entourage, UPS : Université Paul Sabatier, ZP : Zoo de la Palmyre.

Bibliographie

- ACSÁDI, G. et NEMESKÉRI, J. (1970). *History of human life span and mortality*. Akadémiai Kiadó Budapest.
- ADAMS HOLT, C. (1978). A re-examination of parturition scars on the human female pelvis. *American journal of physical anthropology*, 49(1):91–94.
- ALBARÈDE, F. (2004). The stable isotope geochemistry of copper and zinc. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 55(1):409–427.
- ALBARÈDE, F., TELOUK, P., LAMBOUX, A., JAOUEN, K. et BALTER, V. (2011). Isotopic evidence of unaccounted for Fe and Cu erythropoietic pathways. *Metallomics*, 3(9):926–933.
- ALCAMO, J., DRONIN, N., ENDEJAN, M., GOLUBEV, G. et KIRILENKO, A. (2007). A new assessment of climate change impacts on food production shortfalls and water availability in Russia. *Global Environmental Change*, 17(3-4):429–444.
- ALLEN, L. H., AHLUWALIA, N., UNITED STATES AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT et OMNI (1997). *Improving iron status through diet : The application of knowledge concerning dietary iron bioavailability in human populations*. John Snow Incorporated/OMNI Project.
- ALVAREZ, J. O. (1995). Nutrition, tooth development, and dental caries. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61(2):410S–416S.
- AMBROSE, S. H. et DENIRO, M. J. (1986). Reconstruction of African human diet using bone collagen carbon and nitrogen isotope ratios.
- AMBROSE, S. H. et NORR, L. (1993). Experimental evidence for the relationship of the carbon isotope ratios of whole diet and dietary protein to those of bone collagen and carbonate. *Prehistoric human bone : archaeology at the molecular level*, page 1–37.
- AMIOT, R., LÉCUYER, C., BUFFETAUT, E., ESCARGUEL, G., FLUTEAU, F. et MARTINEAU, F. (2006). Oxygen isotopes from biogenic apatites suggest widespread endothermy in cretaceous dinosaurs. *Earth and Planetary Science Letters*, 246(1–2):41–54.
- ANBAR, A. D. (2004). Iron stable isotopes : beyond biosignatures. *Earth and Planetary Science Letters*, 217(3):223–236.
- ANBAR, A. D., ROE, J. E., BARLING, J. et NEALSON, K. H. (2000). Nonbiological fractionation of iron isotopes. *Science*, 288(5463):126–128.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON, D. L., THOMPSON, G. W. et POPOVICH, F. (1976). Age of attainment of mineralization stages of the permanent dentition. *J Forensic Sci*, 21(4).
- ANDREWS, N. C. (1999). Disorders of iron metabolism. *New England Journal of Medicine*, 341(26):1986–1995.
- ANDREWS, N. C. (2005a). Molecular control of iron metabolism. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 18(2):159–169.
- ANDREWS, N. C. (2005b). Understanding heme transport. *New England Journal of Medicine*, 353(23):2508–2509.
- ANDREWS, N. C. (2008). Forging a field : the golden age of iron biology. *blood*, 112(2):219–230.
- ANGEL, J. L. (1981). History and development of paleopathology. *American journal of physical anthropology*, 56(4):509–515.
- ASHWORTH JR, J. T., ALLISON, M. J., GERSZTEN, E. et PEZZIA, A. (1976). The pubic scars of gestation and parturition in a group of pre-Columbian and colonial Peruvian mummies. *American Journal of Physical Anthropology*, 45(1):85–89.
- AUCOUR, A. M., PICHAT, S., OGER, P. et MACNAIR, M. (2011). Fractionation of stable zinc isotopes in the zinc hyperaccumulator arabidopsis halleri and non-accumulator arabidopsis petraea. *Environmental science & technology*.
- BALA, M., PATHAK, A. et JAIN, R. (2010). Assessment of skeletal age using MP 3 and hand-wrist radiographs and its correlation with dental and chronological ages in children. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 28(2):95.
- BALTER, V., SIMON, L., FOUILLET, H. et LÉCUYER, C. (2005). Box-modeling of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in mammals. *Oecologia*, 147(2):212–222.
- BALTER, V., TELOUK, P., REYNARD, B., BRAGA, J., THACKERAY, F. et ALBARÈDE, F. (2008). Analysis of coupled Sr/Ca and $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ variations in enamel using laser-ablation tandem quadrupole-multicollector ICPMS. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(16):3980–3990.
- BALTER, V., ZAZZO, A., MOLONEY, A. P., MOYNIER, F., SCHMIDT, O., MONAHAN, F. J. et ALBARÈDE, F. (2010). Bodily variability of zinc natural isotope abundances in sheep. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(5):605–612.
- BALTER, V., ZAZZO, A., MOYNIER, F., LAMBOUX, A., TELOUK, P., JAOUEN, K. et ALBARÈDE, F. Isotopic mapping of iron, copper and zinc in mice and sheep.
- BAR-GAL, G. K., KIM, M. J., KLEIN, A., SHIN, D. H., OH, C. S., KIM, J. W., KIM, T. H., KIM, S. B., GRANT, P. R., PAPPO, O. *et al.* (2012). Tracing hepatitis B virus to the 16th century in a korean mummy. *Hepatology*.
- BARANOWSKA, I., CZERNICKI, K. et ALEKSANDROWICZ, R. (1995). The analysis of lead, cadmium, zinc, copper and nickel content in human bones from the upper silesian industrial district. *The Science of the Total Environment*, 159(2-3):155–162.

-
- BARRY, M. et SHERLOCK, S. (1971). Measurement of liver-iron concentration in needle-biopsy specimens. *The Lancet*, 297(7690):100–103.
 - BEARD, B. L. et JOHNSON, C. M. (1999). High precision iron isotope measurements of terrestrial and lunar materials. *Geochimica et cosmochimica acta*, 63(11-12):1653–1660.
 - BEARD, B. L., JOHNSON, C. M., COX, L., SUN, H., NEALSON, K. H. et AGUILAR, C. (1999). Iron isotope biosignatures. *Science*, 285(5435):1889–1892.
 - BEARD, B. L., JOHNSON, C. M., VON DAMM, K. L. et POULSON, R. L. (2003). Iron isotope constraints on Fe cycling and mass balance in oxygenated earth oceans. *Geology*, 31(7):629.
 - BEEBE, R. A. et POSNER, A. S. (1975). Surface studies on bone mineral and related calcium phosphates. *Physico-Chimie et Cristallographie des Apatites d'Intérêt Biologique. Centre Nationale Recherche Scientifique*, (230):275–281.
 - BELLO, S. M., THOMANN, A., SIGNOLI, M., DUTOUR, O. et ANDREWS, P. (2006). Age and sex bias in the reconstruction of past population structures. *American journal of physical anthropology*, 129(1):24–38.
 - BELSHAW, N. S., ZHU, X. K., GUO, Y. et O'NIONS, R. K. (2000). High precision measurement of iron isotopes by plasma source mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 197(1):191–195.
 - BENDER, M., BAERREIS, D. et STEVENTON, R. (1981). Further light on carbon isotopes and hopewell agriculture. *American Antiquity*, 46(2):346–353.
 - BENEDEK, C., BERCLAZ, P. Y., JEQUIER, E. et SCHUTZ, Y. (1995). Resting metabolic rate and protein turnover in apparently healthy elderly Gambian men. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 268(6):E1083–E1088.
 - BENEŠ, B., JAKUBEC, K., ŠMÍD, J. et SPĚVÁČKOVÁ, V. (2000). Determination of thirty-two elements in human autopsy tissue. *Biological Trace Element Research*, 75(1-3):195–203.
 - BENTLEY, A. (2006). Strontium isotopes from the earth to the archaeological skeleton : a review. *Journal of Archaeological Method and Theory*, 13(3):135–187.
 - BERGOT, C. et BOCQUET, J. P. (1976). Etude systématique, en fonction de l'âge, de l'os spongieux et de l'os cortical de l'humérus et du fémur. *Bulletins et Mémoires de la Société d'anthropologie de Paris*, 3(3):215–242.
 - BEYER-OLSEN, E. M. et RISNES, S. (1994). Radiographic analysis of dental development used in age determination of infant and juvenile skulls from a medieval archaeological site in Norway. *International Journal of Osteoarchaeology*, 4(4):299–303.
 - BIGALKE, M., WEYER, S. et WILCKE, W. (2010). Copper isotope fractionation during complexation with insolubilized humic acid. *Environmental science & technology*, 44(14):5496–5502.

- BLANUŠA, M., IVIČIĆ, N. et SIMEON, V. (1990). Lead, iron, copper, zinc and ash in deciduous teeth in relation to age and distance from a lead smelter. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 45(4):478–485.
- BOCHERENS, H., FIZET, M., MARIOTTI, A., LANGE-BADRE, B., VANDERMEERSCH, B., BOREL, J. P. et BELLON, G. (1991). Isotopic biogeochemistry (^{13}C , ^{15}N) of fossil vertebrate collagen : application to the study of a past food web including Neandertal man. *Journal of Human Evolution*, 20(6):481–492.
- BROCA, P. (1861). *Sur le volume et la forme du cerveau suivant les individus et suivant les races*, volume 1. Hennuyer.
- BRUZEK, J. (2002). A method for visual determination of sex, using the human hip bone. *American Journal of Physical Anthropology*, 117(2):157–168.
- BRUZEK, J., SCHMITT, A. et MURAIL, P. (2005). Identification biologique individuelle en paléanthropologie. détermination du sexe et estimation de l'âge au décès à partir du squelette. *Origine et evolution humaine. Comité des Travaux Historiques et Scientifiques, Paris*, page 217–246.
- BUDD, P., MONTGOMERY, J., BARREIRO, B. et THOMAS, R. G. (2000). Differential diagenesis of strontium in archaeological human dental tissues. *Applied Geochemistry*, 15(5):687–694.
- BUIKSTRA, J. et COOK, D. (1980). Palaeopathology : An american account. *Annual Review of Anthropology*, 9:433–470.
- BUIKSTRA, J. E. et UBELAKER, D. H. (1994). Standards for data collection from human skeletal remains. *In Proceedings of a seminar at the Field Museum of Natural History*, volume 68, page 2007–2007.
- BULLEN, T. D. et MCMAHON, P. B. (1997). Iron isotopes revisited : experimental and field evidence for microbially-mediated Fe reduction. *Eos, Transactions, American Geophysical Union*, 78.
- BURROWS, A. M., ZANELLA, V. P. et BROWN, T. M. Testing the validity of metacarpal use in sex assessment of human skeletal remains. *Journal of forensic sciences*, 48(1):17–20.
- BUTTE, N. F., MOON, J. K., WONG, W. W., HOPKINSON, J. M. et SMITH, E. O. (1995). Energy requirements from infancy to adulthood. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(5):1047S–1052S.
- BÖHM, F., EISENHAEUER, A., TANG, J., DIETZEL, M., KRABBENHÖFT, A., KISAKÜREK, B. et HORN, C. (2012). Strontium isotope fractionation of planktic foraminifera and inorganic calcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*.
- CAMERIERE, R., FLORES-MIR, C., MAURICIO, F. et FERRANTE, L. (2007). Effects of nutrition on timing of mineralization in teeth in a Peruvian sample by the Cameriere and Demirjian methods. *Annals of Human Biology*, 34(5):547–556.

-
- CARDOSO, H. (2005). *Patterns of growth and development of the human skeleton and dentition in relation to environmental quality*. Thèse de doctorat, MacMaster University, Hamilton, Ontario.
 - CARTER, J. G. (1990). *Skeletal biomineralization : patterns, processes and evolutionary trends*. Van Nostrand Reinhold New York.
 - CASE, D. T. et ROSS, A. H. (2007). Sex determination from hand and foot bone lengths. *Journal of Forensic Sciences*, 52(2):264–270.
 - CASPER, R. C., SCHOELLER, D. A., KUSHNER, R., HNILICKA, J. et GOLD, S. T. (1991). Total daily energy expenditure and activity level in anorexia nervosa. *The American journal of clinical nutrition*, 53(5):1143–1150.
 - CHARLIER, P. (2005). Les dents d’Agnès Sorel.
 - CHARLIER, P. (2006). Qui a tué la Dame de Beauté? Étude scientifique des restes d’Agnès Sorel (1422-1450). *Histoire des sciences médicales*, 40(3):255–264.
 - CHO, S. et HWANG, C. (2009). Skeletal maturation evaluation using mandibular third molar development in adolescents. *The Korean Journal of Orthodontics*, 39(2):120.
 - CHOMEL, V. (1976). *Histoire de Grenoble*. Privat.
 - CHOU, T. P. et ADOLPH, W. H. (1935). Copper metabolism in man. *Biochemical Journal*, 29(2):476.
 - CHOWDHURY, A. K., . S. M. (2000). Nutritional status and age at menarche in a rural area of Bangladesh. *Annals of Human Biology*, 27(3):249–256.
 - CHU, N. C., HENDERSON, G. M., BELSHAW, N. S. et HEDGES, R. E. (2006). Establishing the potential of ca isotopes as proxy for consumption of dairy products. *Applied geochemistry*, 21(10):1656–1667.
 - CHURCHILL, S. (2006). Bioenergetic perspectives on Neanderthal thermoregulatory and activity budgets. *Neanderthals revisited : New approaches and perspectives*, page 113–133.
 - CLAVEL-CHAPELON, F. (2002). Evolution of age at menarche and at onset of regular cycling in a large cohort of French women. *Human Reproduction*, 17(1):228–232.
 - COHEN, L. A., GUTIERREZ, L., WEISS, A., LEICHTMANN-BARDOOGO, Y., ZHANG, D.-L., CROOKS, D. R., SOUGRAT, R., MORGENSTERN, A., GALY, B., HENTZE, M. W., LAZARO, F. J., ROUAULT, T. A. et MEYRON-HOLTZ, E. G. (2010). Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway. *Blood*, 116(9):1574–1584.
 - COLARDELLE, R. (2008). *La ville et la mort. Saint-Laurent de Grenoble, 2000 ans de tradition funéraire*. Numéro 11 de Bibliothèque de l’Antiquité tardive. Brepols publishers édition.
 - COLLINS, J. F., PROHASKA, J. R. et KNUTSON, M. D. (2010). Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutrition reviews*, 68(3):133–147.

- COUSINS, R. J. (1985). Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc : special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiological reviews*, 65(2):238–309.
- COX, M. (2000). Assessment of parturition. *Human Osteology in Archaeology and Forensic Science*. London : Greenwich Medical Media, page 131–142.
- CRUBÉZY, E., CAUSSE, L., DELMAS, J. et LODES, B. (1998). Le paysan médiéval en Rouergue. cimetièrre et église de canac (Campagnac, aveyron). *Musée Archéologique de Montrozier, Montrozier, Aveyron*.
- CRUBÉZY, E., TILLIER, A. et VANDERMEERSCH, B. (1993). Croissance et vieillissement : tendances et méthodes en anthropologie. *Bulletins et Mémoires de la Société d'anthropologie de Paris*, 5(1):5–6.
- CUNNINGHAM, J. J. (1980). A reanalysis of the factors influencing basal metabolic rate in normal adults. *The American journal of clinical nutrition*, 33(11):2372–2374.
- DANSGAARD, W. (1964). Stable isotopes in precipitation. *Tellus*, 16(4):436–468.
- DASCH, E. (1969). Strontium isotopes in weathering profiles, deep-sea sediments, and sedimentary rocks. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 33(12):1521–1552.
- DAUX, V., LÉCUYER, C., HÉRAN, M. A., AMIOT, R., SIMON, L., FOUREL, F., MARTINEAU, F., LYNNERUP, N., REYCHLER, H. et ESCARGUEL, G. (2008). Oxygen isotope fractionation between human phosphate and water revisited. *Journal of human evolution*, 55(6):1138–1147.
- DAUX, V. R., LÉCUYER, C., ADAM, F., MARTINEAU, F. et VIMEUX, F. (2005). Oxygen isotope composition of human teeth and the record of climate changes in France (Lorraine) during the last 1700 years. *Climatic change*, 70(3):445–464.
- de FREITAS, J. F. (1979). A survey of the elemental composition of alloy for dental amalgam. *Australian Dental Journal*, 24(1):17–25.
- de LA ROCHEBROCHARD, E. (2000). Age at puberty of girls and boys in France : Measurements from a survey on adolescent sexuality. *Population : An English Selection*, page 51–79.
- DEMIRJIAN, A., BUSCHANG, P., TANGUAY, R. et PATTERSON, D. (1985). Interrelationships among measures of somatic, skeletal, dental, and sexual maturity. *American Journal of Orthodontics*, 88(5):433–438.
- DEMIRJIAN, A., GOLDSTEIN, H., TANNER, J. M. et al. (1973). A new system of dental age assessment. *Hum Biol*, 45(2):211–27.
- DENIRO, M. J. (1987). Stable isotopy and archaeology. *American Scientist*, 75(2):182–191.
- DENIRO, M. J. et EPSTEIN, S. (1978). Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42(5):495–506.

-
- DENIRO, M. J. et EPSTEIN, S. (1981). Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45(3):341–351.
 - D’HAESE, P. C., COUTTENYE, M.-M., LAMBERTS, L. V., ELSEVIERS, M. M., GOODMAN, W. G., SCHROOTEN, I., CABRERA, W. E. et DE BROE, M. E. (1999). Aluminum, iron, lead, cadmium, copper, zinc, chromium, magnesium, strontium, and calcium content in bone of end-stage renal failure patients. *Clin Chem*, 45(9):1548–1556.
 - DIERS, C. J. (1974). Historical trends in the age at menarche and menopause. *Psychological Reports*, 34(3):931–937.
 - DOLLWET, H. et SORENSON, J. (1988). Roles of copper in bone maintenance and healing. *Biological Trace Element Research*, 18(1):39–48.
 - DUFF, E. (1975). Interactions of divalent cations with apatites. In *Physico-chimie et cristallographie des apatites d’intérêt biologique : colloques internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 10-15 septembre 1973*. Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS édition.
 - DUPRAS, T. L. et SCHWARCZ, H. P. (2001). Strangers in a strange land : stable isotope evidence for human migration in the Dakhleh Oasis, Egypt. *Journal of Archaeological Science*, 28(11):1199–1208.
 - DWIGHT, T. (2010). *The Identification of the Human Skeleton, a Medico-Legal Study : To Which Was Awarded the Prize of the Massachusetts Medical Society, For 1878 (1878)*. Kessinger Publishing.
 - EL-YAZEED, M. A., ZEID, W. A. et TAWFIK, W. (2008). Dental maturation assessment by Nolla’s technique on a group of Egyptian children. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(4):1418–24.
 - EVANS, J. A., CHENERY, C. A. et FITZPATRICK, A. P. (2006). Bronze age childhood migration of individuals near stonhenge, revealed by strontium and oxygen isotope tooth enamel analysis. *Archaeometry*, 48(2):309–321.
 - EVELETH, P. (1986). Timing of menarche : secular trend and population differences. In *School-age pregnancy and parenthood : biosocial dimensions, edited by Jane B. Lancaster and Beatrix A.*, pages 39–52. Aldine de Gruyter, New York, hamburg. new york édition.
 - FABRE, V. (2011). *Réponse démographique des Néandertaliens face aux pressions environnementales du stade isotopique3 : approche par modélisation écologique*. Thèse de doctorat, Aix-Marseille Université Faculté de Médecine de Marseille.
 - FAERMAN, M., BAR-GAL, G. K., FILON, D., GREENBLATT, C. L., STAGER, L., OPPENHEIM, A. et SMITH, P. (1998). Determining the sex of infanticide victims from the late roman era through ancient DNA analysis. *Journal of Archaeological Science*, 25:861–866.
 - FAERMAN, M., FILON, D., KAHILA, G., GREENBLATT, C. L., SMITH, P. et OPPENHEIM, A. (1995). Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the x and y amelogenin alleles. *Gene*, 167(1):327–332.

BIBLIOGRAPHIE

- FAERMAN, M., NEBEL, A., FILON, D., THOMAS, M. G., BRADMAN, N., RAGSDALE, B. D., SCHULTZ, M., OPPENHEIM, A. *et al.* (2000). From a dry bone to a genetic portrait : A case study of sickle cell anemia. *American journal of physical anthropology*, 111(2):153–164.
- FALSETTI, A. B. (1995). Sex assessment from metacarpals of the human hand. *Journal of Forensic Sciences*, 40(5):774–776.
- FANTLE, M. S. et DEPAOLO, D. J. (2004). Iron isotopic fractionation during continental weathering. *Earth and Planetary Science Letters*, 228(3):547–562.
- FILON, D., FAERMAN, M., SMITH, P. et OPPENHEIM, A. (1995). Sequence analysis reveals a β -thalassaemia mutation in the DNA of skeletal remains from the archaeological site of akhziv, israel. *Nature genetics*, 9(4):365–368.
- FOGEL, M. L., TUROSS, N. et OWSLEY, D. W. (1989). Nitrogen isotope tracers of human lactation in modern and archaeological populations. *Carnegie Institution of Washington Yearbook*, page 111–117.
- FOSTER, D. M., AAMODT, R. L., HENKIN, R. I. et BERMAN, M. (1979). Zinc metabolism in humans : a kinetic model. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 237(5):R340–R349.
- FRASER, I. S., MCCARRON, G., MARKHAM, R. *et al.* (1984). A preliminary study of factors influencing perception of menstrual blood loss volume. *American journal of obstetrics and gynecology*, 149(7):788.
- FRISCH, R. E., GOTZ-WELBERGEN, A. V., MCARTHUR, J. W., ALBRIGHT, T., WITSCHI, J., BULLEN, B., BIRNHOLZ, J., REED, R. B. et HERMANN, H. (1981). Delayed menarche and amenorrhea of college athletes in relation to age of onset of training. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 246(14):1559–1563.
- FRISCH, R. E., WYSHAK, G. et VINCENT, L. (1980). Delayed menarche and amenorrhea in ballet dancers. *New England Journal of Medicine*, 303(1):17–19.
- FROEHLE, A. W. et SCHOENINGER, M. J. (2006). Intraspecies variation in BMR does not affect estimates of early hominin total daily energy expenditure. *American journal of physical anthropology*, 131(4):552–559.
- GAUDINEAU, A., EHLINGER, V., VAYSSIÈRE, C., JOURET, B., ARNAUD, C. et GODEAU, E. (2010). Âge à la ménarche : résultats français de l'étude Health Behaviour in School-aged Children. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 38(6):385–387.
- GJERDET, N. R. et BERGE, M. (1983). Liberation of copper, zinc, and cadmium from different amalgams. *Acta Odontologica*, 41(4):217–220.
- GOULD, S. J. (1997). *La mal-mesure de l'homme*. O. Jacob.
- GROSS, K. A. et BERNDT, C. C. (2002). Biomedical application of apatites. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 48(1):631–672.
- GUELKE, M. et VON BLANCKENBURG, F. (2007). Fractionation of stable iron isotopes in higher plants. *Environmental science & technology*, 41(6):1896–1901.

-
- HALBOUT, P. A., GARNOTEL, A., ULRICH, E., POMAREDES, H. et CORNILLET, P. (1996). Détermination du sexe par polymérase chain reaction à partir de restes osseux humains antiques et médiévaux. *In Bulletins et mémoires de la Société d'anthropologie de Paris*, volume 8, pages 465–479. Société d'anthropologie.
 - HALL, R. L. (1967). Those late corn dates : Isotopic fractionation as a source of error in carbon-14 dates. *Michigan Archaeologist*, 13(4):1–9.
 - HALLBERG, L. et ROSSANDER-HULTEN, L. (1991). Iron requirements in menstruating women. *The American journal of clinical nutrition*, 54(6):1047–1058.
 - HARRIS, Z. L., DURLEY, A. P., MAN, T. K. et GITLIN, J. D. (1999). Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19):10812 – 10817.
 - HARVEY, L. J., ARMAH, C. N., DAINTY, J. R., FOXALL, R. J., JOHN LEWIS, D., LANGFORD, N. J., FAIRWEATHER-TAIT, S. J., HEMALATHA, S., PLATEL, K. et SRINIVASAN, K. (2005). Impact of menstrual blood loss and diet on iron deficiency among women in the UK. *British Journal of Nutrition*, 94(4):557–564.
 - HAWKES, K., O'CONNELL, J. F., JONES, N. G., ALVAREZ, H. et CHARNOV, E. L. (1998). Grandmothering, menopause, and the evolution of human life histories. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(3):1336.
 - HAYSEN, V. et LACY, R. C. (1985). Basal metabolic rates in mammals : Taxonomic differences in the allometry of BMR and body mass. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Physiology*, 81(4):741–754.
 - HELLIWELL, T., KELLY, S., WALSH, H., KLENERMAN, L., HAINES, J., CLARK, R. et ROBERTS, N. (1996). Elemental analysis of femoral bone from patients with fractured neck of femur or osteoarthritis. *Bone*, 18(2):151–157.
 - HELLMAN, N. E., KONO, S., MANCINI, G. M., HOOGEBOOM, A. J., de JONG, G. J. et GITLIN, J. D. (2002). Mechanisms of copper incorporation into human ceruloplasmin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48):46632 –46638.
 - HELM, P. et GRØNLUND, L. (1998). A halt in the secular trend towards earlier menarche in Denmark. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 77(2):198–200.
 - HENRY, C. J., DYER, S. et GHUSAIN-CHOUERI, A. (1999). New equations to estimate basal metabolic rate in children aged 10-15 years. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53(2):134–142.
 - HENRY, C. J. et REES, R. (1991). New predictive equations for the estimation of basal metabolic rate in tropical peoples. *European journal of clinical nutrition*, 45(4):177.
 - HENRY, C. J. K. (2005). Basal metabolic rate studies in humans : measurement and development of new equations. *Public Health Nutrition-Cab International*, 8(7A):1133.
 - HENRY, C. J. K., SCHÜRCH, B. et SCRIMSHAW, N. S. (2000). Mechanisms of changes in basal metabolism during ageing. *In Impact of human aging on energy and protein*

- metabolism and requirements. Proceedings of an IDECG workshop, Boston, USA, 3-6 May, 1999.*, volume 54, page S77–S91.
- HENTZE, M. W., MUCKENTHALER, M. U. et ANDREWS, N. C. (2004). Balancing acts : molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*, 117(3):285–297.
 - HERRSCHER, E. (2003). Alimentation d’une population historique : Analyse des données isotopiques de la nécropole Saint-Laurent de Grenoble (XIIIe-XVe siècle, France). *Bulletins et mémoires de la Société d’anthropologie de Paris*, 15(3-4):147–309.
 - HERRSCHER, E. (2005). Comportements socioculturels liés à l’allaitement et au sevrage : le cas d’une population grenobloise sous l’ancien régime. *Annales Fyssen*, 20:46–66.
 - HERRSCHER, E., BOCHERENS, H., VALENTIN, F. et COLARDELLE, R. (2001). Comportements alimentaires au Moyen Age à Grenoble : application de la biogéochimie isotopique à la nécropole de Saint-Laurent (xiiiè-xvè siècles, Isère, France). *Comptes rendus de l’Académie des sciences*, 324(2):479–487.
 - HERRSCHER, E., COLARDELLE, R. et VALENTIN, F. (2006). «Meulières et pathologies humaines : un rapport effectif? analyse d’une documentation bucco-dentaire entre le XIIIe et le XVIIIe siècle à Grenoble». In *Alain Belmont et Fritz Mangartz, Les meulières. Recherche, protection et valorisation d’un patrimoine industriel européen (Antiquité-XXI e s.), Actes du colloque de Grenoble, Mainz, RGZM.*
 - HERRSCHER, E. et KATZENBERG, M. (2008). Isotopic variability and health status in a french historical population, abstract. In *17th European Meeting of the Paleopathological Association*. Benniske, p édition.
 - HILLSON, S. (1996). *Dental anthropology*. Cambridge University Press Cambridge.
 - HOCKETT, B. et HAWS, J. A. (2005). Nutritional ecology and the human demography of neandertal extinction. *Quaternary International*, 137(1):21–34.
 - HOLTGRAVE, E. A., KRETSCHMER, R. et MÜLLER, R. (1997). Acceleration in dental development : Fact or fiction. *The European Journal of Orthodontics*, 19(6):703–710.
 - HOTZ, K., AUGSBURGER, H. et WALCZYK, T. (2011). Isotopic signatures of iron in body tissues as a potential biomarker for iron metabolism. *J. Anal. At. Spectrom.*, 26(7):1347–1353.
 - HOTZ, K., KRAYENBUEHL, P. A. et WALCZYK, T. (2012). Mobilization of storage iron is reflected in the iron isotopic composition of blood in humans. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, page 1–9.
 - HUBLIN, J. J. et ROEBROEKS, W. (2009). Ebb and flow or regional extinctions? on the character of Neandertal occupation of northern environments. *Comptes Rendus Palevol*, 8(5):503–509.
 - HUNT, J. R., ZITO, C. A. et JOHNSON, L. K. (2009). Body iron excretion by healthy men and women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(6):1792–1798.

-
- HUNTER, G. R., WEINSIER, R. L., GOWER, B. A. et WETZSTEIN, C. (2001). Age-related decrease in resting energy expenditure in sedentary white women : effects of regional differences in lean and fat mass. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2):333–337.
 - HURST, R. et DAVIS, T. (1981). Strontium isotopes as tracers of airborne fly ash from coal-fired power plants. *Environmental Geology*, 3(6):363–367.
 - HÄUSLER, M. et SCHMID, P. (1995). Comparison of the pelvises of sts 14 and AL288-1 : implications for birth and sexual dimorphism in australopithecines. *Journal of Human Evolution*, 29(4):363–383.
 - JAOUEN, K. et BALTER, V. Iron and copper isotopic budget at menopause. *soumis*.
 - JAOUEN, K., BALTER, V., GIBERT, M., LAMBOUX, A., TELOUK, P., FOUREL, F., ALEKSEEV, A. et CRUBÉZY, E. Basal metabolic rates, aging and the Cu and Zn stable isotope compositions in blood of a remote Yakut population. *soumis*.
 - JAOUEN, K., BALTER, V., HERRSCHER, E., LAMBOUX, A., TELOUK, P. et ALBARÈDE, F. (2012). Fe and Cu stable isotopes in archeological human bones and their relationship to sex. *American Journal of Physical Anthropology*, 148(3):334–340.
 - JAOUEN, K., BALTER, V., LAMBOUX, A., TELOUK, P., HERRSCHER, E. et ALBARÈDE, F. (2011). Sexing human blood and bones with metal stable isotopes. *American Journal of Physical Anthropology*, 144(Suppl. 52):177. Conference Information : 80th Annual Meeting of the American-Association-of-Physical-Anthropologists Minneapolis, MN, APR 11-16, 2011 Amer Assoc Phys Anthropol.
 - JAOUEN, K., PONS, M. L. et BALTER, V. Iron, copper and zinc isotopic fractionation up mammal trophic chains. *soumis*.
 - JIMÉNEZ-ESPEJO, F. J., MARTÍNEZ-RUIZ, F., FINLAYSON, C., PAYTAN, A., SAKAMOTO, T., ORTEGA-HUERTAS, M., FINLAYSON, G., IJIMA, K., GALLEGO-TORRES, D. et FA, D. (2007). Climate forcing and neanderthal extinction in southern iberia : insights from a multiproxy marine record. *Quaternary Science Reviews*, 26(7):836–852.
 - JOHNSON, P. E., MILNE, D. B. et LYKKEN, G. I. (1992). Effects of age and sex on copper absorption, biological half-life, and status in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 56(5):917–925.
 - JOHNSTONE, A. M., MURISON, S. D., DUNCAN, J. S., RANCE, K. A. et SPEAKMAN, J. R. (2005). Factors influencing variation in basal metabolic rate include fat-free mass, fat mass, age, and circulating thyroxine but not sex, circulating leptin, or triiodothyronine. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(5):941–948.
 - JOUVIN, D., WEISS, D. J., MASON, T. F., BRAVIN, M., LOUVAT, P., ZHAO, F. J., FEREC, F., HINSINGER, P. et BENEDETTI, M. F. (2012). Stable isotopes of Cu and Zn in higher plants : Evidence for Cu reduction at the root surface and two conceptual models for isotope fractionation processes. *Environmental Science & Technology*.

BIBLIOGRAPHIE

- KASHIWAZAKI, H., DEJIMA, Y., ORIAS-RIVERA, J. et COWARD, W. A. (1995). Energy expenditure determined by the doubly labeled water method in bolivian aymara living in a high altitude agropastoral community. *The American journal of clinical nutrition*, 62(5):901–910.
- KATZENBERG, M. A. et PFEIFFER, S. (1995). JL4 nitrogen isotope evidence for weaning age in a nineteenth century canadian skeletal sample. *Bodies of evidence : reconstructing history through skeletal analysis*, page 221.
- KATZENBERG, M. A. et SAUNDERS, S. R. (2011). *Biological Anthropology of the Human Skeleton*. John Wiley & Sons.
- KERLEY, E. R. (1965). The microscopic determination of age in human bone. *American journal of physical anthropology*, 23(2):149–163.
- KLEIBER, M. (1947). Body size and metabolic rate. *Physiol. Rev*, 27(4):511–541.
- KLEIN, K. O., BARON, J., COLLI, M. J., MCDONNELL, D. P. et CUTLER, G. B. (1994). Estrogen levels in childhood determined by an ultrasensitive recombinant cell bioassay. *Journal of Clinical Investigation*, 94(6):2475–2480.
- KNUDSON, K. J., WILLIAMS, H. M., BUIKSTRA, J. E., TOMCZAK, P. D., GORDON, G. W. et ANBAR, A. D. (2010). Introducing 88/86 Sr analysis in archaeology : a demonstration of the utility of strontium isotope fractionation in paleodietary studies. *Journal of Archaeological Science*, 37(9):2352–2364.
- KNUTSON, M. et WESSLING-RESNICK, M. (2003). Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 38(1):61–88.
- KOHN, M. J., SCHOENINGER, M. J. et BARKER, W. W. (1999). Altered states : effects of diagenesis on fossil tooth chemistry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(18):2737–2747.
- KOSMAN, D. J. (2002). FET3P, ceruloplasmin, and the role of copper in iron metabolism. *Advances in protein chemistry*, 60:221–269.
- KRAYENBUEHL, P. A., WALCZYK, T., SCHOENBERG, R., von BLANCKENBURG, F. et SCHULTHESS, G. (2005). Hereditary hemochromatosis is reflected in the iron isotope composition of blood. *Blood*, 105(10):3812–3816.
- LAPPALAINEN, R., KNUUTTILA, M., LAMMI, S., ALHAVA, E. M. et OLKKONEN, H. (1982). Zn and Cu content in human cancellous bone. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 53(1):51–55.
- LEACH, B. F., QUINN, C. J. et LYON, G. L. (1996). A stochastic approach to the reconstruction of prehistoric human diet in the pacific region from bone isotope signatures. *Tuhinga, Records of the Museum of New Zealand Te Papa Tongarewa*, 8:1–54.
- LEONARD, W. R., SORENSEN, M. V., GALLOWAY, V. A., SPENCER, G. J., MOSHER, M., OSIPOVA, L. et SPITSYN, V. A. (2002). Climatic influences on basal metabolic rates among circumpolar populations. *American Journal of Human Biology*, 14(5):609–620.

-
- LEWIS, M. E. (2007). *The Bioarchaeology of Children : Perspectives from Biological And Forensic Anthropology*. Cambridge University Press.
 - LIBBY, W. F., ANDERSON, E. C. et ARNOLD, J. R. (1949). Age determination by radiocarbon content : world-wide assay of natural radiocarbon. *Science*, 109(2827): 227–228.
 - LIBBY, W. F., BERGER, R., MEAD, J. F., ALEXANDER, G. V. et ROSS, J. F. (1964). Replacement rates for human tissue from atmospheric radiocarbon. *Science*, 146(3648): 1170–1172.
 - LINDER, M. C. et HAZEGH-AZAM, M. (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *The American journal of clinical nutrition*, 63(5):797S–811S.
 - LINDER, M. C., LOMELI, N. A., DONLEY, S., MEHRBOD, F., CERVEZA, P., COTTON, S. et WOOTEN, L. (1999). Copper transport in mammals. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 448:1–16.
 - LIVERSIDGE, H. (1999). Dental maturation of 18th and 19th century British children using Demirjian's method. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 9(2):111–115.
 - LIVERSIDGE, H. M. (2008). Timing of human mandibular third molar formation. *Annals of Human Biology*, 35(3):294–321.
 - LIVERSIDGE, H. M. (2010). Demirjian stage tooth formation results from a large group of children. *J Dental Antntropology*, 23(1):16–23.
 - LOF, M., OLAUSSON, H., BOSTROM, K., JANEROT-SJÖBERG, B., SOHLSTROM, A. et FORSUM, E. (2005). Changes in basal metabolic rate during pregnancy in relation to changes in body weight and composition, cardiac output, insulin-like growth factor i, and thyroid hormones and in relation to fetal growth. *The American journal of clinical nutrition*, 81(3):678–685.
 - LONGINELLI, A. (1984). Oxygen isotopes in mammal bone phosphate : A new tool for paleohydrological and paleoclimatological research ? *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48(2):385–390.
 - LOVEJOY, C. O., MEINDL, R. S., MENSFORTH, R. P. et BARTON, T. J. (1985a). Multifactorial determination of skeletal age at death : A method and blind tests of its accuracy. *American Journal of Physical Anthropology*, 68(1):1–14.
 - LOVEJOY, C. O., MEINDL, R. S., PRYZBECK, T. R. et MENSFORTH, R. P. (1985b). Chronological metamorphosis of the auricular surface of the ilium : a new method for the determination of adult skeletal age at death. *American Journal of Physical Anthropology*, 68(1):15–28.
 - LUZ, B., KOLODNY, Y. et HOROWITZ, M. (1984). Fractionation of oxygen isotopes between mammalian bone-phosphate and environmental drinking water. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48(8):1689–1693.
 - LYENGAR, G., KOLLMER, W. et BOWEN, H. (1978). *The Elemental Composition of Human Tissues And Body Fluids : a Compilation of Values for Adults*. Weinheim : Verlag chemie édition.

- LÉCUYER, C., GRANDJEAN, P., PARIS, F., ROBARDET, M. et ROBINEAU, D. (1996). Deciphering “temperature” and “salinity” from biogenic phosphates : the d18O of coexisting fishes and mammals of the Middle Miocene sea of western France. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 126(1-2):61-74.
- LÓPEZ-GARCÍA, J. M., CUENCA-BESCÓS, G., BLAIN, H. A., ÁLVAREZ LAO, D., UZQUIANO, P., ADÁN, G., ARBIZU, M. et ARSUAGA, J. L. (2011). Palaeoenvironment and palaeoclimate of the Mousterian-Aurignacian transition in northern Iberia : The small-vertebrate assemblage from Cueva del Conde (Santo Adriano, Asturias). *Journal of human evolution*.
- LÖNNERDAL, B. O. (2000). Dietary factors influencing zinc absorption. *The Journal of nutrition*, 130(5):1378S-1383S.
- MACDONALD, K., ROEBROEKS, W. et VERPOORTE, A. (2009). An energetics perspective on the Neandertal record. *The Evolution of Hominin Diets*, page 211-220.
- MACKO, S. A., ENGEL, M. H., ANDRUSEVICH, V., LUBEC, G., O’CONNELL, T. C. et HEDGES, R. E. (1999). Documenting the diet in ancient human populations through stable isotope analysis of hair. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 354(1379):65-76.
- MARTÍNEZ-GARCÍA, M., MORENO, J., MORENO-CLAVEL, J., VERGARA, N., GARCÍA-SÁNCHEZ, A., GUILLAMÓN, A., PORTÍ, M. et MORENO-GRAU, S. (2005). Heavy metals in human bones in different historical epochs. *Science of The Total Environment*, 348(1-3):51-72.
- MARÉCHAL, C. (1998). *Géochimie des isotopes du cuivre et du zinc : méthode, variabilité et application océanographique*. Thèse.
- MARÉCHAL, C. et ALBARÈDE, F. (2002). Ion-exchange fractionation of copper and zinc isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66(9):1499-1509.
- MARÉCHAL, C. N., TÉLOUK, P. et ALBARÈDE, F. (1999). Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chemical Geology*, 156(1-4):251-273.
- MASSET, C. (1987). Le recrutement d’un ensemble funéraire. *In Anthropologie physique et archéologie : méthodes d’études des sépultures*. Paris : Editions du CNRS. p, page 111-134.
- MATKOVIC, V., ILICH, J. Z., SKUGOR, M., BADENHOP, N. E., GOEL, P., CLAIRMONT, A., KLISOVIC, D., NAHHAS, R. W. et LANDOLL, J. D. (1997). Leptin is inversely related to age at menarche in human females. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(10):3239-3245.
- MAYS, S. et FAERMAN, M. (2001). Sex identification in some putative infanticide victims from Roman Britain using ancient DNA. *Journal of Archaeological Science*, 28(5):555-559.

-
- MCKIE, A. T. *et al.* (2008). The role of Dcytb in iron metabolism : an update. *Biochemical Society Transactions*, 36(Pt 6):1239.
 - MEINDL, R. S. et LOVEJOY, C. O. (1985). Ectocranial suture closure : A revised method for the determination of skeletal age at death based on the lateral-anterior sutures. *American journal of physical anthropology*, 68(1):57–66.
 - MEISSNER, C. et RITZ-TIMME, S. (2010). Molecular pathology and age estimation. *Forensic science international*, 203(1-3):34–43.
 - MINCER, H. H., HARRIS, E. F., BERRYMAN, H. E. *et al.* (1993). The ABFO study of third molar development and its use as an estimator of chronological age. *Journal of Forensic Sciences*, 38:379–379.
 - MINSON, D. J., LUDLOW, M. M. et TROUGHTON, J. (1975). Differences in natural carbon isotope ratios of milk and hair from cattle grazing tropical and temperate pastures. 256(5518):602–602.
 - MITAMURA, R., YANO, K., SUZUKI, N., ITO, Y., MAKITA, Y. et OKUNO, A. (2000). Diurnal rhythms of luteinizing hormone, Follicle-Stimulating hormone, testosterone, and estradiol secretion before the onset of female puberty in short children. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(3):1074–1080.
 - MITCHELL, P. D. et MILLARD, A. R. (2009). Migration to the medieval Middle East with the Crusades. *American journal of physical anthropology*, 140(3):518–525.
 - MOLNAR, S. (1971). Sex, age, and tooth position as factors in the production of tooth wear. *American Antiquity*, page 182–188.
 - MOORREES, C. F. A., FANNING, E. A. et HUNT, E. E. (1963). Age variation of formation stages for ten permanent teeth. *Journal of Dental Research*, 42(6):1490–1502.
 - MOYNIER, F., ALBARÈDE, F. et HERZOG, G. (2006). Isotopic composition of zinc, copper, and iron in lunar samples. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(24):6103–6117.
 - MOYNIER, F., PICHAT, S., PONS, M., FIKE, D., BALTER, V. et ALBARÈDE, F. (2009). Isotopic fractionation and transport mechanisms of Zn in plants. *Chemical Geology*, 267(3-4):125–130.
 - MURAIL, P., BRUZEK, J., HOUËT, F. et CUNHA, E. (2005). DSP : a tool for probabilistic sex diagnosis using worldwide variability in hip-bone measurements. *Bulletins et mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris*, (17 (3-4)):167–176.
 - MÜLLER, W., FRICKE, H., HALLIDAY, A. N., MCCULLOCH, M. T. et WARTHO, J. A. (2003). Origin and migration of the Alpine Iceman. *Science*, 302(5646):862–866.
 - NEHLICH, O., FULLER, B. T., JAY, M., MORA, A., NICHOLSON, R. A., SMITH, C. I. et RICHARDS, M. P. (2011). Application of sulphur isotope ratios to examine weaning patterns and freshwater fish consumption in roman oxfordshire, UK. *Geochimica et Cosmochimica Acta*.

BIBLIOGRAPHIE

- NERLICH, A. G., HAAS, C. J., ZINK, A., SZEIMIES, U. et HAGEDORN, H. G. (1997). Molecular evidence for tuberculosis in an ancient egyptian mummy. *The Lancet*, 350(9088):1404.
- NIXON, G., LIVINGSTON, H. et SMITH, H. (1967). Estimation of zinc in human enamel by activation analysis. *Archives of Oral Biology*, 12(3):411–416.
- NOLLA, C. M. (1960). The development of the permanent teeth. *Journal of dentistry for children*, 27(2):254–266.
- NYSTRÖM, M., HAATAJA, J., KATAJA, M., EVALAHTI, M., PECK, L. et KLEEMOLA-KUJALA, E. (1986). Dental maturity in Finnish children, estimated from the development of seven permanent mandibular teeth. *Acta Odontologica*, 44(4):193–198.
- O'CONNELL, T. C., HEDGES, R. E. *et al.* (1999). Investigations into the effect of diet on modern human hair isotopic values. *American Journal of Physical Anthropology*, 108(4):409–425.
- OHNO, T., SHINOHARA, A., CHIBA, M. et HIRATA, T. (2005). Precise zn isotopic ratio measurements of human red blood cell and hair samples by multiple collector-ICP-mass spectrometry. *Analytical sciences*, 21(4):425–428.
- OHNO, T., SHINOHARA, A., KOHGE, I., CHIBA, M. et HIRATA, T. (2004). Isotopic analysis of fe in human red blood cells by multiple collector-ICP-mass spectrometry. *Analytical sciences*, 20(4):617–621.
- OKASHA, M. McCarron, P. D. G. (2001). Age at menarche : secular trends and association with adult anthropometric measures. *Annals of Human Biology*, 28(1):68–78.
- OWEN, O. E. *et al.* (1988). Resting metabolic requirements of men and women. *In Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, volume 63, page 503.
- PAN, Y. et FLEET, M. E. (2002). Compositions of the apatite-group minerals : Substitution mechanisms and controlling factors. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 48(1):13–49.
- Panel on MICRONUTRIENTS, S. (2001). Dietary reference intakes for vitamin a, vitamin k, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *In Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc.*, volume chap.9. Food and nutrition board, institute of medicine, édition.
- PAPANIKOLAOU, G. et PANTOPOULOS, K. (2005). Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 202(2):199–211.
- PARENT, A. S., TEILMANN, G., JUUL, A., SKAKKEBAEK, N. E., TOPPARI, J. et BOURGUIGNON, J. P. (2003). The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity : variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocrine reviews*, 24(5):668–693.

-
- PATTERSON, C. (1956). Age of meteorites and the earth. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 10(4):230–237.
 - PATTERSON, C., TILTON, G. et INGRAM, M. (1955). Age of the earth. *Science*, 121(3134):69–75.
 - PAVELKA, M. S. et FEDIGAN, L. M. (1991). Menopause : a comparative life history perspective. *American Journal of Physical Anthropology*, 34(S13):13–38.
 - PECCEI, J. S. (2001). A critique of the grandmother hypotheses : old and new. *American Journal of Human Biology*, 13(4):434–452.
 - PENSLER, J. M., LEDESMA, D. F., HIJJAWI, J. et RADOSEVICH, J. A. (1994). Plagiocephaly : premature unilateral closure of the coronal suture : a potentially localized disorder of cellular metabolism. *Annals of Plastic Surgery*, 32(2):160–165. PMID : 8192366.
 - PHILIPPE, E. (1992). *Pathologie gynécologique et obstétricale*. Elsevier Masson.
 - PICHAT, S., DOUCHET, C. et ALBARÈDE, F. (2003). Zinc isotope variations in deep-sea carbonates from the eastern equatorial pacific over the last 175 ka. *Earth and Planetary Science Letters*, 210(1):167–178.
 - PIERS, L. S., DIFFEY, B., SOARES, M. J., FRANSEN, S. L., MCCORMACK, L. M., LUTSCHINI, M. J., O'DEA, K. *et al.* (1997). The validity of predicting the basal metabolic rate of young Australian men and women. *European journal of clinical nutrition*, 51(5):333–337.
 - PIERS, L. S., SOARES, M. J., MCCORMACK, L. M. et O'DEA, K. (1998). Is there evidence for an age-related reduction in metabolic rate? *Journal of Applied Physiology*, 85(6):2196–2204.
 - PIETTE, E. et GOLDBERG, M. (2001). *La dent normale et pathologique*. De Boeck Supérieur.
 - POKROVSKY, O., VIERS, J. et FREYDIER, R. (2005). Zinc stable isotope fractionation during its adsorption on oxides and hydroxides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 291(1):192–200.
 - POLITO, A., FABBRI, A., FERRO-LUZZI, A., CUZZOLARO, M., CENSI, L., CIARAPICA, D., FABBRINI, E. et GIANNINI, D. (2000). Basal metabolic rate in anorexia nervosa : relation to body composition and leptin concentrations. *The American journal of clinical nutrition*, 71(6):1495–1502.
 - POLLYCOVE, M. et MORTIMER, R. (1961). The quantitative determination of iron kinetics and hemoglobin synthesis in human subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 40(5):753.
 - PONS, M., QUITTÉ, G. et ROSING, M. The rise of continents and the emergence of soil. *soumis*.

- PONTZER, H., RAICHLEN, D. A., SHUMAKER, R. W., OCOBOCK, C. et WICH, S. A. (2010). Metabolic adaptation for low energy throughput in orangutans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32):14048–14052.
- POPP, S., BELOLYUBSKY, I., LEHMKUHL, F., PROKOPIEV, A., SIEGERT, C., SPEKTOR, V., STAUCH, G. et DIEKMANN, B. (2007). Sediment provenance of late Quaternary morainic, fluvial and loess-like deposits in the southwestern Verkhoyansk Mountains (eastern Siberia) and implications for regional palaeoenvironmental reconstructions. *Geological Journal*, 42(5):477–497.
- PRICE, T., BLITZ, J., BURTON, J. et EZZO, J. A. (1992). Diagenesis in prehistoric bone : Problems and solutions. *Journal of Archaeological Science*, 19(5):513–529.
- PRICE, T. D., SCHOENINGER, M. et ARMELAGOS, G. (1985). Bone chemistry and past behavior : an overview. *Journal of Human Evolution*, 14(5):419–447.
- REYNARD, L. M., HENDERSON, G. M. et HEDGES, R. E. M. (2011). Calcium isotopes in archaeological bones and their relationship to dairy consumption. *Journal of Archaeological Science*, 38(3):657–664.
- RICHARDS, L. C. et BROWN, T. (1981). Dental attrition and age relationships in Australian Aboriginals. *Archaeology in Oceania*, 16(2):94–98.
- RICHARDS, M., HARVATI, K., GRIMES, V., SMITH, C., SMITH, T., HUBLIN, J. J., KARKANAS, P. et PANAGOPOULOU, E. (2008). Strontium isotope evidence of Neanderthal mobility at the site of Lakonis, Greece using laser-ablation PIMMS. *Journal of Archaeological Science*, 35(5):1251–1256.
- RICHARDS, M. P., FULLER, B. T. et HEDGES, R. E. M. (2001). Sulphur isotopic variation in ancient bone collagen from Europe : implications for human palaeodiet, residence mobility, and modern pollutant studies. *Earth and Planetary Science Letters*, 191(3):185–190.
- RICHARDS, M. P., FULLER, B. T., SPONHEIMER, M., ROBINSON, T. et AYLIFFE, L. (2003). Sulphur isotopes in palaeodietary studies : a review and results from a controlled feeding experiment. *International Journal of Osteoarchaeology*, 13(1-2): 37–45.
- RICHARDS, M. P., HEDGES, R. E. M., MOLLESON, T. I. et VOGEL, J. C. (1998). Stable isotope analysis reveals variations in human diet at the Poundbury Camp cemetery site. *Journal of Archaeological Science*, 25(12):1247–1252.
- RICHARDS, M. P., JACOBI, R., COOK, J., PETTITT, P. B. et STRINGER, C. B. (2005). Isotope evidence for the intensive use of marine foods by late Upper Palaeolithic humans. *Journal of Human Evolution*, 49(3):390–394.
- RICHARDS, M. P., MAYS, S. et FULLER, B. T. (2002). Stable carbon and nitrogen isotope values of bone and teeth reflect weaning age at the Medieval Wharram Percy site, Yorkshire, UK. *American Journal of Physical Anthropology*, 119(3):205–210.

-
- ROBLING, A. G. et STOUT, S. D. (2000). Methods of determining age at death using bone microstructure. *Biological anthropology of the human skeleton*. New York, NY : Wiley-Liss, page 187–205.
 - RODE, A. et SHEPHARD, R. (1995). Basal metabolic rate of inuit. *American Journal of Human Biology*, 7(6):723–729.
 - ROZA, A. M. et SHIZGAL, H. M. (1984). The Harris Benedict equation reevaluated : resting energy requirements and the body cell mass. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 40(1):168–182.
 - SAKAMANTO, S. (1982). Bone. In *Collagen in health and disease*. Churchill Livingstone, weiss, J.B. édition.
 - SCHEUER, J. L. et ELKINGTON, N. M. (1993). Sex determination from metacarpals and the first proximal phalanx. *Journal of forensic sciences*, 38(4):769.
 - SCHMITT, A. (2002). Estimation de l'âge au décès des sujets adultes à partir du squelette : des raisons d'espérer. *Bulletins et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris*, (14 (1-2)).
 - SCHMITT, A. (2005). Une nouvelle méthode pour estimer l'âge au décès des adultes à partir de la surface sacro-pelvienne iliaque. *Bulletins et mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris*, (17 (1-2)):89–101.
 - SCHMITT, A., MURAIL, P., CUNHA, E. et ROUGÉ, D. (2002). Variability of the pattern of aging on the human skeleton : evidence from bone indicators and implications on age at death estimation. *Journal of forensic sciences*, 47(6):1203.
 - SCHOENINGER, M. J. et DENIRO, M. J. (1984). Nitrogen and carbon isotopic composition of bone collagen from marine and terrestrial animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48(4):625–639.
 - SCHOFIELD, W. N. *et al.* (1985). Predicting basal metabolic rate, new standards and review of previous work. *Human nutrition. Clinical nutrition*, 39:5.
 - SCHUTTE, I. C. (2008). The general geology of the Kruger National Park. *Koedoe-African Protected Area Conservation and Science*, 29(1):13–37.
 - SCOTT, E. C. (1979). Dental wear scoring technique. *American Journal of Physical Anthropology*, 51(2):213–217.
 - SCOTT, K. C. et TURNLUND, J. R. (1994). Compartmental model of copper metabolism in adult men. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 5(7):342–350.
 - SEALY, J., ARMSTRONG, R. et SCHRIRE, C. (1995). Beyond lifetime averages : tracing life histories through isotopic analysis of different calcified tissues from archaeological human skeletons. *Antiquity*, 69(263):290–300.
 - SEIDLER, H., BERNHARD, W., TESCHLER-NICOLA, M., PLATZER, W., ZUR NEDDEN, D., HENN, R., OBERHAUSER, A. et SJOVOLD, T. (1992). Some anthropological aspects of the prehistoric Tyrolean Ice Man. *Science*, 258(5081):455–457.

BIBLIOGRAPHIE

- SEPULCHRE, P., RAMSTEIN, G., KAGEYAMA, M., VANHAEREN, M., KRINNER, G., SÁNCHEZ-GOÑI, M. F. et D'ERRICO, F. (2007). H4 abrupt event and late Neanderthal presence in Iberia. *Earth and Planetary Science Letters*, 258(1):283–292.
- SHINOMIYA, T., SHINOMIYA, K., ORIMOTO, C., MINAMI, T., TOHNO, Y. et YAMADA, M.-o. (1998). In- and out-flows of elements in bones embedded in reference soils. *Forensic Science International*, 98(1–2):109–118.
- SHONE, R. W. et BOOTH, P. W. K. (2005). The Cape Basin, South Africa : A review. *Journal of African Earth Sciences*, 43(1-3):196–210.
- SHORTER, E. (1981). L'âge des premières règles en France, 1750-1950. *Annales*, page 495–511.
- SJOVOLD (1996). Ice man didn't die young * Ex-Mobil scientist vindicated * berkeley gets chief for gene mappers. *Science*, 272(5270):1875–1875.
- SMITH, B. H. (1991). Standards of human tooth formation and dental age assessment. *Advances in dental anthropology*. New York : Wiley-Liss. p, page 143–168.
- SMITH, C. E. (1998). Cellular and chemical events during enamel maturation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 9(2):128–161.
- SNODGRASS, J. et LEONARD, W. R. (2009). Neandertal energetics revisited : Insights into population dynamics and life history evolution. *PaleoAnthropology*, 2009:220–237.
- SNODGRASS, J. J., LEONARD, W. R., TARSKAIA, L. A., ALEKSEEV, V. P. et KRIVOSHAPKIN, V. G. (2005). Basal metabolic rate in the Yakut (Sakha) of Siberia. *American Journal of Human Biology*, 17(2):155–172.
- SOARES, M., FRANCIS, D. et SHETTY, P. (1993). Predictive equations for basal metabolic rates of Indian males. *European journal of clinical nutrition*, 47(6):389.
- SONKE, J. E., SIVRY, Y., VIERS, J., FREYDIER, R., DEJONGHE, L., ANDRÉ, L., AGGARWAL, J. K., FONTAN, F. et DUPRÉ, B. (2008). Historical variations in the isotopic composition of atmospheric zinc deposition from a zinc smelter. *Chemical geology*, 252(3):145–157.
- SORENSEN, M. V. et LEONARD, W. R. (2001). Neandertal energetics and foraging efficiency. *Journal of Human Evolution*, 40(6):483–495.
- STEEGMANN JR, A. T., CERNY, F. J. et HOLLIDAY, T. W. (2002). Neandertal cold adaptation : physiological and energetic factors. *American Journal of Human Biology*, 14(5):566–583.
- STEELE, D. G. et BRAMBLETT, C. A. (1988). *The Anatomy and Biology of the Human Skeleton*. Texas A&M University Press.
- STENBERG, A., MALINOVSKY, D., ÖHLANDER, B., ANDRÉN, H., FORSLING, W., ENGSTRÖM, L. M., WAHLIN, A., ENGSTRÖM, E., RODUSHKIN, I. et BAXTER, D. C. (2005). Measurement of iron and zinc isotopes in human whole blood : preliminary application to the study of HFE genotypes. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19(1):55–60.

-
- STENHOUSE, M. et BAXTER, M. (1979). The uptake of bomb ^{14}C in humans. *In Radiocarbon Dating : Proceedings of the Ninth International Conference, Los Angeles and La Jolla, 1976*. University of California Press, berger, r ; suess, O.H.E édition.
 - STEWART, J. R. (2007). Neanderthal extinction as part of the faunal change in Europe during Oxygen Isotope Stage 3. *Acta Zoologica Cracoviensia-Series A : Vertebrata*, 50, 1(2):93–124.
 - STOJANOWSKI, C. M. (1999). Sexing potential of fragmentary and pathological metacarpals. *American Journal of Physical Anthropology*, 109(2):245–252.
 - STONE, A. C., MILNER, G. R., PÄÄBO, S. et STONEKING, M. (1996). Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *American Journal of Physical Anthropology*, 99(2):231–238.
 - SČANČAR, J., MILAČIČ, R., BENEDIK, M. et BUKOVEC, P. (2000). Determination of trace elements and calcium in bone of the human iliac crest by atomic absorption spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 293(1–2):187–197.
 - TAPIERO, H., TOWNSEND, D. M. et TEW, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology. copper. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 57(9):386–398.
 - TARCY, E., SCHMITT, A. et HERRSCHER, E. (2012). Les caractères discrets permettent-ils de différencier une population autochtone d'une population allochtone ? application sur la nécropole de saint-laurent de grenoble (xiii-xviii siècles, france). *Mémoire de Master, Université de Provence*.
 - TAVASSOLI, M., KISHIMOTO, T. et KATAOKA, M. (1986). Liver endothelium mediates the hepatocyte's uptake of ceruloplasmin. *The Journal of Cell Biology*, 102(4):1298–1303.
 - TERADA, K., AIBA, N., YANG, X. L., IIDA, M., NAKAI, M., MIURA, N. et SUGIYAMA, T. (1999). Biliary excretion of copper in LEC rat after introduction of copper transporting p-type ATPase, ATP7B. *FEBS letters*, 448(1):53–56.
 - THOMAS, F., RENAUD, F., BENEFICE, E., MEEUS, T. d. et GUEGAN, J. (2001). International variability of ages at menarche and menopause : Patterns and main determinants. *Human Biology*, 73(2):271–290.
 - THOMAS, F., TERIOKHIN, A., RENAUD, F., DE MEEÛS, T. et GUÉGAN, J. (2000). Human longevity at the cost of reproductive success : evidence from global data. *Journal of Evolutionary Biology*, 13(3):409–414.
 - TIESZEN, L. L. et FAGRE, T. (1993). Effect of diet quality and composition on the isotopic composition of respiratory CO_2 , bone collagen, bioapatite, and soft tissues. *Molecular archaeology of prehistoric human bone*. Springer, Berlin Heidelberg New York, page 121–155.
 - TRUEMAN, C. N. et MARTILL, D. M. (2002). The long-term survival of bone : the role of bioerosion. *Archaeometry*, 44(3):371–382.

BIBLIOGRAPHIE

- TRUEMAN, C. N. et TUROSS, N. (2002). Trace elements in recent and fossil bone apatite. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 48(1):489–521.
- TURNLUND, J. R. (1998). Human whole-body copper metabolism. *The American journal of clinical nutrition*, 67(5):960S–964S.
- TURNLUND, J. R., KING, J. C., KEYES, W. R., GONG, B. et MICHEL, M. C. (1984). A stable isotope study of zinc absorption in young men : effects of phytate and alpha-cellulose. *The American journal of clinical nutrition*, 40(5):1071–1077.
- TUROSS, N., BEHRENSMEYER, A. K. et EANES, E. (1989). Strontium increases and crystallinity changes in taphonomic and archaeological bone. *Journal of Archaeological Science*, 16(6):661–672.
- VALENCIA, M. E., MOYA, S. Y., MCNEILL, G., HAGGARTY, P. *et al.* (1994). Basal metabolic rate and body fatness of adult men in northern Mexico. *European journal of clinical nutrition*, 48(3):205.
- VALLEE, B. L. et FALCHUK, K. H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological reviews*, 73(1):79–118.
- van der PLOEG, G. E. et WITHERS, R. T. (2002). Predicting the resting metabolic rate of 30-60-year-old Australian males. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(8):701–708.
- van der WALT, T., STRELOW, F. et VERHEIJ, R. (1985). The influence of crosslinkage on the distribution coefficients and anion exchange behaviour of some elements in hydrochloric acid. *Solvent Extraction and Ion Exchange*, 3(5):723–740.
- VAN HEGHE, L., ENGSTRÖM, E., RODUSHKIN, I., CLOQUET, C. et VANHAECKE, F. (2012). Isotopic analysis of the metabolically relevant transition metals Cu, Fe and Zn in human blood from vegetarians and omnivores using multi-collector ICP-mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*.
- VAUGHAN, L., ZURLO, F. et RAVUSSIN, E. (1991). Aging and energy expenditure. *The American journal of clinical nutrition*, 53(4):821–825.
- VERCAUTEREN, M., SUSANNE, C. *et al.* (1986). Observations sur l'âge de la ménarche en Belgique. *Bulletins et Mémoires de la Société d'anthropologie de Paris*, 3(4):205–219.
- VIERS, J., OLIVA, P., NONELL, A., GÉLABERT, A., SONKE, J. E., FREYDIER, R., GAINVILLE, R. et DUPRÉ, B. (2007). Evidence of Zn isotopic fractionation in a soil–plant system of a pristine tropical watershed (Nsimi, cameroon). *Chemical geology*, 239(1):124–137.
- von BLANCKENBURG, F., von WIRÉN, N., GUELKE, M., WEISS, D. J. et BULLEN, T. D. (2009). Fractionation of metal stable isotopes by higher plants. *Elements*, 5(6):375–380.
- WALCZYK, T. et VON BLANCKENBURG, F. (2002). Natural iron isotope variations in human blood. *Science*, 295(5562):2065–2066.

-
- WALCZYK, T. et von BLANCKENBURG, F. (2005). Deciphering the iron isotope message of the human body. *International Journal of Mass Spectrometry*, 242(2-3):117–134.
 - WALKER, P. L., DEAN, G. et SHAPIRO, P. (1991). Estimating age from tooth wear in archaeological populations. *Advances in dental anthropology*. New York : Wiley-Liss. p, page 169–178.
 - WALRATH, D. E., TURNER, P. et BRUZEK, J. (2004). Reliability test of the visual assessment of cranial traits for sex determination. *American Journal of Physical Anthropology*, 125(2):132–137.
 - WEINSIER, R. L., SCHUTZ, Y. et BRACCO, D. (1992). Reexamination of the relationship of resting metabolic rate to fat-free mass and to the metabolically active components of fat-free mass in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55(4):790–794.
 - WEINSTEIN, C., MOYNIER, F., WANG, K., PANIELLO, R., FORIEL, J., CATALANO, J. et PICHAT, S. (2011). Isotopic fractionation of Cu in plants. *Chemical Geology*.
 - WEINTRAUB, L. R., CONRAD, M. E., CROSBY, W. H. et FOY, A. L. (1964). The significance of iron turnover in the control of iron absorption. *Blood*, 24(1):19–24.
 - WEISS, D. J., MASON, T. F., ZHAO, F. J., KIRK, G. J. D., COLES, B. J. et HORSTWOOD, M. S. A. (2005). Isotopic discrimination of zinc in higher plants. *New Phytologist*, 165(3):703–710.
 - WEISS, K. C. et LINDER, M. C. (1985). Copper transport in rats involving a new plasma protein. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 249(1):E77–E88.
 - WESSLING-RESNICK, M. (2000). Iron transport. *Annual Review of Nutrition*, 20(1): 129–151.
 - WESTENDORP, R. G. et KIRKWOOD, T. B. (1998). Human longevity at the cost of reproductive success. *Nature*, 396(6713):743–746.
 - WHINCUP, P. H., GILG, J. A., ODOKI, K., TAYLOR, S. J. C. et COOK, D. G. (2001). Age of menarche in contemporary British teenagers : survey of girls born between 1982 and 1986. *Bmj*, 322(7294):1095–1096.
 - WHITE, T. D. et FOLKENS, P. A. (2005). *The Human Bone Manual*. Academic Press.
 - WHITFIELD, J. B., TRELOAR, S., ZHU, G., POWELL, L. W. et MARTIN, N. G. (2003). Relative importance of female-specific and non-female-specific effects on variation in iron stores between women. *British Journal of Haematology*, 120(5):860–866.
 - WHITTAKER, D. K. et STACK, M. V. (1984). The lead, cadmium and zinc content of some romano-british teeth. *Archaeometry*, 26(1):37–42.
 - WIEDERHOLD, J. G., TEUTSCH, N., KRAEMER, S. M., HALLIDAY, A. N. et KRETZSCHMAR, R. (2007). Iron isotope fractionation in oxic soils by mineral weathering and podzolization. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(23):5821–5833.

BIBLIOGRAPHIE

- WILLCOX, A. W. (2002). Mummies and molecules : molecular biology meets paleopathology. *Clinical Microbiology Newsletter*, 24(8):57–60.
- WILLIAMS, G. C. (2001). Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Sci. Aging Knowl. Environ.*, 2001(1):cp13.
- WOLLENBERG, P., MAHLBERG, R. et RUMMEL, W. (1990). The valency state of absorbed iron appearing in the portal blood and ceruloplasmin substitution. *Biometals*, 3(1):1–7.
- WOODHEAD, J. C., DRULIS, J. M., NELSON, S. E., JANGHORBANI, M. et FOMON, S. J. (1991). Gender-related differences in iron absorption by preadolescent children. *Pediatric Research*, 29(5):435–439.
- WORWOOD, M. (1997). The laboratory assessment of iron status—an update. *Clinica chimica acta*, 259(1-2):3–23.
- WRIGHT, L. E. et SCHWARCZ, H. P. (1999). Correspondence between stable carbon, oxygen and nitrogen isotopes in human tooth enamel and dentine : infant diets at Kaminaljuyu. *Journal of Archaeological Science*, 26(9):1159–1170.
- WYSHAK, G. (1983). Secular changes in age at menarche in a sample of US women. *Annals of Human Biology*, 10(1):75–77.
- YOSHINAGA, J., SUZUKI, T. et MORITA, M. (1989). Sex- and age-related variation in elemental concentrations of contemporary japanese ribs. *Science of The Total Environment*, 79(3):209–221.
- YOSHINAGA, J., SUZUKI, T., MORITA, M. et HAYAKAWA, M. (1995a). Trace elements in ribs of elderly people and elemental variation in the presence of chronic diseases. *Science of The Total Environment*, 162(2–3):239–252.
- YOSHINAGA, J., SUZUKI, T., MORITA, M. et HAYAKAWA, M. (1995b). Trace elements in ribs of elderly people and elemental variation in the presence of chronic diseases. *The Science of the Total Environment*, 162(2):239–252.
- YOUNG, R. A. (1975). Some aspects of crystal structural modeling of biological apatites. *Physico-chemie et Cristallographie des Apatites d'Interet Biologique. Paris : CNRS Publication*.
- ZACHARIAS, L. et WURTMAN, R. J. (1969). Age at menarche. *New England Journal of Medicine*, 280(16):868–875.
- ZAICHICK, V., ZAICHICK, S., KARANDASHEV, V. et NOSENKO, S. (2009). The effect of age and gender on Al, B, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, P, S, Sr, V, and Zn contents in rib bone of healthy humans. *Biological Trace Element Research*, 129(1):107–115.
- ZHU, X. K., GUO, Y., WILLIAMS, R. J. P., O'NIONS, R. K., MATTHEWS, A., BELSHAW, N. S., CANTERS, G. W., DE WAAL, E. C., WESER, U., BURGESS, B. K. *et al.* (2002). Mass fractionation processes of transition metal isotopes. *Earth and Planetary Science Letters*, 200(1):47–62.

- ZHU, X. K., O'NIONS, R. K., GUO, Y., BELSHAW, N. S. et RICKARD, D. (2000a). Determination of natural cu-isotope variation by plasma-source mass spectrometry : implications for use as geochemical tracers. *Chemical Geology*, 163(1):139–149.
- ZHU, X. K., O'NIONS, R. K., GUO, Y. et REYNOLDS, B. C. (2000b). Secular variation of iron isotopes in North Atlantic deep water. *Science*, 287(5460).
- ZUBAKOV, D., LIU, F., van ZELM, M., VERMEULEN, J., OOSTRA, B., van DUIJN, C., DRIESSEN, G., van DONGEN, J., KAYSER, M. et LANGERAK, A. (2010). Estimating human age from T-cell DNA rearrangements. *Current Biology*, 20(22):R970–R971.
- ZWANZIGER, H. (1989). The multielemental analysis of bone. *Biological trace element research*, 19(3):195–232.