

**Cinétique de racémisation dans les protéines d'ossements  
pléistocènes du Sud de la France**  
**Kinetics of Racemization in Proteins from Pleistocene Bones of  
Southern France**  
**Kinetik der Razemisierung in den Proteinen von Gebeinen im  
Süden Frankreichs**

Bernard Saint-Martin, Abderrahmane El Fouikar et Mouhsin El Mansouri

Volume 50, numéro 2, 1996

URI : <https://id.erudit.org/iderudit/033088ar>

DOI : <https://doi.org/10.7202/033088ar>

[Aller au sommaire du numéro](#)

Éditeur(s)

Les Presses de l'Université de Montréal

ISSN

0705-7199 (imprimé)

1492-143X (numérique)

[Découvrir la revue](#)

Citer cet article

Saint-Martin, B., El Fouikar, A. & El Mansouri, M. (1996). Cinétique de racémisation dans les protéines d'ossements pléistocènes du Sud de la France. *Géographie physique et Quaternaire*, 50(2), 185–199.  
<https://doi.org/10.7202/033088ar>

Résumé de l'article

Nous avons suivi l'évolution des taux de racémisation de l'acide aspartique et de l'acide glutamique des protéines d'ossements fossiles. Ces ossements proviennent de huit sites préhistoriques du Sud de la France dont nous avons sélectionné douze niveaux stratigraphiques d'âges compris entre 20 000 ans et 1 million d'années. Dans un premier temps, nous avons mesuré les taux de racémisation sur l'ensemble des acides aminés contenus dans les ossements, sans sélection préalable. Les résultats obtenus par cette approche sont dispersés et inutilisables en géochronologie. Dans un second temps, nous avons réalisé une sélection des protéines fossiles basée sur leur taille (extraction par l'EDTA suivie d'une dialyse) ou sur leur solubilité (matériel insoluble dans un faible volume de HCl 1M). Les matériels protéiques issus de ces sélections présentent des taux de racémisation dont les évolutions se font en deux parties. Les taux de racémisation croissent rapidement dans un premier intervalle qui s'étend jusqu'à environ 50 000 ans. Dans une seconde phase, la racémisation progresse beaucoup plus lentement. Ce comportement cinétique s'apparente à celui observé à de nombreuses reprises dans des séries de fossiles carbonates. Nous avons testé l'ajustement d'une fonction bi-exponentielle à chacune des quatre séries de valeurs (Asp et Glu, extraits EDTA et HCl). Les ajustements sont satisfaisants pour l'acide aspartique, tandis que les valeurs de l'acide glutamique sont plus dispersées. Ce type de cinétique pourrait être provoqué par les contraintes stériques et électrostatiques subies par les acides aminés dans les protéines. Des courbes de même nature ont été décrites par plusieurs auteurs à partir de coquilles et de coraux. La confirmation de ces résultats sur un plus grand nombre de sites ouvrirait la voie à la datation absolue des ossements fossiles dans un très large intervalle de temps.

# CINÉTIQUE DE RACÉMISATION DANS LES PROTÉINES D'OSSEMENTS PLÉISTOCÈNES DU SUD DE LA FRANCE

Bernard SAINT-MARTIN, Abderrahmane EL FOUIKAR et Mouhsin EL MANSOURI, Laboratoire de Paléontologie humaine et de Préhistoire (UMR 9948 du CNRS), Faculté Saint Charles, Université de Provence, Place Victor Hugo, 13331 Marseille Cedex 3, France.

**RÉSUMÉ** Nous avons suivi l'évolution des taux de racémisation de l'acide aspartique et de l'acide glutamique des protéines d'ossements fossiles. Ces ossements proviennent de huit sites préhistoriques du Sud de la France dont nous avons sélectionné douze niveaux stratigraphiques d'âges compris entre 20 000 ans et 1 million d'années. Dans un premier temps, nous avons mesuré les taux de racémisation sur l'ensemble des acides aminés contenus dans les ossements, sans sélection préalable. Les résultats obtenus par cette approche sont dispersés et inutilisables en géochronologie. Dans un second temps, nous avons réalisé une sélection des protéines fossiles basée sur leur taille (extraction par l'EDTA suivie d'une dialyse) ou sur leur solubilité (matériel insoluble dans un faible volume de HCl 1M). Les matériels protéiques issus de ces sélections présentent des taux de racémisation dont les évolutions se font en deux parties. Les taux de racémisation croissent rapidement dans un premier intervalle qui s'étend jusqu'à environ 50 000 ans. Dans une seconde phase, la racémisation progresse beaucoup plus lentement. Ce comportement cinétique s'apparente à celui observé à de nombreuses reprises dans des séries de fossiles carbonatés. Nous avons testé l'ajustement d'une fonction bi-exponentielle à chacune des quatre séries de valeurs (Asp et Glu, extraits EDTA et HCl). Les ajustements sont satisfaisants pour l'acide aspartique, tandis que les valeurs de l'acide glutamique sont plus dispersées. Ce type de cinétique pourrait être provoqué par les contraintes stériques et électrostatiques subies par les acides aminés dans les protéines. Des courbes de même nature ont été décrites par plusieurs auteurs à partir de coquilles et de coraux. La confirmation de ces résultats sur un plus grand nombre de sites ouvrirait la voie à la datation absolue des ossements fossiles dans un très large intervalle de temps.

**Abstract** *Kinetics of racemization in proteins from pleistocene bones of southern France.* The racemization ratios of aspartic and glutamic acids in fossil bone proteins were studied. The bones originated from eight prehistoric sites of southern France from which twelve stratigraphic levels were selected. Their ages are included between 20,000 to 1,000,000 years. Firstly, the racemization ratios were determined in total extract (whole of amino acids present in bone obtained by 6 M HCl hydrolysis of the bone powder). The results of such an approach are scattered and they are of no use to geochronology. Next, fossil proteins were selected according to their molecular weights by extraction with 0.5 M EDTA and 10,000 Dalton dialysis or according to their solubilities by dissolution in 1 M HCl, 8 ml.g<sup>-1</sup> and centrifugation. The racemization ratios determined on both dialysed extract and HCl insoluble part exhibit evolutions in two parts. Each of the two parts corresponds to a "pseudo first-order" kinetics, but in the first period (until ca. 50,000 years) racemization ratios increase rapidly, while in the second one (ca. 100,000 - 1 My) the apparent rate constants are lower. Such a behaviour was previously described in various series of carbonated fossils (shells, corals...). We tested the fit of a sum of two exponential functions to the four series of values (Asp and Glu, EDTA + dialysis or HCl insoluble). The fits are good for aspartic acid, while the results for glutamic acid are more scattered. The bi-exponential kinetics could be caused by steric and electrostatic interactions between amino acids inside proteins. The corroboration of this result on a large number of sites should allow the absolute dating of fossil bones within a wide time interval.

**ZUSAMMENFASSUNG** *Kinetik der Racemisierung in den Proteinen von Gebeinen im Süden Frankreichs.* Wir haben die Entwicklung der Racemisierungsrate von Asparaginsäure und Glutaminsäure der Proteine fossiler Gebeine untersucht. Diese Gebeine stammen von acht prähistorischen Fundstellen, von denen wir zwölf stratigraphische Niveaus von einem Alter zwischen 20 000 Jahren und einer Million Jahren ausgewählt haben. Zuerst haben wir die Racemisierungsrate aller in den Gebeinen enthaltenen Aminosäuren gemessen, ohne vorherige Auswahl. Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse sind zerstreut und in der Geochronologie nicht verwendbar. In einem zweiten Schritt haben wir eine Auswahl der fossilen Gebeine getroffen, indem wir uns auf ihre Grösse oder ihre Löslichkeit stützten. Das Proteinmaterial, das wir bei dieser Auswahl gewannen, zeigt eine Racemisierungsrate, deren Entwicklung sich in zwei Teilen vollzieht. Die Racemisierungsraten nehmen in einem ersten Intervall, das sich bis etwa 50 000 Jahre erstreckt, rasch zu. In einer zweiten Phase geht die Racemisierung sehr viel langsamer voran. Dieses kinetische Verhalten ähnelt dem, das man immer wieder in Serien karbonisierter Fossile beobachtet. Wir haben die Anpassung einer Bi-Exponential-Funktion an jede der vier Serien von Werten getestet. Die Anpassungen sind, was die Asparaginsäure betrifft, zufriedenstellend, wohingegen die Werte der Glutaminsäure mehr zerstreut sind. Im Zuge einer Überlegung zu den durch die Racemisierung der Aminosäuren in den Proteinen erlittenen Belastungen hatte man die Existenz einer Bi-Exponential-Kinetik vorgeschlagen. Es scheint, dass die Aminosäuren der Knochen-Proteine sich nach demselben Kinetik-Typus richten. Sollte sich dieses Ergebnis an einer grösseren Zahl von Fundstellen bestätigen so wäre der Weg zu einer absoluten Datierung der fossilen Gebeine für einen sehr grossen Zeitraum geöffnet.

## INTRODUCTION

Dans les fossiles carbonatés (coquilles, coraux), la progression des taux de racémisation présente le plus souvent deux étapes : la première est à la fois de courte durée et rapide, alors que dans la seconde la racémisation progresse plus lentement et d'une manière régulière sans limitation apparente de durée. L'existence de ce comportement cinétique pose plusieurs problèmes d'interprétation (quelle est l'origine de ce changement de vitesse de racémisation ?) et d'utilisation (comment caractériser ces cinétiques et les utiliser à des fins de datations ?).

Dans un précédent article (Saint-Martin *et al.*, 1994), nous avons déjà envisagé ces problèmes, liés à la cinétique de racémisation des acides aminés (RAA) dans les fossiles carbonatés. Nous avons en particulier montré que les résultats provenant de nombreuses séries d'échantillons peuvent être ajustés par une relation bi-exponentielle (*cf. infra*, rel. [6]). L'existence d'une telle relation avait été envisagée au cours d'une réflexion sur la nature de la cinétique de racémisation d'un acide aminé inclus dans un enchaînement peptidique (Saint-Martin et Julg, 1991). Au départ, l'hypothèse était que la racémisation d'un acide aminé présent dans une protéine est influencée par l'état (L ou D) de ses voisins et par la structure générale de la protéine. En effet, des acides aminés proches les uns des autres sont liés par un ensemble d'interactions stériques et électrostatiques qui modifient la stabilité relative des formes D et L. Un doute persiste sur l'origine des cinétiques bi-exponentielles effectivement observées, puisqu'un « modèle dégradatif » conduirait à la même relation phénoménologique. Cette incertitude sera probablement levée par l'étude de nouvelles séries fossiles et n'exclut en rien l'utilisation pratique des cinétiques bi-exponentielles.

Maintenant, il nous semble important de considérer le cas des ossements fossiles en raison des implications qu'aurait la mise au point d'une méthode de datation absolue par la RAA à partir de ce type de support. La réalisation de plusieurs études portant chacune sur un ensemble d'échantillons provenant d'un même gisement a démontré que les taux de racémisation mesurés sur les protéines de haut poids moléculaire sont fortement corrélés avec les âges absolus ou avec les positions stratigraphiques des ossements (El Fouikar *et al.*, 1995 ; El Mansouri *et al.*, sous presse). D'après ces travaux la sélection des protéines les moins dégradées permet de s'affranchir en grande partie des multiples facteurs susceptibles de perturber la racémisation et simplifie le système dont on doit comprendre l'évolution.

L'étape qu'il reste à franchir est importante puisqu'il s'agit de passer du local au général et de savoir si la racémisation a un comportement déterministe non plus à l'intérieur d'un gisement mais d'un ensemble de gisements qui couvre une plus grande diversité de périodes et de conditions environnementales. Nous apportons des éléments indiquant que la RAA peut être utilisée comme technique de datation absolue des ossements fossiles dans de nombreux gisements préhistoriques d'une zone géographique relativement étendue (le Sud de la France) et sur une période couvrant le dernier million d'années. Les limitations actuelles de la méthode

tiennent essentiellement aux moyens techniques mis à sa disposition.

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

### 1. ORIGINE DES ÉCHANTILLONS

Cette étude porte sur douze niveaux stratigraphiques provenant de huit sites préhistoriques dont les âges absolus s'étendent de *ca* 20 000 ans BP à 1 million d'années. Ces gisements sont situés dans la moitié sud de la France (fig. 1). Plusieurs de ces sites ont fait l'objet d'études complètes incluant un nombre important d'ossements, mais qui avaient été traités selon des modalités différentes. Dans ces cas, nous avons repris l'étude sur un nombre plus restreint d'échantillons auxquels ont été appliqués les protocoles analytiques de l'ensemble de la série.

L'abri Pataud (les Eyzies de Tayac, Dordogne)

Il s'agit du plus jeune et du plus septentrional des sites étudiés. La majorité des couches de ce gisement a été datée par le  $^{14}\text{C}$ , par comptage (Vogel et Waterbolk, 1967 ; Movius, 1977) et par accélérateur (Bricker et Mellars, 1987). Des ossements provenant de l'ensemble des niveaux stratigraphiques de l'abri Pataud ont fait l'objet d'une étude qui a montré que la racémisation présente une bonne corrélation avec les âges au  $^{14}\text{C}$  dans ce site (El Mansouri, 1995 ; El Mansouri *et al.*, sous presse). Nous ne prendrons comme point de référence qu'un seul niveau supérieur (niveau 3 : 23 440 ans BP - moyenne de trois dates, GrN 1864 ayant été écartée) et un seul niveau inférieur (niveau 14 : 33 625 ans BP - moyenne de trois dates).

La Roquette 2 (Conqueyrac, Gard)

Ce site avait fait l'objet de mesures de taux de racémisation selon la méthode conventionnelle (mesure sur l'ensemble des acides aminés présents dans l'ossement), mais cette approche n'avait permis d'aboutir à aucun résultat cohérent (Ball *et al.*, 1987). Ce site a été daté par la thermoluminescence à partir de six silex brûlés : l'âge moyen obtenu est  $57\,200 \pm 4300$  ans (Valladas *et al.*, 1987). Les échantillons étudiés, au nombre de sept, proviennent des couches 2 et 3.

L'abri des Canalettes (Nant, Aveyron)

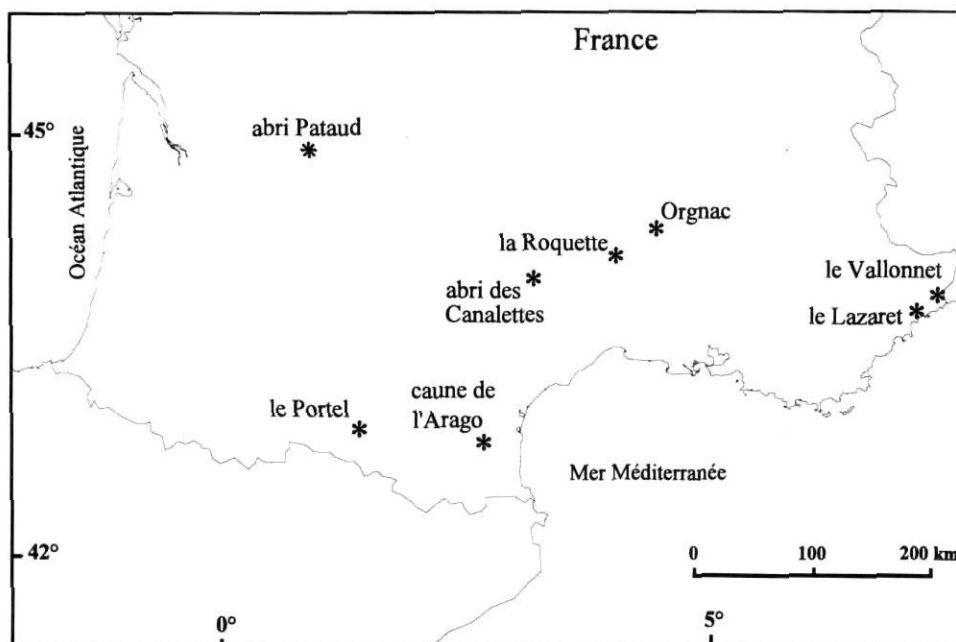
Huit ossements de ce site ont été étudiés. Cet abri avait fait partie de la même étude que la Roquette (Ball *et al.*, 1987). L'âge obtenu par thermoluminescence sur ce site est de  $70\,000 \pm 7700$  ans (Valladas *et al.*, 1987).

Le Portel (Loubens, Ariège)

Il s'agit de la grotte ouest de ce site dont des ossements qui proviennent de l'ensemble du remplissage ont été étudiés (El Fouikar et Gardeisen, 1994 ; El Fouikar, 1995). Nous ne disposons que de peu de datations absolues pour ce site ; seul un plancher stalagmitique de la base du premier ensemble moustérien a été daté par U-Th à  $150\,000 \pm 9000$  ans (Ajaja, 1994). Le sommet du remplissage du Portel contient des éléments du Paléolithique supérieur et différents indices conduisent à faire correspondre l'ensemble supérieur (B) à

FIGURE 1. Répartition géographique des sites étudiés.

Geographic localization of the sites studied.



un interstade würmien (Gardeisen, 1994). Nous considérons ici les niveaux B et L (respectivement sommet et base du remplissage) auxquels nous associerons les intervalles d'âges 30 000 - 40 000 ans et 130 000 - 150 000 ans.

#### Le Lazaret (Nice, Alpes-Maritimes)

Cette grotte a fait l'objet d'une étude complète pour la RAA (El Fouikar, 1995 ; El Fouikar *et al.*, 1995). Le remplissage continental de la grotte repose sur une plage marine datée par ESR à  $225\,000 \pm 38\,000$  ans et par U-Th à  $238\,000 \pm 20\,000$  (Bahain, 1993). Le remplissage est recouvert dans sa partie postérieure d'un plancher stalagmitique qui se serait déposé entre - 125 000 ans et - 70 000 ans (âges U-Th, Falguères *et al.*, 1992). Des datations U-Th et ESR ont aussi été réalisées à partir de mandibules de cerfs (os, dentine et émail). Selon cette dernière étude l'âge des niveaux archéologiques les plus récents pourrait être estimés à 115 000, et l'âge des échantillons les plus anciens étudiés par cette méthode serait d'environ 170 000 ans (Michel, 1995). Nous retiendrons de ce gisement trois niveaux : le sommet, le milieu (en réalité base de l'ensemble CIII) et la base (partie inférieure de l'ensemble CII), ne correspondant pas exactement aux niveaux datés par ESR.

#### Orgnac 3 (Orgnac, Ardèche)

Ce site est situé dans une cavité creusée dans un bloc calcaire et dont le plafond s'est effondré. Il n'a été étudié qu'au travers de deux ossements provenant du niveau archéologique 6 (Combiér, 1967 ; Moncel et Combiér, 1992). Nos échantillons étaient situés juste au-dessus de planchers stalagmitiques dont l'âge moyen selon la méthode U-Th, utilisée à sa limite, est  $339\,000$  ans (Shen, 1985). Le même niveau a fourni la date de  $309\,000 \pm 34\,000$  ans par ESR (Falguères, 1986 ; Falguères *et al.*, 1988a). Plus haut dans le remplissage, des cendres volcaniques ont été attribuées à

une éruption du Sancy (Massif central) datée à 300 000 ans (Debard et Pastre, 1988 ; Khatib, 1989) et une étude des traces de fission sur les zircons a donné  $298\,000 \pm 55\,000$  ans. Nous considérerons que nos échantillons appartiennent à l'intervalle d'âges 310 000 - 350 000 ans.

#### La caune de l'Arago (Tautavel, Pyrénées-Orientales)

Cette grotte a servi de modèle à l'étude des influences géochimiques sur la RAA en raison de la diversité des conditions physico-chimiques observées dans son remplissage (Saint-Martin, 1991 a et b). Une série de 100 ossements provenant d'un même plan vertical avait alors été étudiée. Seuls deux échantillons provenant du sol G ont été inclus dans la présente étude. Un âge de 450 000 ans a été attribué à ce niveau stratigraphique (Rutter *et al.*, 1981 ; Schwarcz et Blackwell, 1981 ; Yokoyama *et al.*, 1983 ; de Lumley *et al.*, 1984 ; Falguères *et al.*, 1988b) ; nous utiliserons cet âge moyen en l'encadrant de l'intervalle 400 000 - 500 000 ans.

#### Le Vallonnet (Roquebrune Cap-Martin, Alpes-Maritimes)

Ce gisement a été étudié au travers d'une quinzaine d'ossements fossiles dont onze pour l'extraction par l'EDTA et cinq pour l'extraction par HCl (*cf. infra*). La position chronologique du remplissage continental de la grotte est bien établie (Yokoyama *et al.*, 1983 ; de Lumley, 1988). L'étude de la faune indique une phase de transition entre le Villafranchien et le post-Villafranchien (Moullé, 1992) ; les datations radiométriques indiquent un intervalle qui va de 0,9 Ma (stalagmite supérieure) à 1,37 Ma (stalagmite inférieure) ; enfin les indications paléomagnétiques conduisent à préciser cet intervalle puisqu'elles attribuent le remplissage à l'épisode de Jaramillo (0,91 - 0,98 Ma). Nous considérerons que nos échantillons ont un âge proche de 950 000 ans (intervalle 0,9 - 1 Ma).



## 2. ASPECTS TECHNIQUES

Les méthodes appliquées à la mesure des taux de racémisation ont été, pour l'essentiel, déjà décrites. Nous en rappellerons les principes et quelques points importants en raison de la grande sensibilité des résultats numériques aux étapes expérimentales.

### • Choix et préparation des échantillons

Ils ont été choisis dans des esquilles ne présentant pas d'intérêt paléontologique mais qui étaient formées d'os compact, si possible non fissuré. Les ossements ont été nettoyés de leurs sédiments par raclage et lavage à l'eau distillée. La masse d'os compact nécessaire à une étude complète est variable, mais le plus souvent limitée à cinq grammes. Les ossements ont été réduits en poudre manuellement.

### • Récupération de l'ensemble des acides aminés présents dans l'ossement

C'est l'approche la plus anciennement utilisée. Elle consiste en une dissolution de la poudre d'os dans HCl 6 M en excès qui sert aussi à l'hydrolyse des protéines (110°C durant 24 heures). Après élimination de la phase minérale (traitement par HF, chromatographie d'échange d'ions sur résine DOWEX et lyophilisation) les acides aminés obtenus constituent ce que nous appelons « extrait total ». Cet extrait correspond à l'ensemble des acides aminés actuellement présents dans l'os fossile qu'ils soient sous la forme de grandes protéines peu ou pas dégradées, d'enchaînements peptidiques plus courts ayant déjà subi des attaques, ou encore de très courts peptides et d'acides aminés libres.

### • Purification des protéines de haut poids moléculaire

Trois étapes, dont les modalités peuvent varier, sont dans ce cas nécessaires : 1) dissolution de la phase minérale (EDTA, HCl,...) ; 2) purification des protéines (dialyse, chromatographie,...) ; 3) hydrolyse des protéines sélectionnées. Nous avons principalement utilisé deux approches :

— Une dissolution par l'EDTA suivie d'une dialyse. La poudre d'os a été traitée par une solution d'EDTA 0,5 M (environ 50 ml par gramme, durant 18 heures sous agitation et à température ambiante). Après centrifugation, la fraction non dissoute a été écartée alors que le surnageant a été transféré dans le tube d'un dispositif qui réalise simultanément une dialyse (éliminant les molécules de poids moléculaires inférieurs à 10 000 Dalton) et une concentration (Micro ProDiCon, Spectrum). Après concentration, la solution protéique (ca 500 µl) a été lyophilisée puis hydrolysée dans HCl 1 M (à 110°C durant 24 heures). Cette fraction constitue « l'extrait EDTA dialysé ». Dans ces conditions de déminéralisation, seule une faible partie du collagène doit passer en solution. Par contre, ces conditions d'attaque mobilisent largement les protéines non collagéniques et les fragments de collagène. La dialyse à 10 kD élimine d'un autre côté les enchaînements peptidiques de taille inférieure à ce seuil. Pour des protéines globulaires, la limite de 10 kD correspondrait à des enchaînements d'environ 100 acides aminés. Cette approche expérimentale a pour but d'exclure des mesures à la fois les molécules de très grande taille (collagène insoluble) et les

molécules relativement petites, mais sans que l'on puisse définir très nettement les limites de cette sélection.

— Une dissolution par HCl 1 M. La poudre d'os a été traitée par HCl 1 M (environ 0,25 g de poudre dans 2 ml d'acide, durant 18 heures sous agitation et à température ambiante). À la suite de cette attaque, la solution a été centrifugée et la phase liquide (surnageant) a été séparée du culot insoluble. La partie insoluble a été rincée avec de l'eau distillée. Les deux fractions sont désignées par « HCl soluble » et « HCl insoluble ». Après lyophilisation, ces fractions ont été hydrolysées par HCl 6 M (à 110°C durant 24 heures). Les conditions de solubilisation correspondent à un traitement par une solution moyennement acide ayant un pH compris entre 2 et 2,5 après dissolution de la phase minérale osseuse. Nous avons constaté qu'une attaque par HCl 1 M en excès (25 ml par gramme) aboutit à une fraction acido-insoluble de faible quantité et dont les taux de racémisation sont très faibles. Le collagène fossile ayant subi des modifications dont la racémisation de certains de ses résidus est probablement plus soluble que la molécule à l'état natif. La fraction HCl soluble doit contenir les protéines non collagéniques et leurs fragments, ainsi que des fragments de dégradation du collagène, de très courts peptides et des acides aminés libres. C'est une fraction très hétérogène dans la nature de ses protéines, comme dans leurs tailles. Dans nos conditions de traitement, la fraction HCl insoluble doit être relativement homogène et contenir essentiellement du collagène acido-insoluble.

### • Mesure des taux de racémisation

Les acides aminés issus des différents modes d'extraction ont été séparés et les taux de racémisation simultanément mesurés par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP). Nous avons utilisé la technique de dérivation pré-colonne par l'orthodihydroxyphthalique (OPA) et la N acétyl-L-cystéine (NaC) qui donne un dérivé fluorescent (Aswad, 1984 ; Saint-Martin, 1992). En l'état actuel de la technique il est possible de mesurer simultanément les taux de racémisation de l'acide aspartique, l'acide glutamique, la sérine, l'arginine et l'alanine. Les conditions expérimentales ont été identiques à celles déjà décrites (Saint-Martin, 1992 ; El Fouikar *et al.*, 1995) à l'exception de la température du système chromatographique qui a été maintenue constante à +6°C.

Les valeurs brutes introduites au départ dans les calculs ont été les rapports des surfaces des pics correspondant aux formes D et L des acides aminés. À ces rapports a été appliqué un facteur de correction, propre à chaque acide aminé, qui tient compte d'une inégalité de réponse du système chromatographique entre les formes D et L. Les valeurs de ces facteurs ont été vérifiées régulièrement par utilisation d'un mélange racémique (autour de 1,15 pour Asp et de 1,03 pour Glu).

## 3. CONVENTIONS D'ÉCRITURES ET DE CALCULS

Différentes expressions ont été utilisées pour caractériser l'état d'avancement de la réaction de racémisation. En géochronologie, la grandeur la plus couramment employée est le taux de racémisation,

$$\tau = \frac{D}{L} \quad [1]$$

alors que d'autres auteurs expriment les résultats sous forme de pourcentages :

$$P = \frac{D}{L + D} \quad [2]$$

Nous avons introduit plus récemment la notation

$$\bar{\tau} = L - D \quad [3]$$

dans l'écriture de la relation cinétique bi-exponentielle (rel. [6]). Cette expression correspond en fait à l'excès énantiomérique, habituellement utilisé par les chimistes :

$$ee = \eta = \frac{L - D}{L + D} \quad [4]$$

Dans ces relations, L et D représentent pour un acide aminé donné la fraction de chacune des deux formes ( $L + D = 1$ ). Si chacun de ces indices présente un intervalle et un sens de variation particulier, il est néanmoins facile de passer de l'un à l'autre. Afin de nous rapprocher des conventions généralement appliquées en chimie, nous proposons l'utilisation de l'excès énantiomérique ( $ee$  ou  $\eta$ ) comme mesure de l'état d'avancement de la réaction de racémisation en géochronologie.

Dans la pratique, il est nécessaire de tenir compte de la racémisation induite par l'analyse (essentiellement l'hydrolyse) par l'intermédiaire d'un terme supposé constant. Cette valeur, parfois désignée par C, sera ici symbolisée par  $R_i$  pour « valeur de correction de la racémisation induite ». La racémisation induite dépend de l'acide aminé et des conditions expérimentales précises (tabl. I) ; nous utiliserons des valeurs de  $R_i$  que nous avons précédemment calculées (El Fouikar et Saint-Martin, à paraître). Il faut remarquer qu'une erreur dans la détermination de cette constante ne change pas la signification des résultats, mais a pour effet de décaler légèrement l'ensemble des valeurs. Ce point pourrait néanmoins se révéler gênant puisqu'il faudra calculer des courbes dont on suppose qu'elles passent par le point (0,0).

Seules seront présentées les valeurs numériques de  $-\ln \eta$ , directement utilisables dans les relations cinétiques et éventuellement dans des calculs d'âges :

$$-\ln \eta = \ln \frac{1 + \frac{D}{L}}{1 - \frac{D}{L}} - R_i \quad [5]$$

Cette valeur représente une expression, linéarisée et corrigée, de la variation de l'excès énantiomérique. Elle est équivalente à l'expression souvent utilisée en amino-chronologie (par exemple Williams et Smith, 1977). La valeur de  $-\ln \eta$  évolue linéairement avec le temps dans le cas d'une réaction chimique équilibrée d'ordre 1. Dans le cadre d'une cinétique bi-exponentielle, la représentation graphique de  $-\ln \eta = f(t)$  doit présenter deux portions de droites de pentes différentes, séparées par une partie incurvée.

TABLEAU I

Valeurs de correction de la racémisation induite ( $R_i$ ) en fonction de l'acide aminé et des conditions expérimentales

|                | Asp   | Glu   |
|----------------|-------|-------|
| Extrait total  | 0,140 | 0,084 |
| EDTA + Dialyse | 0,130 | 0,056 |
| HCl insoluble  | 0,144 | 0,050 |
| HCl soluble    | 0,140 | 0,100 |

#### 4. INCERTITUDE SUR LES VALEURS CALCULÉES

L'incertitude qui affecte la valeur de  $-\ln \eta$  a été rarement discutée. Elle a deux origines : d'une part la variabilité naturelle des taux de racémisation entre plusieurs échantillons issus d'un même niveau stratigraphique et d'autre part l'erreur due à la technique de mesure. La première de ces deux incertitudes est variable et peut être estimée par l'étude de plusieurs ossements de même origine. La seconde est faible et ne dépasse pas 2 %.

La fiabilité des résultats numériques présentés ici dépend du site considéré. L'abri Pataud, le Portel et le Lazaret ont déjà fait l'objet d'études complètes. Une seule valeur par niveau stratigraphique est présentée pour ces sites, mais des ossements de niveaux immédiatement supérieurs ou inférieurs ont donné des résultats cohérents avec celui que nous utilisons (El Mansouri, 1995 ; El Fouikar, 1995). Nous proposons cependant des estimations de l'écart type qui varient de  $\pm 10$  à  $\pm 15$  % de la valeur moyenne de  $-\ln \eta$ , ce qui correspond à une erreur de quelques pour cent sur les rapports  $D/L$  effectivement mesurés. Pour les autres sites, nous donnons la valeur moyenne et l'écart type pour chacune des quatre valeurs ou les valeurs individuelles pour les gisements dont seuls deux ossements ont été étudiés.

### RÉSULTATS : ÉVOLUTION DE LA RACÉMISATION DANS LES DIFFÉRENTES FRACTIONS

Le tableau II résume l'essentiel des informations concernant les sites étudiés et les résultats des mesures de racémisation ( $-\ln \eta$ ) pour les différents modes d'extraction.

#### 1. EXTRAIT TOTAL

Les résultats obtenus à partir de l'extrait total (fig. 2) se caractérisent à la fois par une tendance générale — l'augmentation globale des taux de racémisation avec l'âge — et par une dispersion des points. Pour l'acide aspartique, nous pouvons grossièrement distinguer trois groupes d'échantillons : les cinq plus jeunes niveaux présentent les valeurs les plus basses (entre 0,15 et 0,35), le milieu du Lazaret et Ornac sont entre 0,65 et 0,7 tandis que les quatre autres points correspondent à des valeurs fortes (entre 1,1 et 1,5). L'acide glutamique présente des valeurs moins dispersées, à l'exception de la base du remplissage du Lazaret dont la valeur est particulièrement élevée. Nous n'avons présenté ici que les résultats des ossements soumis aux autres modes d'extraction (EDTA ou HCl). Nous disposons des valeurs

TABLEAU II

*Caractéristiques des niveaux stratigraphiques et résultats obtenus  
en fonction du protocole d'analyse (valeurs de racémisation données en -Ln  $\eta$ )*

| Niveau stratigraphique | Ab.      | Culture        | T° moy | Âge                  | Méth.           | Nb.         | Extrait total |       | EDTA + Dialyse  |                  | HCl soluble |       | HCl insoluble   |                 |
|------------------------|----------|----------------|--------|----------------------|-----------------|-------------|---------------|-------|-----------------|------------------|-------------|-------|-----------------|-----------------|
|                        |          |                |        |                      |                 |             | Asp           | Glu   | Asp             | Glu              | Asp         | Glu   | Asp             | Glu             |
| Pataud niveau 3        | Pat n 3  | Périg.         | 11,5   | 23 440<br>± 950      | 14 <sub>C</sub> | 1<br>(a)    | 0,152         | 0,010 | 0,054<br>±0,008 | 0,008<br>±0,001  | 0,452       | 0,004 | 0,122<br>±0,018 | 0,030<br>±0,005 |
| Pataud niveau 14       | Pat n 14 | Aurig.         | 11,5   | 33 625<br>± 540      | 14 <sub>C</sub> | 1<br>(a)    | 0,222         | 0,010 | 0,096<br>±0,015 | 0,040<br>±0,06   | 0,520       | 0,018 | 0,190<br>±0,03  | 0,012<br>±0,002 |
| La Roquette            | Roq      | Moust.<br>Ch Q | 12,5   | 57 200<br>± 4300     | TL              | 7           | 0,168         | 0,092 | 0,13<br>±0,016  | 0,087<br>±0,016  | 0,351       | 0,056 | 0,237<br>±0,037 | 0,059<br>±0,012 |
| Les Canalettes         | Can      | Moust.<br>typ  | 10     | 73 500<br>± 6000     | TL              | 8           | 0,196         | 0,121 | 0,137<br>±0,007 | 0,114<br>± 0,019 | 0,492       | 0,026 | 0,264<br>±0,038 | 0,085<br>±0,015 |
| Le Portel couche B     | LPo B    | P. sup         | 11     | 30 000<br>40 000     | Cont.           | 1<br>(a)    | 0,230         | 0,052 | 0,077<br>±0,012 | 0,034<br>±0,005  | 0,353       | 0,120 | 0,140<br>±0,02  | 0,100<br>±0,015 |
| Le Portel couche L     | LPo L    | Moust.<br>Ch   | 11     | 130 000<br>140 000   | U-Th<br>ESR     | 1<br>(a)    | 1,100         | 0,265 | 0,183<br>±0,030 | 0,135<br>±0,02   | 1,240       | 0,431 | 0,304<br>±0,03  | 0,211<br>±0,015 |
| Le Lazaret sommet      | Laz S    | Ach. sup       | 15     | 100 000<br>120 000   | ESR             | 1<br>(a)    | 0,320         | 0,143 | 0,120<br>±0,015 | 0,090<br>±0,015  | 0,727       | 0,253 | 0,230<br>±0,03  | 0,120<br>±0,015 |
| Le Lazaret milieu      | Laz M    | Ach. sup       | 15     | 130 000<br>150 000   | ESR<br>U-Th     | 1<br>(a)    | 0,669         | 0,301 | 0,210<br>±0,02  | 0,160<br>±0,015  | 0,885       | 0,346 | 0,310<br>± 0,02 | 0,180<br>±0,015 |
| Le Lazaret base        | Laz B    | Ach. sup       | 15     | 180 000<br>200 000   | ESR<br>U-Th     | 1<br>(a)    | 1,240         | 0,670 | 0,290<br>±0,025 | 0,210<br>±0,02   | 1,020       | 0,674 | 0,450<br>±0,03  | 0,270<br>±0,025 |
| Orgnac                 | Org      | Ach.           | 12,5   | 310 000<br>350 000   | U-Th            | 2           | 0,694         | 0,347 | 0,363<br>0,266  | 0,226<br>0,205   | 0,914       | 0,369 | 0,447<br>0,524  | 0,175<br>0,163  |
| Caune de l'Arago       | Ara      | Ach. A.        | 14,5   | 400 000<br>500 000   | ESR             | 2           | 1,170         | 0,384 | 0,449<br>0,326  | 0,217<br>0,246   | 0,970       | 0,214 | 0,649<br>0,622  | 0,185<br>0,193  |
| Le Vallonnet           | Val      | I.A.G.         | 15,5   | 900 000<br>1 000 000 | ESR<br>PM       | 11/5<br>(b) | 1,550         | 0,693 | 0,772<br>±0,074 | 0,256<br>±0,026  | 2,150       | 0,058 | 1,180<br>±0,096 | 0,498<br>±0,04  |

Liste des niveaux stratigraphiques étudiés, caractéristiques et racémisations mesurées sur les différents extraits.

Ab. : Abréviation du site ou du niveau.

Culture : Culture reconnue dans le niveau (Périg. = Périgordien ; Aurig. = Aurignacien ; Moust. Ch. Q. = Moustérien Charentien de type Quina ; Moust. typ. = Moustérien typique ; P. sup. = début du Paléolithique supérieur ; Moust. Ch. = Moustérien Charentien ; Ach. sup. = Acheuléen supérieur évoluant vers le Moustérien ; Ach. A. = Acheuléen ancien ; IAG = industrie archaïque sur galet).

T° moy. : Température moyenne annuelle relevée par la station météorologique la plus proche du gisement (généralement au cours des trente dernières années).

Âge : Âge estimé ou intervalle d'âges attribué au niveau stratigraphique.

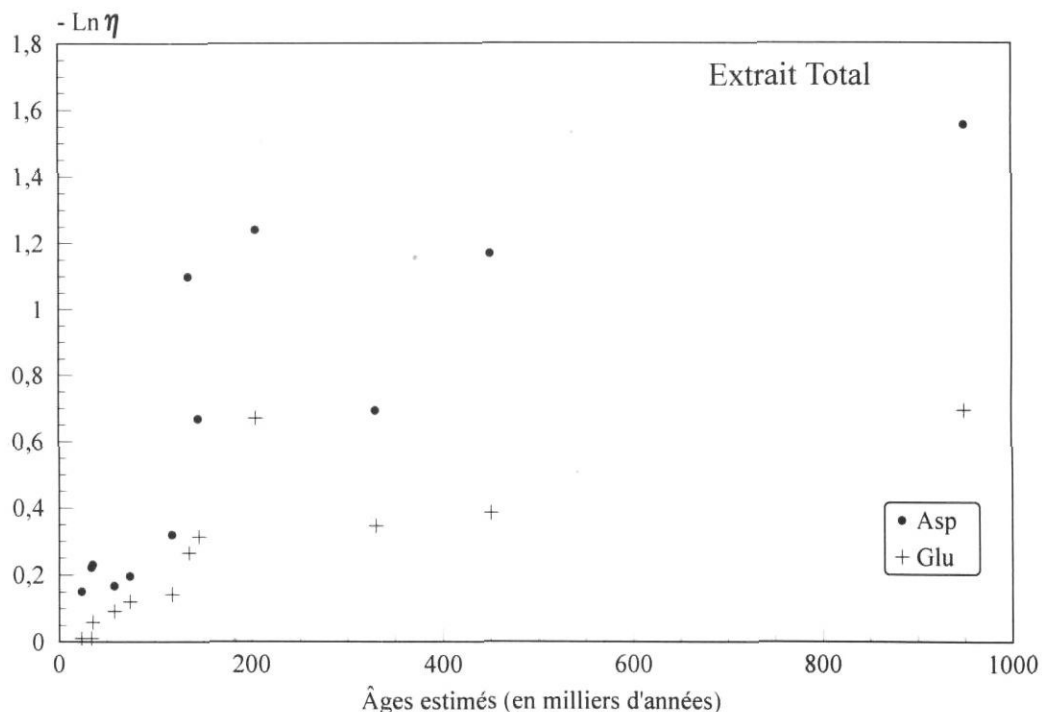
Méth. : Méthode utilisée pour l'estimation des âges (Cont. = contexte archéologique et paléontologique, PM = paléomagnétisme).

Nb. : Nombre d'ossements inclus dans l'étude. (a) Plusieurs ossements provenant de différents niveaux stratigraphiques ont été étudiés. Les valeurs présentées sont en accord avec l'ensemble des résultats obtenus pour le site. (b) Moyennes réalisées sur 15 ossements pour l'extrait total, 11 pour l'EDTA et dialyse et 5 pour l'extraction par HCl.

Les valeurs de racémisation sont exprimées en -Ln  $\eta$  (cf. relation [5] et tabl. I).

FIGURE 2. Extrait total : Racémisations (exprimées en  $-\text{Ln } \eta$ ) de l'acide aspartique (•) et de l'acide glutamique (+) en fonction des âges moyens estimés pour chaque niveau.

*Total extract: racemizations (expressed as  $-\text{Ln } \eta$ ) for aspartic acid (•) and glutamic acid (+) vs. the estimated mean ages for each level.*



concernant l'extrait total de près de 400 ossements fossiles issus des mêmes gisements. L'étude de ces données peut apporter quelques informations complémentaires, notamment sur l'influence du milieu sédimentaire, mais elles ne permettent pas d'améliorer le lien racémisation-âge.

En définitive, les résultats sur l'extrait total sont en accord avec ce que nous pouvions attendre de cette approche et de ce qui a été décrit comme un comportement fortement influencé par les conditions de gisement.

## 2. EXTRAIT EDTA DIALYSÉ

Les données obtenues par ce protocole s'organisent clairement selon des courbes que nous nous efforcerons de caractériser par la suite (fig. 3). Les taux de racémisation croissent rapidement jusqu'à 50 000 ans puis, de 100 000 ans jusqu'à 1 million d'années, ils progressent à un rythme plus lent. Pour les deux acides aminés, le sommet et la base du remplissage du Lazaret s'individualisent avec des valeurs qui sont respectivement au-dessous et au-dessus de la courbe moyenne. Les échantillons d'âges inférieurs à 200 000 ans présentent des valeurs proches pour Asp et pour Glu, ce qui est incompatible avec une conception classique selon laquelle la vitesse de racémisation de Asp serait environ de trois fois supérieure à celle de Glu. L'acide glutamique présente par ailleurs un comportement moins clair que Asp, avec une valeur très faible pour le niveau le plus jeune, alors qu'au-delà de 200 000 ans les valeurs de Glu sont presque constantes.

## 3. FRACTION HCL SOLUBLE

C'est la fraction dans laquelle les taux de racémisation se comportent de la manière la plus désordonnée (fig. 4). Les sites les plus récents présentent des valeurs élevées pour Asp alors qu'elles sont faibles pour Glu. Parmi les autres sites,

seul le Vallonnet s'individualise par une valeur particulièrement élevée de l'acide aspartique alors que la racémisation de l'acide glutamique est très faible. Nous n'avons pu trouver aucun élément de cohérence dans les résultats de cette fraction protéique.

## 4. FRACTION HCL INSOLUBLE

Dans cette dernière fraction, il existe une nette différence entre Asp et Glu (fig. 5). Le comportement de Asp se rapproche ici de ce qui a été observé dans l'extrait EDTA et il est justifié de parler de courbe moyenne. Une autre similitude vient du comportement des échantillons du sommet et de la base de la stratigraphie du Lazaret qui sont respectivement au-dessous et au-dessus de la tendance générale. La cohérence des valeurs de Glu est moins évidente. Pour cet acide aminé les points se répartissent en deux groupes : d'une part le niveau 3 de Pataud, le Portel couches B et L, la base du Lazaret et le Vallonnet constituent une série de valeurs élevées ; d'autre part le niveau 14 de Pataud, la Roquette, les Canalettes, le sommet du Lazaret, Orgnac et l'Arago présentent des valeurs faibles. Dans ce dernier groupe, la racémisation de l'acide glutamique semble tendre vers une limite comme dans la fraction EDTA dialysée.

## INTERPRÉTATION - DISCUSSION

### 1. COHÉRENCE DES RÉSULTATS

Deux des protocoles expérimentaux conduisent à des résultats dont une logique se dégage, alors que les résultats des deux autres apparaissent plus aléatoires. La définition de l'extrait total est simple, mais sa composition précise dépend grandement de l'environnement dans lequel l'os a été conservé, des ruptures subies par les protéines et de la fuite,



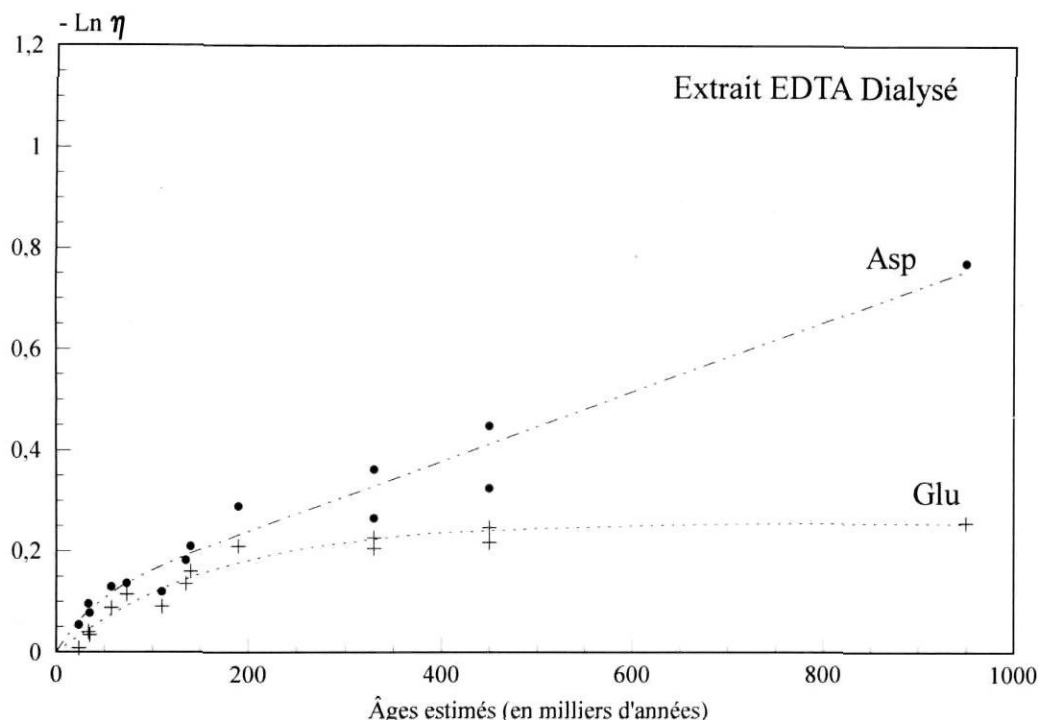


FIGURE 3. Extrait EDTA : Racémisations de Asp (•) et de Glu (+) en fonction des âges estimés. Les courbes moyennes correspondent aux relations [7] et [8] (tabl. III).

*EDTA extract : acemizations for Asp (•) and Glu (+) vs. the estimated ages. The curves were plotted according to relations [7] and [8] (Table III).*

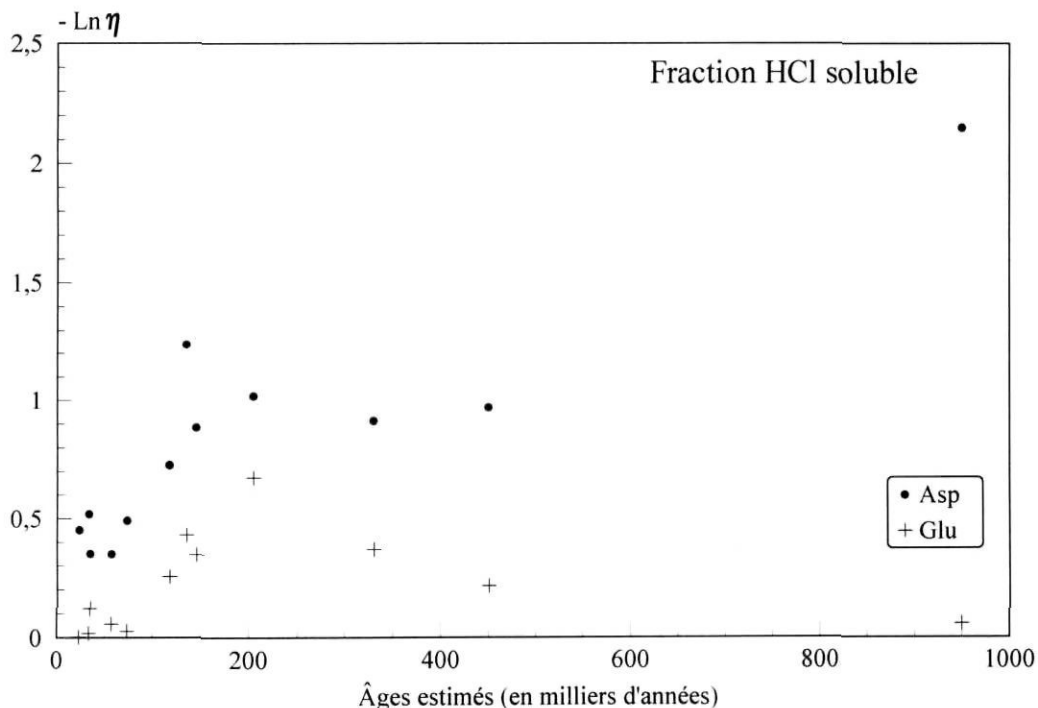


FIGURE 4. Fraction HCl soluble : Racémisations de Asp (•) et de Glu (+) en fonction des âges estimés.

*HCl soluble fraction : racemizations for Asp (•) and Glu (+) vs. the estimated ages.*

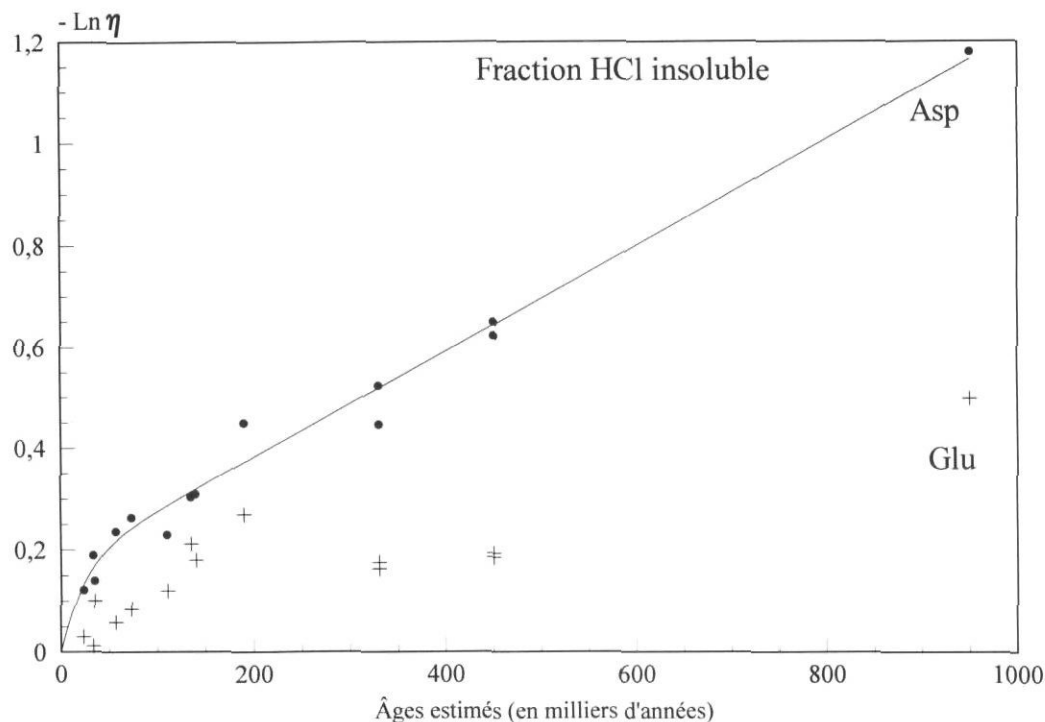
hors de l'os, des molécules solubles. La signification des autres fractions est plus complexe et nécessite la connaissance des propriétés des protéines osseuses. Malgré cette réserve, il semble bien que la logique prévue soit observée. La racémisation et le temps sont liés dans les extraits EDTA dialysé et HCl insoluble dont les contenus protéiques sont mieux définis. Par contre, l'évolution de la racémisation est imprévisible dans les extraits hétérogènes. L'approche expérimentale choisie pour isoler la fraction HCl insoluble se rap-

proche de celles utilisées en vue de mesures isotopiques (mesure du  $^{14}\text{C}$  par accélérateur,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,...), à l'exception des étapes de gélification et d'élimination des acides humiques dont l'effet sur la racémisation n'est pas connu (chauffage en milieu acide puis traitement par la soude).

Il faut encore comparer les résultats de l'extrait EDTA dialysé à ceux de la fraction HCl insoluble. Pour l'acide aspartique, la seconde série de valeurs est nettement plus élevée que la première. Pour l'acide glutamique, les choses sont

FIGURE 5. Fraction HCl insoluble : Racémisations de Asp (•) et de Glu (+) en fonction des âges estimés. Les courbes ont été tracées pour Asp à partir de la relation [9].

*HCl insoluble fraction : racemizations for Asp (•) and Glu (+) vs. the estimated ages. The curve were plotted for Asp from relation [9].*



moins claires en raison de la dispersion des points de la fraction HCl insoluble, mais il n'y a pas de différence significative entre les deux séries. Selon notre interprétation sur la composition en protéines de ces deux fractions, le collagène acido-insoluble présente pour Asp des taux de racémisation plus élevés que l'ensemble formé par les fragments solubles de collagène dans l'EDTA et les protéines non collagéniques. Ce résultat est assez surprenant même s'il est en accord avec l'hypothèse d'une racémisation rapide de Asp dans les grosses molécules. Cette observation est à rapprocher de celle de Lafont (1984) dont les résultats indiqueraient une énergie d'activation faible pour la racémisation de Asp dans le collagène. Cet auteur avait supposé l'existence d'un mécanisme concerté pour la racémisation des acides aminés des trois chaînes formant une molécule de collagène. Il serait intéressant de confirmer la composition des fractions EDTA dialysé et HCl insoluble pour la répartition en poids moléculaires et pour l'origine des protéines (collagène vs protéines non collagéniques).

La racémisation parasite induite par l'hydrolyse des protéines soulève aussi des complications qui n'ont été que très partiellement abordées. Nous avons été contraint de considérer que cette étape entraîne une racémisation indépendante de l'état de conservation des protéines. L'estimation de Ri à partir du résultat fourni par un os actuel traité selon le même protocole que les fossiles n'est peut-être pas applicable à tous les échantillons. Ainsi, nous avons été amenés à adapter les conditions d'hydrolyse de l'extrait EDTA (HCl 1 M au lieu de 6 M) après avoir constaté que les protéines issues de cette extraction étaient beaucoup plus sensibles à la racémisation parasite que les autres. Deux explications sont envisageables : d'une part l'absence d'une fraction minérale susceptible de neutraliser une partie de l'acide ou, d'autre part,

la nature même des protéines plus facilement hydrolysables que le collagène. De nouvelles techniques d'hydrolyse utilisant une combinaison d'attaques chimiques et enzymatiques pourraient, après adaptation, s'appliquer aux protéines osseuses fossiles et résoudre ce problème (D'Aniello *et al.*, 1993).

## 2. APPLICATION DU MODÈLE BI-EXPONENTIEL AUX RÉSULTATS DES EXTRAITS PROTÉIQUES DE HAUT POIDS MOLÉCULAIRE

À l'examen des résultats présentés, deux niveaux d'analyse apparaissent : le premier, pragmatique, conduit à établir des règles pratiques permettant d'obtenir des informations chronologiques fiables sur la base de la RAA ; le deuxième, plus fondamental, s'attache à la compréhension des mécanismes de la racémisation et nécessite l'élaboration de modèles.

Les quatre séries de valeurs issues d'une sélection (même sommaire) des protéines avant la mesure des taux de racémisation semblent s'organiser selon des courbes qui pourraient traduire l'existence d'une cinétique bi-exponentielle de la RAA dans les protéines osseuses. La forme générale de cette relation cinétique est :

$$\eta = C_1 e^{-K_1 t} + C_2 e^{-K_2 t} \quad [6]$$

La possibilité d'ajustement de cette relation à chacune des séries de points a été testée à l'aide du module de régression non linéaire d'un logiciel (STATITCF). Les mêmes séries de valeurs traitées par le programme précédemment utilisé (Saint-Martin *et al.*, 1994) fournissent des constantes légèrement différentes, mais les courbes moyennes qui résultent des deux modes de calcul sont presque exactement superposables.

Pour la réalisation pratique des calculs :

— Les valeurs de  $\eta$  ont été calculées à partir des  $-\ln \eta$  donnés dans le tableau II. Nous avons exprimé les âges en  $10^4$  ans et nous avons donc multiplié les constantes  $K_1$  et  $K_2$  fournies par le programme par  $10^{-4}$ .

— Les incertitudes qui affectent d'une part les âges de références et d'autre part les excès énantiomériques n'ont pas été introduites dans le calcul des intervalles de confiance. Les calculs ont donc été faits à partir des âges moyens des niveaux étudiés et des valeurs moyennes de racémisation.

— Plusieurs points ( $t = 0$  ;  $\eta = 1$ ) ont été introduits pour faire passer la courbe moyenne par l'origine des axes. Dans la relation [6] cela correspond à la contrainte  $C_1 + C_2 = 1$  (Saint-Martin et Julg, 1991). L'acide glutamique soulève un problème dont nous discuterons plus loin. Les résultats sont donnés avec un intervalle de confiance approché à  $\pm 1\sigma$ . Dans tous les cas, le coefficient de détermination fourni par le logiciel est au moins égal à 0,99.

Les valeurs ainsi déterminées (tabl. III) fournissent les courbes moyennes présentées dans la figure 3 (rel. [7] et [8]) et la courbe « Asp » de la figure 5 (rel. [9]). Les constantes de vitesse pseudo-linéaires ( $K_1$  et  $K_2$ ) ont le même ordre de grandeur dans chacune des quatre séries ( $10^{-5} \text{ an}^{-1}$  pour  $K_1$  et  $10^{-7} \text{ an}^{-1}$  pour  $K_2$ ). L'acide aspartique présente des constantes de vitesse équivalentes dans les deux séries de valeurs et significativement supérieures à celles de l'acide glutamique. Deux points provenant du Lazaret - le sommet et la base du remplissage - s'éloignent plus particulièrement des courbes moyennes. En supprimant ces deux points, la courbe moyenne (rel. [7]) pour Asp dans l'extrait EDTA dialysé devient :

$$\eta = 0,094 \pm 0,0084 e^{-3,11 \pm 0,63 \cdot 10^{-5} t} + 0,907 \pm 0,008 e^{-6,9 \pm 0,2 \cdot 10^{-7} t} \quad [11]$$

Pour Asp dans la fraction HCl insoluble (rel. [9]) la courbe moyenne devient :

$$\eta = 0,161 \pm 0,012 e^{-4,45 \pm 0,87 \cdot 10^{-5} t} + 0,839 \pm 0,011 e^{-10,2 \pm 0,45 \cdot 10^{-7} t} \quad [12]$$

L'élimination de ces observations ne modifie pas les courbes moyennes, mais elle réduit bien évidemment les intervalles de confiance.

Les résultats provenant de l'acide glutamique présentent d'autres difficultés. En particulier, les courbes moyennes des deux séries ne semblent pas passer naturellement par l'origine des axes. Une erreur sur  $R_i$  pour l'acide glutamique pourrait être à l'origine de ce problème, mais aucun argument ne permet de modifier dans un sens ou dans un autre ces valeurs. Si la contrainte ( $C_1 + C_2 = 1$ ) est supprimée, la courbe moyenne pour Glu dans l'extrait EDTA (rel. [8]) devient :

$$\eta = 0,226 \pm 0,032 e^{-0,96 \pm 0,34 \cdot 10^{-5} t} + 0,802 \pm 0,037 e^{-0,4 \pm 0,6 \cdot 10^{-7} t} \quad [13]$$

Le fait que la courbe ne soit pas forcée par l'origine ne modifie pas les paramètres de la courbe, à l'exception de  $K_2$  qui devient légèrement positif.

Les valeurs de Glu dans la fraction HCl insoluble se partagent en deux groupes (« élevés » et « faibles ») (fig. 5). Si les courbes ne sont pas forcées par l'origine des axes, la série de valeurs élevées (Pat n3, LPo B, LPo L, Laz b, Val) donne :

$$\eta = 0,432 \pm 0,305 e^{-4,62 \pm 2,81 \cdot 10^{-5} t} + 0,83 \pm 0,22 e^{-3,3 \pm 0,55 \cdot 10^{-7} t} \quad [14]$$

La série de valeurs faibles (Pat n14, Roq, Can, Laz s, Org, Ara) est ajustée par la relation :

$$\eta = 0,235 \pm 0,012 e^{-2,2 \pm 0,28 \cdot 10^{-5} t} + 0,881 \pm 0,01 e^{-1,3 \pm 0,31 \cdot 10^{-7} t} \quad [15]$$

Ce second ensemble de données donne une relation plus cohérente que la précédente et constitue un bon ajustement aux six points de la série. Les incertitudes sur les paramètres sont faibles et la somme de  $C_1$  et  $C_2$  est plus proche de l'unité.

### 3. PROPOSITION D'UN SCHÉMA GÉNÉRAL DE LA RACÉMISATION DANS LES OSSEMENTS FOSSILES

Le tissu osseux et les protéines osseuses telles que le collagène, l'ostéocalcine, l'ostéonectine, les phosphoprotéines, etc. présentent peu de variabilités entre espèces animales. Ce qui représente une difficulté à surmonter lorsqu'on entreprend des études de phylogénie à partir de ce matériel devient une chance pour la datation par RAA. En effet, à la diversité des fossiles carbonatés où presque chaque genre (sinon chaque espèce) présente une cinétique de racémisation qui lui est propre, s'oppose l'homogénéité des ossements qui doit logiquement se traduire par une cinétique

TABLEAU III

Valeurs numériques applicables à la relation [6] (valeurs moyennes  $\pm 1\sigma$ ) pour l'ajustement aux différentes séries expérimentales lorsque les courbes sont forcées par l'origine des axes

|                          | $C_1$              | $K_1 \text{ (an}^{-1}\text{)}$ | $C_2$              | $K_2 \text{ (an}^{-1}\text{)}$ |
|--------------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------------|
| Asp EDTA<br>rel. [7]     | $0,0965 \pm 0,017$ | $2,63 \pm 1,05 \cdot 10^{-5}$  | $0,9034 \pm 0,016$ | $6,90 \pm 0,50 \cdot 10^{-7}$  |
| Glu EDTA<br>rel. [8]     | $0,2248 \pm 0,036$ | $0,69 \pm 0,16 \cdot 10^{-5}$  | $0,7777 \pm 0,037$ | $0 \pm 0,60 \cdot 10^{-7}$     |
| Asp HCl ins.<br>rel. [9] | $0,1592 \pm 0,017$ | $4,40 \pm 1,33 \cdot 10^{-5}$  | $0,8409 \pm 0,016$ | $10,4 \pm 0,7 \cdot 10^{-7}$   |
| Glu HCl ins.<br>rel. [9] | $0,1174 \pm 0,045$ | $1,60 \pm 1,20 \cdot 10^{-5}$  | $0,8851 \pm 0,044$ | $3,40 \pm 0,95 \cdot 10^{-7}$  |

unique, applicable à tous. La structure primaire du collagène (c'est-à-dire l'ordre d'enchaînement de ses acides aminés) est un autre facteur favorable. Cette protéine qui est très majoritaire dans l'ossement, présente une structure répétitive (le triplet Gly-X-Y où Y est souvent la proline ou l'hydroxyproline) qui réduit encore la diversité des environnements moléculaires des acides aminés.

La dispersion de nos résultats est encore importante et l'effort méthodologique doit être poursuivi. Malgré cette réserve, la racémisation des acides aminés dans les protéines osseuses fossiles semble être un indicateur chronologique valable, dont la dépendance à l'environnement n'est sans doute pas plus contraignante que celles auxquelles on doit faire face dans le cadre des méthodes physiques de datations (U-Th, ESR, TL).

Le cadre théorique que nous proposons pour cette méthode est le suivant :

— La racémisation d'un acide aminé inclus dans une protéine peut être le résultat d'une attaque chimique ou se faire par l'intermédiaire de l'effet tunnel (Julg, 1987). Ce second mécanisme devient négligeable par rapport à la racémisation chimique lorsque la température est suffisante.

— Quel que soit le mécanisme réactionnel, la cinétique de racémisation d'un acide aminé inclus dans une protéine suit une relation bi-exponentielle (rel. [6]) en raison des interactions stériques et électrostatiques qui lient les acides aminés d'un même enchaînement peptidique (Saint-Martin et Julg, 1991).

À ces deux points fondamentaux, on doit ajouter :

— Les valeurs numériques  $C_1$ ,  $K_1$  et  $K_2$  caractérisent un acide aminé situé dans un environnement moléculaire précis. Peut-être sera-t-il possible de déterminer ces valeurs à partir de la connaissance de la structure de la protéine (particulièrement le collagène) ? Dans cette attente, la RAA est dépendante des âges de référence fournis par d'autres méthodes. Dans l'absolu, il serait souhaitable d'isoler un fragment peptidique ne contenant qu'un résidu de l'acide aminé que l'on souhaite étudier, qui serait identique chez de nombreuses espèces animales et en bon état de conservation dans de nombreux échantillons.

— La cinétique proposée suppose que le système soit fermé, ce qui, de toute évidence, n'est pas le cas des ossements fossiles. Il ne peut pas y avoir créations de liaisons peptidiques et additions d'acides aminés à une protéine fossile. Par contre, elle peut perdre par hydrolyse partielle certains de ses résidus. Cette perte ne doit avoir qu'un effet marginal sur la cinétique globale de racémisation, sauf si elle est massive et stéréo-sélective (par exemple, il ne faut pas que les formes D soient plus labiles que les formes L). Si un tel phénomène existe, la cinétique observée peut s'éloigner de la courbe bi-exponentielle.

Notons enfin que la variabilité des résultats ne semble pas liée à la température moyenne actuelle des sites dans la limite de la zone géographique explorée et pour des gisements en grotte ou en abri sous roche. Plus généralement, les facteurs physico-chimiques ont un effet moins important sur la

racémisation à l'intérieur des protéines de grande taille que sur l'ensemble des acides aminés.

#### 4. LIMITES ET DIFFICULTÉS SOULEVÉES PAR LE MODÈLE

Les faiblesses du modèle que nous proposons sont de deux ordres : 1) liées aux résultats expérimentaux sur lesquels nous nous sommes appuyés et 2) tenant à la structure du modèle lui-même.

- La taille de l'échantillonnage (nombre de niveaux stratigraphiques) est trop faible pour que l'on soit sûr que la racémisation suive la cinétique bi-exponentielle dans l'ensemble des conditions de gisements. Les sites d'âges supérieurs à 200 000 ans manquent, et il serait aussi nécessaire de multiplier les études de sites plus récents, en particulier dans l'intervalle d'âges où la courbe cinétique est fortement incurvée. La RAA est pour l'instant tributaire de points de référence fournis par d'autres méthodes et l'incertitude sur les âges de référence amoindrit la crédibilité des courbes moyennes proposées. Nos calculs n'ont pu être basés que sur des âges moyens dont le choix est imposé par les sites datés disponibles.

- L'explication précédemment proposée aux cinétiques complexes observées dans les fossiles carbonatés faisait appel à la dégradation des protéines (Kriaušakul et Mitterer, 1978 ; Kimber et Griffin, 1987) et la même explication pourrait être appliquée aux ossements. Plusieurs auteurs ont envisagé l'hypothèse selon laquelle la racémisation étant plus rapide dans les protéines que dans les acides aminés libres, la dégradation du matériel protéique fossile devrait s'accompagner d'une baisse de la constante de vitesse apparente. Le schéma A de la figure 6 correspond à cette hypothèse que l'on peut désigner par « modèle dégradatif », appliqué au cas simple d'un dipeptide. En début de processus, les acides aminés sont essentiellement inclus dans l'enchaînement et peuvent se racémiser rapidement. Les dégradations et en particulier les ruptures de liaisons peptidiques libèrent des acides aminés qui pourront se racémiser, mais plus lentement. Les conséquences de ce modèle sont :

- Après un temps assez long, chaque acide aminé doit avoir un comportement indépendant puisqu'il est isolé des autres.

- La cinétique bi-exponentielle doit s'observer sur l'ensemble protéines + peptides + acides aminés libres.

- La proportion relative de petites et de grandes molécules détermine le passage de la première à la seconde des parties linéaires de la cinétique et, en définitive, c'est la vitesse de rupture des liaisons peptidiques qui commande la forme globale de la cinétique.

Cette explication est insatisfaisante pour plusieurs raisons. En premier lieu, elle est essentiellement fondée sur des résultats d'expériences par chauffage *in vitro* qui ne constituent pas un bon modèle de la racémisation diagénétique. Nous n'avons aucune raison de penser que les vitesses de racémisation et d'hydrolyse évoluent de manière similaire en fonction de la température. Cette explication suppose aussi que la dégradation des protéines fossiles soit un phénomène



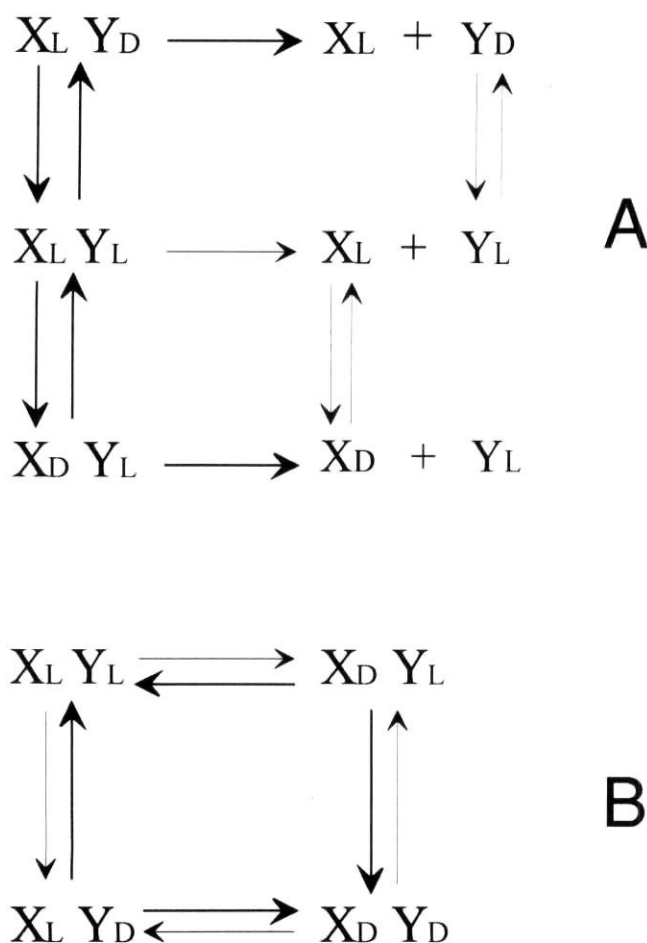


FIGURE 6. Schémas de deux modèles rendant compte des cinétiques de racémisation bi-exponentielles : A) racémisation-dégradation et B) épimérisation.

*Diagrams of two models which account for the bi-exponential kinetics of racemization. Let us consider a dipeptide of two different amino acids X and Y. In the first case (A) coupling between degradation and racemization), racemization rates are higher inside the peptide, but hydrolysis take place preferentially between L and D forms which led to free amino acids and modify the global kinetics. In the second model (B) epimerisation inside a peptide), the racemization rate for an amino acid in a peptide is dependent of the molecular surrounding (the state L or D of the neighbour). The coupling between neighbouring amino acids induces a deviation from the kinetics of a reversible first-order reaction because each elementary reaction is characterized by a proper rate constant.*

directement lié au temps : c'est la condition indispensable pour pouvoir expliquer l'évolution régulière de la cinétique telle qu'elle a été observée dans les coquilles, les coraux ou les ossements. Si l'on pense au contraire que la dégradation des protéines fossiles est essentiellement liée aux conditions environnementales, alors l'on devrait observer une évolution non prévisible de la racémisation. L'hypothèse dégradative pourrait être satisfaisante si la rupture d'une liaison peptidique dépendait de la racémisation. Cette idée, qui n'a jamais été clairement développée, est appuyée par le fait que l'association entre deux acides aminés de même configuration (LL ou DD) est plus stable que celle entre deux molécules hétérochirales.

Le schéma B de la figure 6 présente le cas simple d'une épimérisation dans un dipeptide<sup>1</sup>. Dans un tel système chacun des acides aminés peut passer de la forme L à la forme D avec des constantes de vitesse qui dépendent de l'état dans lequel se trouve son voisin. La racémisation n'est donc pas un phénomène caractéristique d'un acide aminé mais plutôt d'un enchaînement d'acides aminés entre lesquels existent des couplages dus aux phénomènes d'encombrements stériques et d'interactions électrostatiques, bien connus en biochimie structurale des protéines. En début de réaction, seule la forme LL est présente et chacun des deux acides aminés peut se racémiser à une vitesse propre pour donner les formes LD et DL. Ces dernières fourniront à leur tour la forme DD. Après un certain temps, la racémisation globale observée sur l'un des deux acides aminés est la résultante d'un ensemble de réactions élémentaires dont les substrats comme les produits sont partagés avec les autres acides aminés. Un tel modèle a plusieurs conséquences importantes :

— L'écart à la cinétique classique doit s'observer à l'intérieur des protéines et des peptides sans qu'aucune dégradation n'ait eu lieu.

— La racémisation d'un acide aminé doit suivre une cinétique bi-exponentielle décrite par la relation [6]. Dans cette relation les valeurs de  $K_1$  et  $K_2$  sont les mêmes pour les différents acides aminés d'un dipeptide ; ce sont  $C_1$  et  $C_2$  ( $C_2 = 1 - C_1$ ) qui déterminent les différences de cinétiques entre les acides aminés.

— Les acides aminés à « racémisation rapide » doivent voir leurs racémisations ralentir alors que les acides aminés à « racémisation lente » doivent avoir un comportement inverse ou stable.

Les résultats numériques que nous avons obtenus ne s'accordent pleinement avec aucun des deux modèles. Le fait que la cinétique bi-exponentielle ait été observée dans les protéines de grandes tailles satisfait le modèle de l'épimérisation peptidique, mais la différence entre les constantes  $K_1$  et  $K_2$  pour les deux acides aminés est en contradiction avec les prévisions de ce modèle.

Il est aussi possible que la structure tridimensionnelle de la protéine (en particulier le collagène) complique le modèle, initialement élaboré pour le cas simple d'un dipeptide. Nous devons de toute façon garder en mémoire l'idée d'un couplage entre racémisation d'un acide aminé et ruptures des liaisons peptidiques adjacentes. Un tel couplage, venant se superposer à l'épimérisation peptidique, peut compliquer la cinétique globalement observée.

## 5. TRAVAUX PRÉCÉDEMMENT RÉALISÉS :

### L'INFLUENCE DES PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX

Les déterminations de taux de racémisation réalisées à partir d'ossements fossiles sans sélection préalable d'une fraction protéique ont été très nombreuses. Elles n'ont ce-

1. Épimérisation est le terme qui s'applique au changement de configuration d'un centre d'asymétrie, dans une molécule qui en contient plusieurs.

pendant abouti à aucun résultat cohérent et les études sur ce type de matériau ont finalement été abandonnées.

Au contraire, les travaux consacrés à la RAA à l'intérieur des protéines osseuses fossiles sont relativement peu nombreux. Une première étude a porté sur une série de gisements d'âges allant de 5000 ans BP à environ 50 000 ans (Lafont, 1984 ; Julg *et al.*, 1987). La méthode utilisée dans ces travaux consistait en une déminéralisation par l'EDTA suivie d'une dialyse à 3500 Dalton, sans qu'il y ait distinction entre les parties soluble et insoluble. Dans ces conditions, les résultats indiquent une cinétique du premier ordre pour l'acide aspartique et pour l'alanine. Pour les sites d'âges inférieurs à 30 000 ans, les résultats de cette étude sont relativement proches de la courbe moyenne de la fraction HCl insoluble.

L'étude de Elster *et al.* (1991) a porté sur une cinquantaine d'ossements fossiles provenant essentiellement du Moyen-Orient. Dans ce cas, l'étape centrale du protocole expérimental réalisait simultanément une déminéralisation et une dialyse à 3500 D : le sac à dialyse étant placé dans HCl 0,3 M en large excès. Les fractions soluble et insoluble ont été ensuite séparées par centrifugation. Les mêmes auteurs ont utilisé d'autres approches comme la destruction en milieu oxydant des protéines non protégées par la phase minérale ou la séparation des protéines par chromatographie d'échange d'ions. Tous les échantillons n'ont donc pas fait l'objet de la même approche analytique et il est difficile de tirer des conclusions précises, mais les auteurs soulignent que la sélection des protéines réduit la variabilité des taux de racémisation.

Kimber et Hare (1992) ont étudié un ossement humain de momie égyptienne. Ces auteurs insistent sur la variabilité des taux de racémisation en fonction de la taille de la protéine et de son caractère hydrophobe. L'échantillon étudié est sans doute trop récent pour que l'on puisse parler de « collagène fossile » ( $\approx 2500$  à  $3000$  ans) ; il a de plus été soumis à des conditions de conservation non naturelles car protégé du lessivage.

Plus récemment, une étude a porté sur des sites du Sud de la France, dont certains déjà étudiés par R. Lafont (Marzin, 1994). Cette étude a probablement souffert de la mauvaise qualité des échantillons — esquilles de très petites tailles que l'auteur a dû rassembler pour atteindre une masse suffisante (E. Marzin, communication personnelle). Cette série d'échantillons a subi une attaque par HCl 2 M en excès, suivie soit par une récupération de la partie insoluble, soit par une dialyse à différents seuils de coupure. Malgré la dispersion des résultats, certaines valeurs sont proches de celles obtenues par R. Lafont et de celles de la fraction HCl insoluble du présent travail.

D'une manière générale, il apparaît que les valeurs numériques finales sont fortement influencées par un ensemble d'options méthodologiques, parmi lesquelles les conditions d'extraction sont les plus déterminantes.

## CONCLUSION

Depuis ses débuts, la datation par RAA s'est heurtée à la fois à des problèmes conceptuels et à des problèmes techni-

ques, d'ailleurs interdépendants. Au niveau du principe de la méthode, son point central — la relation décrivant l'évolution de la racémisation avec le temps — avait été établie à partir d'un modèle trop simplifié pour représenter la situation réelle des molécules fossiles. Sur le plan technique, deux difficultés ont pesé. Il s'agit d'abord de la séparation et de la quantification des formes D et L des acides aminés, ensuite de la caractérisation et de la sélection des protéines fossiles. La racémisation parasite induite par l'hydrolyse introduit aussi des incertitudes.

Des progrès sensibles ont été réalisés pour chacune de ces questions, mais aucune n'a encore trouvé de réponse définitive. En ce qui concerne le principe de la méthode, nous proposons l'utilisation d'une relation bi-exponentielle pour décrire la cinétique de racémisation. Cette relation conduit à de bons ajustements pour les résultats obtenus sur les fossiles carbonatés ; le présent travail indique que la RAA à l'intérieur des protéines d'ossements fossiles suit apparemment le même schéma. Cependant, les résultats numériques sont encore trop dispersés autour des courbes moyennes pour que l'on puisse calculer un âge par RAA avec une précision satisfaisante. La réduction des incertitudes relève de plusieurs approches : une meilleure compréhension de la diagenèse des protéines et de ses liens avec la racémisation, un développement des techniques de purification des protéines fossiles destinées à sélectionner des fractions toujours plus homogènes, enfin la possibilité de déterminer avec une plus grande précision les taux de racémisation simultanément sur un plus grand nombre d'acides aminés. À l'image des autres méthodes de datations, la RAA doit aussi se doter de critères d'auto-contrôle permettant le rejet des échantillons impropres à la mesure.

La RAA peut apporter des informations chronologiques d'un grand intérêt, en particulier dans les gisements ou dans les niveaux stratigraphiques qui ne sont pas accessibles à d'autres méthodes. Ses limitations actuelles sont surtout dues à des contraintes matérielles, mais les techniques nécessaires à son développement sont pour l'essentiel disponibles. Un affinement des techniques expérimentales de sélection des protéines et de mesure des taux de racémisation devrait permettre de réduire de façon importante les incertitudes qui pèsent encore sur les résultats de cette méthode. Une fois ces obstacles levés, la RAA pourraient être l'une des rares méthodes de datation applicable à la fois à des sites très récents et à des sites très anciens à partir d'un matériel présent en abondance.

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à exprimer nos remerciements au professeur Henry de Lumley et à M<sup>me</sup> Liliane Meignen qui nous ont permis d'utiliser de nombreux ossements préhistoriques au cours de ces travaux de mise au point méthodologique. Nous remercions également MM. Serge Occhietti, Pierre Pichet, Nathaniel Rutter et un lecteur anonyme pour les nombreuses suggestions qui ont permis d'améliorer ce manuscrit.

## RÉFÉRENCES

- Ajaja, O., 1994. Datation de quelques sites moustériens de Catalogne et du Languedoc par la méthode U-Th, comparaison avec la méthode ESR. Thèse de doctorat, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 149 p.
- Aswad, D.W., 1984. Determination of D- and L- aspartate in amino acid mixture by High Performance Liquid Chromatography after derivatization with a chiral adduct of O-phthalaldehyde. *Analytical Biochemistry*, 137 : 405-409.
- Bahain, J.-J., 1993. Datation par Résonance de Spin Electronique (ESR) de carbonates et d'émail dentaire quaternaires : potentiel et problèmes. Thèse de doctorat, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 114 p.
- Ball, G., Saint-Martin, B. et Béraud-Colomb, E., 1987. A systematic study of the amino acid compositions and D/L ratios in fossil bones from two french neanderthalian sites. *Human Evolution*, 2 (4) : 289-296.
- Bricker, H.M. et Mellars, P.A., 1987. Datations  $^{14}\text{C}$  de l'abri Pataud (Les Eyzies, Dordogne) par le procédé « Accélérateur - Spectromètre de masse ». *L'Anthropologie*, 91 (1) : 227-234.
- Combier, J., 1967. Le Paléolithique de l'Ardèche dans son cadre paléoclimatique. Publications de l'Institut de Préhistoire de l'Université de Bordeaux, mémoire 4, imprimerie Delmas, Bordeaux.
- D'Aniello, A., Petrucelli, L., Gardner, C. et Fisher, G., 1993. Improved method for hydrolyzing proteins and peptides without inducing racemization and for determining their true D-amino acid content. *Analytical Biochemistry*, 213 : 290-295.
- Debard, E. et Pastre, J.F., 1988. Un marqueur chronostratigraphique du Pléistocène moyen à la périphérie du Massif Central : la retombée à clinopyroxène vert du Sancy dans le site acheuléen d'Ornac III (Bas-Vivarais, SE France). *Comptes rendus de l'Académie des Sciences, série II*, 306 : 1515-1520.
- El Fouikar, A., 1995. Racémisation des acides aminés et conservation des protéines dans les ossements fossiles de sites du Pléistocène (grotte du Vallonnet à Roquebrune-Cap-Martin, grotte du Lazaret à Nice, grotte du Portel à Loubens). Thèse de doctorat, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 182 p.
- El Fouikar, A. et Gardeisen, A., 1994. Contribution de l'archéozoologie et de l'analyse biochimique à l'étude de la conservation osseuse dans le Pléistocène supérieur de la grotte du Portel (Ariège, France). *Quaternaire*, 5 (1) : 3-15.
- El Fouikar, A., El Mansouri, M. et Saint-Martin, B. (1995). La conservation et la racémisation des acides aminés dans les ossements fossiles de la grotte du Lazaret (Nice, France). *Quaternaire*, 6 (3-4) : 151-158.
- El Fouikar, A. et Saint-Martin, B. (à paraître). Étude paléobiochimique des ossements fossiles de la grotte du Lazaret. In H. de Lumley, éd., *Cadre chronologique du remplissage de la grotte du Lazaret (géomorphologie, stratigraphie, biostratigraphie, paléoclimatologie, évolution culturelle, géochronologie)*.
- El Mansouri, M., 1995. Étude paléobiochimique des ossements de l'abri Pataud. Conservation de la matière organique et datation par la racémisation des acides aminés. Thèse de doctorat, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 137 p.
- El Mansouri, M., El Fouikar, A. et Saint-Martin, B. (sous presse) Correlation between C14 ages and aspartic acid racemization at the upper Palaeolithic site of the abri Pataud (Dordogne, France). *Journal of Archaeological Sciences*.
- Elster, H., Gil-Av, E. et Weiner, S., 1991. Amino acid racemization of fossil bone. *Journal of Archaeological Science*, 18 : 605-617.
- Falguères, C., 1986. Datations de sites acheuléens et moustériens du midi méditerranéen par la résonance de spin électronique (ESR). Thèse de doctorat, Université Paris VI et Muséum national d'Histoire naturelle, 173 p.
- Falguères, C., Shen, G. et Yokoyama, Y., 1988a. Datation de l'aven d'Ornac III : comparaison par les méthodes de Résonance de Spin Electronique (ESR) et déséquilibre des familles de l'uranium. *L'Anthropologie*, 92 (2) : 727-729.
- Falguères, C., Yokoyama, Y. et Quaegebeur, J.-P., 1988b. Datations de sédiments quaternaires par la méthode de la Résonance de Spin Electronique (ESR). *L'Anthropologie*, 92 (2) : 723-726.
- Falguères, C., de Lumley, H. et Bischoff, J.L., 1992. U-series dates for stalagmitic flowstone E (Riss/Würm interglaciation) at grotte du Lazaret, Nice, France. *Quaternary Research*, 38 : 227-233.
- Gardeisen, A., 1994. Restes fauniques et stratégies de chasse dans le Pléistocène supérieur de la grotte ouest du Portel (Ariège, France). Thèse de doctorat, Université Paul Valéry - Montpellier III, 484 p.
- Julg, A., 1987. La racémisation spontanée : une horloge fiable pour la datation absolue des ossements fossiles. *L'Anthropologie*, 91 (1) : 235-240.
- Julg, A., Lafont, R. et Périnet, G., 1987. Mechanism of collagen racemization in fossil bones : Application to absolute dating. *Quaternary Science Review*, 6 : 25-28.
- Khatib, S., 1989. Le site d'Ornac 3 (Ardèche, France). Étude sédimentologique et géochimique. Cadre chronologique et évolution paléoclimatique. Thèse de doctorat, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 209 p.
- Kimber, R.W.L. et Griffin C.V., 1987. Further evidence of the complexity of the racemization process in fossil shells with implications for amino acid racemization dating. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51 : 839-846.
- Kimber, R.W.L. et Hare, P.E., 1992. Wide range of racemization of amino acids in peptides from human fossil bone and its implications for amino acid racemization dating. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56 : 739-743.
- Kriausakul, N. et Mitterer R.M., 1978. Isoleucine epimerization in peptides and proteins : Kinetic factors and application to fossil proteins. *Science*, 201 : 1011-1014.
- Lafont, R., 1984. Racémisation des acides aminés du collagène d'ossements fossiles : application aux datations absolues. Thèse de doctorat d'Université, Université Claude Bernard - Lyon I, 78 p.
- Lumley, H. de, 1988. La stratigraphie du remplissage continental de la grotte du Vallonnet. *L'Anthropologie*, 92 (2) : 407-428.
- Lumley, H. de, Fournier, A., Park, Y.C., Yokoyama, Y. et Demouy, A., 1984. Stratigraphie du remplissage Pléistocène moyen de la caune de l'Arago à Tautavel. Étude de huit carottages effectués de 1981 à 1983. *L'Anthropologie*, 88 (1) : 5-18.
- Marzin, E., 1994. Évaluation de la conservation du collagène d'ossements fossiles Quaternaire : applications à la racémisation et à la biogéochimie. Thèse de doctorat, Université de Provence - Aix-Marseille 1, 120 p.
- Michel, V., 1995. Étude des influences des processus de fossilisation sur le fondement de la datation radiométrique. Application à la datation par U-Th et ESR de machoires (os, dents) de *Cervus elaphus* des niveaux archéologiques de la grotte du Lazaret. Thèse de doctorat du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 240 p.
- Moncel, M.-H. et Combier, J., 1992. L'outillage sur éclat dans l'industrie lithique du site Pléistocène moyen d'Ornac 3 (Ardèche, France). *L'Anthropologie*, 96 (1) : 5-48.
- Moullé, P.E., 1992. Les grands mammifères du Pléistocène inférieur de la grotte du Vallonnet (Roquebrune-Cap-Martin). Étude paléontologique des carnivores, équidés, suidés et bovidés. Thèse de doctorat, Muséum national d'Histoire naturelle, 365 p.
- Movius, H.L., 1977. Excavation of the Abri Pataud, les Eyzies (Dordogne). *Bulletin of the American School of Prehistoric Research*, Peabody Museum 31, Harvard University, 305 p.
- Rutter, N.W., Blackwell, B., Crawford, R.J. et Karapissides, Z., 1981. Relative dating of bones by D/L ratios of amino acids from La Caune de l'Arago, France. In *Colloque international du CNRS Datations absolues et analyses isotopiques en Préhistoire*, Tautavel, France, juin 1981 (préirage).
- Saint-Martin, B., 1991a. Étude des influences géochimiques sur la vitesse de racémisation des acides aminés dans les ossements fossiles. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences, série II*, 313 : 655-600.
- 1991b. Étude des influences géochimiques et moléculaires sur la racémisation des acides aminés. Thèse de doctorat, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 216 p.

- . 1992. Étude de la racémisation dans les ossements fossiles de la caune de l'Arago : aspects techniques et résultats préliminaires. *L'Anthropologie*, 96 (1) : 199-206.
- Saint-Martin, B. et Julg, A., 1991. Influence of the interaction between asymmetry centers on the kinetics of racemization. *Journal of Molecular Structure*, 25 : 375-383.
- Saint-Martin, B., El Fouikar, A. et El Mansouri, M., 1994. Application de la théorie de l'épimérisation peptidique à la datation des fossiles. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences, série II*, 319 : 225-230.
- Schwarcz, H.P. et Blackwell, B., 1981. Uranium series dating of travertines from the cave of Caune de l'Arago, France. *In* Colloque international du CNRS Datations absolues et analyses isotopiques en Préhistoire, Tautavel, France, juin 1981 (prétirage).
- Shen, G., 1985. Datation des planchers stalagmitiques de sites acheuléens en Europe par les méthodes des déséquilibres des familles de l'uranium et contribution méthodologique. Thèse de doctorat d'État, Université Paris VI - Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 162 p.
- Valladas, H., Chadelle, J.P., Geneste, J.M., Joron, J.L., Meignen, L. et Texier, P.-J., 1987. Datations par la thermoluminescence de gisements moustériens du sud de la France. *L'Anthropologie*, 91(1) : 211-226.
- Vogel, J.C. et Waterbolk, H.T., 1967. Groningen radiocarbon dates VII. *Radiocarbon*, 9 : 107-155.
- Williams, K.M. et Smith, G.G., 1977. A critical evaluation of the application of amino acid racemization to geochronology and geothermometry. *Origins of Life*, 8 : 91-144.
- Yokoyama, Y., Quagebeur, J.-P., Bibron, R., Leger, C., Chappaz, N., Michelot, C., Shen, G.-J. et Nguyen, H.V., 1983. ESR-dating of stalagmites of the Caune de l'Arago, the grotte du Lazaret, the grotte du Vallonnet and the Abri Pié Lombard : A comparison with U-Th method. *PACT*, 9 : 381-389.