



HAL
open science

Etude des protéines dans les échantillons du Patrimoine Culturel par spectrométrie Raman et analyse protéomique

Sophie Dallongeville

► **To cite this version:**

Sophie Dallongeville. Etude des protéines dans les échantillons du Patrimoine Culturel par spectrométrie Raman et analyse protéomique. Chimie théorique et/ou physique. Université des Sciences et Technologie de Lille - Lille I, 2011. Français. NNT : . tel-00689036

HAL Id: tel-00689036

<https://theses.hal.science/tel-00689036>

Submitted on 19 Apr 2012

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.

UNIVERSITE LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES

ECOLE DOCTORALE N° 104 SCIENCES DE LA MATIERE DU RAYONNEMENT ET DE L'ENVIRONNEMENT

UNITE DE SERVICE ET DE RECHERCHE CNRS 3290

UNITE MIXTE DE RECHERCHE CNRS 8516

LABORATOIRE DE MINIATURISATION POUR

& LABORATOIRE DE SPECTROCHIMIE INFRAROUGE

L'ANALYSE, LA SYNTHÈSE ET LA PROTEOMIQUE

ET RAMAN

THESE

Présentée par

Sophie DALLONGEVILLE

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Titre de la thèse

**Etude des protéines dans les échantillons du Patrimoine
Cultuel par spectrométrie Raman et analyse protéomique**

Thèse soutenue le 21 novembre 2011 devant la commission d'examen composée de :

Président:	Pr Carlos AFONSO, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI
Rapporteurs :	Pr Concepción DOMINGO, Instituto de Estructura de la Materia, Madrid
	Dr Philippe WALTER, Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France, Paris
Examineur :	Dr Michel BONIFAY, Centre Camille Jullian, Université Aix-Marseille
Invitée:	Mme Anne Simon, Restauratrice, Marcq en Baroeul
Directeur de thèse :	Dr Christian ROLANDO
Co-Directrice de thèse :	Pr Sylvia TURRELL
Encadrantes :	Dr Caroline TOKARSKI & Dr Marie-Claire DHAMELIN COURT

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire Miniaturisation pour l'Analyse, la Synthèse et la Protéomique (MSAP, USR CNRS 3290) et du Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR, UMR CNRS 8516) de l'université de Lille 1, Sciences & Technologies. Je remercie Christian Rolando et Guy Buntinx, Directeurs de Recherche au CNRS, de m'avoir accueillie au sein de leurs unités.

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Christian Rolando et le Professeur Sylvia Turrell pour avoir assuré la direction de cette thèse. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée durant ces années et de l'autonomie que vous m'avez laissée dans l'organisation de ce travail.

Je remercie Monsieur Carlos Afonso, Professeur au sein de l'équipe Chimie Structurale Organique et Biologique de l'université Pierre et Marie Curie Paris 6, d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je remercie sincèrement Madame Concepción Domingo, Professeur à L'Institut de Structure de la Matière (IEM, Madrid) et Monsieur Philippe Walter, co-directeur du Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France (C2RMF, Paris) de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs.

Je suis très reconnaissante envers Monsieur Michel Bonifay, Directeur de Recherche CNRS au Centre Camille Jullian (Université Aix-Marseille) et Madame Anne-Simon, Restauratrice d'œuvres d'art, qui ont accepté d'examiner ce travail de thèse et de participer au jury.

Je remercie Caroline Tokarski, Maître de conférences à l'université Lille 1 d'avoir encadré ces travaux. Je te remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir « déléguée » une partie de cette thématique qui te tient à cœur. Tu m'as fait découvrir le potentiel de l'analyse protéomique dans le domaine de l'art et de l'archéologie. Tes conseils pour la mise en pratique des manips, l'utilisation des machines et l'interprétation des résultats m'ont été d'une grande aide et m'ont permis d'acquérir un savoir concernant une discipline qui m'était inconnue il y a 3 ans.

J'adresse également mes remerciements à Mme Geneviève Reille-Taillefert et Messieurs Dario Bernal-Casasola, Michel Bonifay et Nicolas Garnier pour leur collaboration,

sans oublier Mme Belén Hernandez pour ses précieux conseils concernant la spectrométrie Raman appliquée à l'analyse de protéines.

Un grand merci au personnel technique dont l'aide fût précieuse tout au long de cette thèse, en particulier à Myriam en charge du CCM Raman, Jean-Pierre pour avoir pris le temps de construire la chambre de vieillissement artificiel, Cyrille pour avoir réussi un sauvetage « in-extremis » de ma clé USB et aux ingénieurs du laboratoire de protéomique pour leur aide sur les différents appareils : Anne-So pour les manips Q-TOF, Geoffrey pour le TOF-TOF et Fabrice pour le FT (☺) et pour les bons moments passés ensemble au cours de ces années.

Enfin je remercie toutes les personnes, plus ou moins proches, scientifiques ou non qui ont été présentes tout au long de cette thèse.

Florence et Ophélie avec qui j'ai partagé un bureau pendant quelques mois et dont la présence a toujours été agréable ainsi que Nico, Marc et Van qui ont commencé leur thèse en même temps que moi. Sans oublier Kasia pour son soutien.

Les filles du C4 avec qui j'ai passé de bons moments. Pauline, que j'ai rencontrée au labo et avec qui j'ai noué une véritable amitié au fil du temps. Ton soutien, tant sur le plan professionnel que personnel, a été sans failles et je t'en remercie. Alex, Marie et Hélène pour leur écoute, leurs conseils scientifiques et pour les bons moments partagés lors des repas du midi et des pauses thé. Merci à Hélène de nous avoir fait profiter de ses talents culinaires et de nous avoir fait goûter beaucoup de bonnes choses ...

Les personnes qui travaillent (ou sont souvent de passage) au C4 que j'ai régulièrement croisé pendant ces années : Nadia, Hervé, Greg, Laurent, Marc, Bertrand ...

Bonne continuation à tous !

Mes amis, bien que vous ne compreniez pas grand-chose à ce que je fais, vous m'avez toujours entourée et votre présence m'a permis d'avoir une vie en dehors du labo. Je pense notamment à Sandrine et Jo ; Anne-So, Anaïs et Hélène ; Mull et Morgan ; Rikko et Léo ; Mamat et Foufie, Vince, Tof, Monch, Ben, Tang... sans oublier les amis rencontrés à Bologne qui, malgré la distance, m'ont soutenue et ont continué à prendre de mes nouvelles : mia sorella nera Tania, Angelà et Véro, Marta, Chloé, Saül et Amedeo. J'espère que je pourrai bientôt venir vous rendre visite.

Pour terminer, je remercie tout particulièrement celui qui est à mes côtés depuis quelques années et qui m'a supportée tout au long de cette période. Je voudrais tout simplement te dire que désormais nous avons toute la vie devant nous...

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	- 13 -
CHAPITRE 1: GENERALITES	- 27 -
1. INTRODUCTION	- 27 -
2. SPECTROMETRIE RAMAN.....	- 28 -
2.1. LE PHENOMENE DE DIFFUSION RAMAN	- 28 -
2.2. LA POLARISABILITE	- 30 -
2.3. REGLES DE SELECTION	- 31 -
2.4. APPAREILLAGE	- 32 -
2.4.1. <i>La source excitatrice</i>	- 32 -
2.4.2. <i>Le spectromètre</i>	- 33 -
2.4.3. <i>Le microspectromètre Raman</i>	- 34 -
2.5. ETUDE DES PROTEINES PAR MICRO-RAMAN.....	- 34 -
2.5.1. <i>Etat de l'art</i>	- 34 -
2.5.2. <i>Application à l'analyse d'échantillons du Patrimoine Culturel</i>	- 38 -
3. SPECTROMETRIE DE MASSE ET ANALYSE PROTEOMIQUE.....	- 39 -
3.1. LES SPECTROMETRES DE MASSE UTILISES AU LABORATOIRE.....	- 39 -
3.1.1. <i>MALDI-TOF-TOF</i>	- 39 -
3.1.2. <i>NanoLC-nanoESI-Qq-TOF</i>	- 41 -
3.1.3. <i>NanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR</i>	- 47 -
3.2. LA PROTEOMIQUE.....	- 50 -
3.2.1. <i>Définition</i>	- 50 -
3.2.2. <i>La stratégie 'bottom-up'</i>	- 52 -
3.2.3. <i>Application à l'analyse d'échantillons du Patrimoine Culturel</i>	- 55 -
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>- 57 -</u>
ANNEXE.....	- 62 -
CHAPITRE 2: LE DEVENIR DES PROTEINES DANS LES LIANTS DE PEINTURE : ETUDE SPECTROSCOPIQUE ET PROTEOMIQUE.....	- 69 -
1. INTRODUCTION	- 69 -

1.1.	HISTOIRE ET EVOLUTION DE LA PEINTURE MURALE EN OCCIDENT	- 69 -
1.2.	L'ETUDE SCIENTIFIQUE DES PEINTURES MURALES.....	- 71 -
1.3.	CAS PARTICULIER DES LIANTS PROTEIQUES.....	- 72 -
2.	SYSTEMES MODELES ETUDIES	- 75 -
3.	CARACTERISATION DES COMPOSES UTILISES POUR LA FORMULATION DES PEINTURES MODELES	- 77 -
3.1.	LE BLANC DE PLOMB	- 77 -
3.2.	LE LYSOZYME.....	- 81 -
3.2.1.	<i>Caractérisation par micro-Raman.....</i>	- 81 -
3.2.2.	<i>Etude protéomique.....</i>	- 85 -
3.3.	L'HUILE DE LIN	- 89 -
4.	ETUDE DES PEINTURES MODELES.....	- 90 -
4.1.	PEINTURE MODELE BLANC DE PLOMB-LYSOZYME.....	- 90 -
4.1.1.	<i>Etude structurale par micro-Raman.....</i>	- 90 -
4.1.2.	<i>Analyse protéomique: identification de modifications chimiques</i>	- 94 -
4.2.	PEINTURE MODELE BLANC DE PLOMB-LYSOZYME-HUILE DE LIN	- 95 -
4.2.1.	<i>Etude structurale par micro-Raman.....</i>	- 95 -
4.2.2.	<i>Analyse protéomique: identification de modifications chimiques</i>	- 100 -
5.	EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR LES PEINTURES MODELES.....	- 104 -
5.1.	VIEILLISSEMENT ARTIFICIEL	- 104 -
5.1.1.	<i>Etude par micro-Raman</i>	- 104 -
5.1.2.	<i>Analyse protéomique</i>	- 108 -
5.2.	VIEILLISSEMENT NATUREL	- 110 -
5.2.1.	<i>Etude par micro-Raman</i>	- 110 -
5.2.2.	<i>Analyse protéomique</i>	- 112 -
6.	DISCUSSION.....	- 116 -
6.1.	PEINTURES NON-VIEILLIES.....	- 116 -
6.2.	MODIFICATIONS CHIMIQUES INDUITES PAR LA PRESENCE D'HUILE DE LIN DANS LA PEINTURE NON-VIEILLIE.....	- 117 -
6.3.	EFFET DU VIEILLISSEMENT ARTIFICIEL.....	- 119 -
6.4.	EFFET DU VIEILLISSEMENT NATUREL	- 122 -
7.	CONCLUSION	- 123 -

<u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	- 125 -
ANNEXES	- 131 -

CHAPITRE 3: IDENTIFICATION DE L'ESPECE D'ORIGINE DES COLLES ANIMALES PAR PROTEOMIQUE..... - 141 -

1. INTRODUCTION	- 141 -
1.1. LES DIFFERENTES COLLES ANIMALES ET LEUR UTILISATION	- 141 -
1.2. L'ANALYSE DES COLLES ANIMALES DANS LES ECHANTILLONS DU PATRIMOINE CULTUREL	- 142 -
1.2.1. <i>Les techniques de détection in situ</i>	- 142 -
1.2.2. <i>Les techniques chromatographiques</i>	- 143 -
1.3. APPORT DE L'ANALYSE PROTEOMIQUE	- 144 -
2. DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE SUR DES ECHANTILLONS DE REFERENCE-	145 -
2.1. PRESENTATION DES ECHANTILLONS	- 145 -
2.2. ANALYSE PAR MALDI-TOF-TOF	- 146 -
2.3. ANALYSE PAR NANOLC-NANOESI-QH-FT-ICR	- 148 -
2.3.1. <i>Echantillons d'origine bovine</i>	- 148 -
2.3.2. <i>Echantillon de colle de peau de lapin</i>	- 152 -
2.3.3. <i>Echantillon de colle de poisson</i>	- 153 -
3. AUTHENTIFICATION D'ECHANTILLONS DE COLLE ANIMALE PROVENANT DE DIVERS FOURNISSEURS	- 154 -
3.1. PRESENTATION DES ECHANTILLONS	- 154 -
3.2. MARQUEURS PEPTIDIQUES IDENTIFIES.....	- 155 -
4. ANALYSE DE PEINTURES MODELES	- 159 -
4.1. STRATEGIE ANALYTIQUE	- 159 -
4.2. RESULTATS	- 160 -
4.2.1. <i>Peintures modèles avec de la colle d'origine bovine</i>	- 160 -
4.2.2. <i>Peinture modèle liée avec de la colle de peau de lapin</i>	- 161 -
4.2.3. <i>Peinture modèle liée avec de la colle de poisson</i>	- 161 -
5. ANALYSE D'UNE DORURE DU XVIII ^{EME} SIECLE	- 162 -
5.1. TECHNIQUES DE LA DORURE.....	- 162 -

5.2.	DESCRIPTION DE L'ECHANTILLON.....	- 163 -
5.3.	ANALYSE SPECTROSCOPIQUE	- 164 -
5.4.	ANALYSE PROTEOMIQUE.....	- 166 -
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>		- 172 -
ANNEXES		- 175 -
CHAPITRE 4: DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE POUR L'IDENTIFICATION DE RESIDUS DE PROTEINES DANS LES AMPHORES PAR PROTEOMIQUE		- 195 -
1.	INTRODUCTION	- 195 -
1.1.	LES AMPHORES: GENERALITES	- 195 -
1.2.	L'ANALYSE DE RESIDUS ORGANIQUES ARCHEOLOGIQUES	- 197 -
1.2.1.	<i>Le concept de bio-marqueur archéologique.....</i>	<i>- 198 -</i>
1.2.2.	<i>Les différentes formes de résidus organiques.....</i>	<i>- 199 -</i>
1.2.3.	<i>Les techniques d'analyse basées sur la spectrométrie de masse.....</i>	<i>- 200 -</i>
1.3.	LES BIO-MARQUEURS RELATIFS AUX PRODUITS MARINS.....	- 201 -
1.3.1.	<i>Bio-marqueurs existants.....</i>	<i>- 201 -</i>
1.3.2.	<i>Marqueurs peptidiques</i>	<i>- 202 -</i>
2.	DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE SUR DES ECHANTILLONS DE POISSON ...	- 203 -
2.1.	EXTRACTION PROTEIQUE	- 203 -
2.1.1.	<i>Conditions d'extraction évaluées.....</i>	<i>- 203 -</i>
2.1.2.	<i>Extraction du matériel protéique de l'anchois.....</i>	<i>- 203 -</i>
2.1.3.	<i>Extraction du matériel protéique de la bonite.....</i>	<i>- 206 -</i>
2.2.	PEPTIDES SPECIFIQUES ET DISTINCTION ENTRE LES ESPECES	- 207 -
3.	APPLICATION DE LA METHODOLOGIE SUR DES CERAMIQUES PREALABLEMENT IMPREGNEES DE CHAIR DE POISSON	- 214 -
3.1.	CERAMIQUE IMPREGNEE D'UNE ESPECE DE POISSON	- 214 -
3.2.	CERAMIQUE IMPREGNEE D'UN MELANGE D'ESPECES DE POISSON	- 218 -
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>		- 223 -
ANNEXES		- 225 -
CONCLUSION GENERALE		- 253 -

MATERIEL & METHODES	- 259 -
1. PREPARATION D'ECHANTILLON	- 259 -
1.1. FORMULATION DE PEINTURES MODELES	- 259 -
1.2. PREPARATION DE CERAMIQUES IMPREGNEES.....	- 260 -
2. VIEILLISSEMENT DES ECHANTILLONS DE PEINTURE.....	- 260 -
2.1. VIEILLISSEMENT ARTIFICIEL	- 260 -
2.2. VIEILLISSEMENT NATUREL	- 261 -
3. ANALYSE PROTEOMIQUE.....	- 261 -
3.1. EXTRACTION PROTEIQUE	- 261 -
3.1.1. Echantillons de peinture et de dorure	- 261 -
3.1.2. Echantillons de poisson et céramiques imprégnées.....	- 262 -
3.2. DESSALAGE.....	- 262 -
3.2.1. Dessalage par dialyse	- 262 -
3.2.2. Dessalage sur zip tip C18.....	- 263 -
3.3. HYDROLYSE ENZYMATIQUE EN SOLUTION.....	- 263 -
3.4. ANALYSES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.....	- 264 -
3.4.1. Analyse MALDI-TOF-TOF	- 264 -
3.4.2. Analyse nanoLC, nano ESI-Qq-TOF	- 264 -
3.4.3. Analyse nano LC, nano ESI-Qh-FT-ICR.....	- 265 -
4. RETRAITEMENT DE DONNEES A L'AIDE D'OUTILS BIOINFORMATIQUES	- 267 -
4.1. INTERROGATION DE BANQUES DE DONNEES PROTEOMIQUES	- 267 -
4.2. RECHERCHE DE PEPTIDES SPECIFIQUES.....	- 267 -
4.2.1. BLASTp	- 267 -
4.2.2. Développement d'un programme interne au laboratoire basé sur Biopython... -	268 -
5. ANALYSES MICRO-RAMAN.....	- 269 -

Introduction Générale

Introduction générale

Le mot patrimoine vient du latin *patrimonium*. A l'origine, il désigne l'héritage que l'on tient de son père et que l'on transmet à ses enfants, il a alors un sens de bien individuel. La notion de patrimoine dans son acceptation de bien collectif peut se définir comme l'ensemble des richesses d'ordre culturel – matérielles et immatérielles – appartenant à une communauté, héritage du passé ou témoins du monde actuel. Le patrimoine est aussi bien naturel que culturel. Il est considéré comme indispensable à l'identité et à la pérennité d'une communauté donnée et comme étant le résultat de son talent. A ce titre, il est reconnu comme digne d'être sauvegardé et mis en valeur afin d'être partagé par tous. Ainsi, le patrimoine est un héritage légué par les générations qui nous ont précédés et que nous devons transmettre aux générations futures.

L'idée d'un patrimoine inaccessibles appartenant à tous les citoyens d'une communauté qui se trouveraient lésés si ce dernier disparaissait remonte au moins à l'Antiquité. Le premier « relevé des monuments historiques » est réalisé en 29 avant J.C. par Philon de Byzance qui inventorie les sept merveilles du monde antique. L'étude et la recherche des vestiges patrimoniaux français (mobiliers ou immobiliers) commencent dès le 16^{ème} siècle mais c'est alors le fait d'une élite restreinte, le plus souvent aristocratique, qui n'a pas pour but de faire partager cet héritage au plus grand nombre mais plutôt d'alimenter ses collections privées. Néanmoins, au 18^{ème} siècle, Louis XVI ordonne la restauration et la mise en valeur des Arènes de Nîmes ce qui implique déjà l'idée de sauvegarde d'un héritage architectural commun.

Aujourd'hui, la notion de patrimoine, d'abord cantonnée à la conservation de monuments et d'objets mobiliers, a considérablement évolué et continue de s'étendre. Elle est devenue immense: patrimoine archéologique, industriel, urbain, rural, maritime, littéraire, cinématographique, photographique, culinaire, vestimentaire. Les critères de sélection ne se font plus seulement d'un point de vue esthétique. Des immeubles on passe aux meubles et du matériel à l'immatériel (rites, savoir-faire, langues régionales). Tout ce qui témoigne du passé et permet de comprendre le présent mérite d'être protégé et enrichi et d'être transmis aux

générations futures. Le patrimoine est désormais lié aussi à l'écologie, à des sites et des espaces naturels.

La conservation du patrimoine culturel historique et artistique a connu un véritable essor au cours du siècle dernier grâce aux découvertes effectuées dans le domaine de la chimie, notamment la découverte des rayons X en 1895 par le physicien allemand W. Röntgen. Les premières tentatives d'analyse technique de peintures par les rayons X ont eu lieu au musée du Louvre à la fin des années 1920. A cette époque, il y a prise de conscience de l'intérêt apporté par une expertise scientifique des œuvres et des laboratoires sont créés au sein de nombreux musées. Par exemple, le laboratoire de recherche du *British Museum* de Londres fût fondé en 1920 avec la nomination du Dr Alexander Scott en tant que premier scientifique. En France, c'est en 1932 que le laboratoire du département des peintures du musée du Louvre a été créé grâce au mécénat des argentins F. Perez et C. Mainini. Développé par Magdeleine Hours pendant plus de quarante ans, il est devenu Laboratoire de Recherche des Musées de France en 1968. En Italie, l'Institut Supérieur pour la Conservation et la Restauration est fondé en 1939 sur proposition de Giulio Carlo Argan et Cesare Brandi afin de répondre à la nécessité d'établir une activité de restauration basée sur des études scientifiques et d'uniformiser les méthodes d'intervention aussi bien sur les œuvres d'art que sur les biens archéologiques.

C'est dans le contexte d'un intérêt croissant pour la protection et la préservation du patrimoine culturel qu'en 1956, lors de la 9^{ème} conférence générale de l'UNESCO à New Delhi, la décision est prise de fonder le Centre International d'Etudes pour la Conservation et la Restauration des Biens Culturels. Sur invitation du gouvernement italien, l'organisation s'installe à Rome en 1959, il s'agit de la seule institution du genre à bénéficier d'un mandat à l'échelle mondiale ayant pour objectif la promotion de la conservation du patrimoine culturel, à la fois mobilier et immobilier, sous toutes ses formes. Harrold Plenderleith, conservateur du laboratoire de recherche du *British Museum* à Londres pendant de longues années, en devient le premier directeur. Ses membres sont des états indépendants, dont le nombre dépasse actuellement les 129, ayant déclaré leur adhésion à l'organisation. La longue appellation du Centre fait qu'on se réfère plutôt durant les premières années de son existence au « Centre de Rome » ou au « Centre international de conservation ». En 1978, l'abréviation ICCROM est inventée et dès lors adoptée. Une nouvelle discipline, la science de la conservation, est apparue dans les années 1960.

La science de la conservation est donc l'étude scientifique des biens du Patrimoine Culturel. Les sciences jouent un rôle clé en ce qui concerne la conservation de notre patrimoine culturel puisque ce sont elles qui permettent d'identifier les matériaux et donc les techniques jadis utilisés par les artistes, de comprendre les mécanismes naturels d'altération et de destruction ; ce sont elles enfin qui aident à la sauvegarde et à la restauration des œuvres, des monuments, des restes du passé ¹.

Il ne faut pas oublier que les 'échantillons' du patrimoine culturel sont des biens uniques dotés d'une valeur inestimable. Ainsi, l'examen scientifique ne doit en aucun cas causer la dégradation de l'échantillon. Les techniques analytiques en science de la conservation doivent donc être non-destructives ou micro-destructives. L'emploi de méthodes non-destructives permet d'obtenir des informations analytiques sans occasionner le moindre dégât sur l'objet alors que les techniques micro-destructives ne provoquent pas de dégâts visibles, l'échantillon reste donc intact d'un point de vue esthétique ². Par conséquent, les méthodes de micro-analyses, telles que les micro-spectrométries infrarouge et Raman offrant l'avantage d'être non-invasives, non-destructives et permettant l'étude d'échantillons de petite taille, s'avèrent être parfaitement adaptées pour l'étude de biens du Patrimoine Culturel.

Les techniques de spectroscopie vibrationnelle permettent la caractérisation non seulement des structures moléculaires mais aussi des structures cristallines présentes dans l'échantillon, ce qui représente un avantage considérable lorsque l'on veut obtenir un maximum d'informations avec un nombre d'analyses minimum. La spectroscopie infrarouge a commencé à être appliquée à la conservation des biens du Patrimoine Culturel dans les années 1950, permettant l'analyse de composés habituellement employés dans les vernis protecteurs des peintures tels que les résines (mastic, dammar) ^{3,4} ou encore la cire punique ⁵. Toutefois, les premières analyses, effectuées à l'aide de spectromètres conventionnels, nécessitaient une préparation d'échantillon (nujol, pastilles de KBr...) rendant impossible l'utilisation de l'échantillon pour d'autres analyses. Le couplage du spectromètre IR avec un microscope et l'apparition de détecteurs plus sensibles a donc favorisé les analyses dans ce domaine. En effet, grâce au microscope l'analyse est réalisée sans prélèvement ni prétraitement de l'échantillon ce qui permet de le caractériser de manière non-destructive et de le réutiliser pour d'autres analyses. De manière générale, la spectroscopie infrarouge est utilisée pour la caractérisation de matériaux organiques (colorants, liants, résines...). La caractérisation de minéraux, ou autres substances inorganiques pour lesquelles les bandes

caractéristiques sont inférieures à 400 cm^{-1} est difficile à cause des limites imposées par les détecteurs qui ne permettent pas d'enregistrer le signal en dessous de 400 cm^{-1} .

Pour la spectrométrie Raman, c'est également le couplage avec la microscopie ^{6,7} qui a conduit à la multiplication des domaines d'application de cette technique au fil des années et a favorisé son emploi pour l'analyse de biens du Patrimoine Culturel. En particulier, les premières analyses par micro-Raman ont été réalisées dans les années 1980 et concernaient l'identification de pigments ⁸⁻¹³. Suite à ces travaux, le nombre de publications relatives à ce domaine d'application n'a cessé de croître. A tel point que, lors du 16^{ème} congrès international de spectroscopie Raman en 1998, une session a été réservée à l'application de la spectroscopie Raman dans le domaine de l'art et l'archéologie. Quelques années plus tard, en novembre 2001, le *British Museum* de Londres a organisé une journée dédiée à l'utilisation de la spectroscopie Raman dans l'art et l'archéologie. Suite à cette journée a été créée la conférence internationale sur l'application de la spectroscopie Raman dans l'art et l'archéologie qui s'est déroulée pour la première fois à Gand (Belgique) en 2003.

Toutefois, en ce qui concerne l'identification des matériaux organiques, l'utilisation de techniques spectroscopiques, générant des informations d'ordre structural, ne permet pas de différencier deux substances organiques dont la composition chimique est très proche. De plus, si la quantité de matière organique dans l'échantillon est très faible, ce qui est courant dans les échantillons du patrimoine culturel qui sont dans un état de dégradation avancé, elle sera difficilement détectée. A cause de ces limites, d'autres techniques plus appropriées à l'analyse de molécules organiques ont été développées. De nos jours, ce sont les techniques chromatographiques, et plus particulièrement la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), qui jouissent de la plus grande popularité en ce qui concerne l'analyse des matériaux organiques dans les échantillons du patrimoine culturel. Parmi ces matériaux organiques, les protéines, qui sont des édifices moléculaires complexes, sont fréquemment retrouvées. Toutefois, en ce qui concerne l'analyse de ces biomolécules, les limites de la GC-MS commencent à être atteintes. En effet, le principe de cette technique nécessite l'hydrolyse totale des protéines en acides aminés ce qui empêche l'accession à certaines informations. Par exemple, les modifications chimiques apparaissant sur les protéines suite à l'interaction avec d'autres composés ne peuvent pas être identifiées par GC-MS. L'analyse par GC-MS entraîne donc une perte d'information indispensable à la compréhension des mécanismes de dégradation des protéines. Aussi, les informations relatives à l'origine de la protéine ne peuvent être obtenues.

La protéomique, une discipline exclusivement dédiée à l'étude des protéines, est apparue dans les années 1990. En 2002, lors de la 7^{ème} conférence internationale intitulée « Analyses non destructives et microanalyses pour la conservation du patrimoine culturel et environnemental » qui s'est déroulée à Anvers (Belgique), Tokarski et al. ont montré qu'il était possible d'identifier les protéines présentes dans les échantillons de peinture d'Art en utilisant l'analyse protéomique ¹⁴. L'approche protéomique peut être appliquée sur tout type d'échantillon à partir du moment où les protéines qu'il contient en sont extraites. Partant de ce constat, différentes méthodes d'extraction ont été testées afin d'extraire le matériel protéique piégé dans les peintures. Une fois les conditions d'extraction optimales définies, une analyse protéomique classique comprenant hydrolyse enzymatique et analyse par spectrométrie de masse a été effectuée. Enfin, les protéines ont été identifiées à l'aide d'outils bioinformatique. Cette méthodologie a été appliquée avec succès sur deux échantillons de peinture de la Renaissance, ce qui a permis d'identifier la nature du liant protéique et ainsi de révéler la technique utilisée pour l'exécution de ces œuvres ¹⁵. Ces résultats ont montré le potentiel de l'analyse protéomique dans le domaine de la science de la conservation et d'autres travaux basés sur ces premiers résultats ont ensuite été publiés ^{16, 17}. L'approche protéomique a ensuite été appliquée sur des céramiques archéologiques, montrant ainsi que le champ d'application de cette discipline ne se limite pas aux œuvres d'art et que la méthodologie convient également à d'autres types d'échantillons du patrimoine culturel ^{18, 19}.

L'analyse protéomique ne se limite pas à la seule identification des protéines. Elle permet aussi leur quantification mais également l'identification et la localisation de leurs modifications post-traductionnelles ou chimiques, ce qui offre de nombreuses perspectives en ce qui concerne l'étude des protéines dans les échantillons du patrimoine culturel.

Cette thèse s'inscrit dans un cadre de recherche de conservation du patrimoine culturel. En particulier, nous nous sommes intéressés à l'étude des protéines dans divers types d'échantillons. Les travaux présentés dans ce manuscrit couvrent trois problématiques différentes.

Le premier chapitre intitulé « Généralités » explique brièvement en quoi l'analyse des protéines dans les échantillons du patrimoine artistique et archéologique représente un véritable challenge analytique. Les techniques employées dans ces travaux de thèse sont décrites ainsi que le principe de fonctionnement des différents spectromètres utilisés.

Le deuxième chapitre est consacré à l'étude des protéines dans les liants de peinture. Pour cela, des études sur des systèmes modèles simplifiés ont été entreprises et des outils de chimie analytique fournissant des informations complémentaires ont été utilisés : la spectrométrie Raman permettant une étude structurale globale du système et la spectrométrie de masse utilisé dans le cadre d'une approche protéomique pour l'identification des modifications chimiques apparaissant sur ces biomolécules. D'autre part, des travaux ont été menés pour montrer l'impact du vieillissement, naturel et artificiel, sur de tels systèmes modèles.

Le troisième chapitre est dédié à l'analyse des colles animales par approche protéomique. En particulier, le développement d'une méthode d'analyse basée sur la recherche de marqueurs peptidiques permettant l'identification de l'espèce d'origine de ces colles est décrit. Un exemple d'application sur un échantillon de dorure datant du 18^{ème} siècle est présenté.

Le quatrième chapitre propose une méthodologie permettant de révéler le contenu de céramiques archéologiques *via* l'analyse des résidus protéiques piégés dans ces céramiques. De nouveau, une approche protéomique a été employée. Plus particulièrement, nous présentons ici une méthodologie focalisée sur la recherche de marqueurs peptidiques de protéines de poisson. Le développement méthodologique a été effectué sur deux espèces de poisson : anchois et bonite, et ensuite appliquée sur des céramiques imprégnées avec de la chair de ces poissons afin de modéliser une céramique archéologique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Mohen, J. P. *Les sciences du patrimoine: identifier, conserver, restaurer*; Editions Odile Jacob, 1999.
- (2) Janssens, K. H. A.; Grieken, R. *Non-destructive microanalysis of cultural heritage materials*; Elsevier, 2004.
- (3) Feller, R. L. *Science* **1954**, *120*, 1069-1070.
- (4) Kléber, R.; Masschelein-Kleiner, L. *Bulletin de l'Institut royal du patrimoine artistique* **1964**, *7*, 196-218.
- (5) Kühn, H. *Studies in Conservation* **1960**, *5*, 71-81.
- (6) Delhay, M.; Dhamelincourt, P. *Journal of Raman Spectroscopy* **1975**, *3*, 33-43.
- (7) Dhamelincourt, P.; Wallart, F.; Leclercq, M.; Nguyen, A. T.; Landon, D. O. *Analytical Chemistry* **1979**, *51*, 414A-420A.
- (8) Guineau, B. In *Actes des 3èmes Rencontres internationales d'Archéologie et d'Histoire d'Antibes* A.P.D.C.A., Ed.: Vallebbonne 1983, pp 75-90.
- (9) Guineau, B. *Studies in Conservation* **1984**, *29*, 35-41.
- (10) GUINEAU, B. *Journal of Forensic Science* **1984**, *29*, 471-485.
- (11) Guineau, B. *Studies in conservation* **1984**, *29*, 35-41.
- (12) Guineau, B., Copenhague 1984; 1429-1433.
- (13) B. Guineau; C. Coupry; M.T. Gousset; J.P. Forgerit; J. Vezin *Scriptorium: revue internationale des études relatives aux manuscrits* **1986**, *40*, 157-171.
- (14) Tokarski, C.; Cren-Olive, C.; Martin, E.; Rolando, C., Antwerp, Belgium 2002.
- (15) Tokarski, C.; Martin, E.; Rolando, C.; Cren-Olivé, C. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 1494-1502.
- (16) Chambery, A.; Di Maro, A.; Sanges, C.; Severino, V.; Tarantino, M.; Lamberti, A.; Parente, A.; Arcari, P. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *395*, 2281-2291.
- (17) Fremout, W.; Dhaenens, M.; Saverwyns, S.; Sanyova, J.; Vandenabeele, P.; Deforce, D.; Moens, L. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *658*, 156-162.
- (18) Solazzo, C.; Rolando, C.; Tokarski, C. *Actualité Chimique* **2008**, *318*, 1-6.
- (19) Solazzo, C.; Fitzhugh, W. W.; Rolando, C.; Tokarski, C. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 4590-4597.

Chapitre 1: Généralités

CHAPITRE 1: GENERALITES

1.INTRODUCTION	- 27 -
2.SPECTROMETRIE RAMAN.....	- 28 -
2.1. LE PHÉNOMÈNE DE DIFFUSION RAMAN	- 28 -
2.2. LA POLARISABILITÉ	- 30 -
2.3. RÈGLES DE SÉLECTION	- 31 -
2.4. APPAREILLAGE	- 32 -
2.4.1. <i>La source excitatrice</i>	- 32 -
2.4.2. <i>Le spectromètre</i>	- 33 -
2.4.3. <i>Le microspectromètre Raman</i>	- 34 -
2.5. ETUDE DES PROTÉINES PAR MICRO-RAMAN.....	- 34 -
2.5.1. <i>Etat de l'art</i>	- 34 -
2.5.2. <i>Application à l'analyse d'échantillons du Patrimoine Culturel</i>	- 38 -
3.SPECTROMETRIE DE MASSE ET ANALYSE PROTEOMIQUE.....	- 39 -
3.1. LES SPECTROMÈTRES DE MASSE UTILISÉS AU LABORATOIRE.....	- 39 -
3.1.1. <i>MALDI-TOF-TOF</i>	- 39 -
3.1.2. <i>NanoLC-nanoESI-Qq-TOF</i>	- 41 -
3.1.3. <i>NanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR</i>	- 47 -
3.2. LA PROTÉOMIQUE.....	- 50 -
3.2.1. <i>Définition</i>	- 50 -
3.2.2. <i>La stratégie 'bottom-up'</i>	- 52 -
3.2.3. <i>Application à l'analyse d'échantillons du Patrimoine Culturel</i>	- 55 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 57 -
ANNEXE.....	- 62 -

LISTE DES TABLES ET FIGURES

TABLE 1-1 : CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTS LASERS DISPONIBLES AU LABORATOIRE	- 33 -
FIGURE 1-1 : PRINCIPE DE LA DIFFUSION RAMAN	- 29 -
FIGURE 1-2 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UNE MICROSONDE RAMAN	- 34 -
FIGURE 1-3 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UNE PROTÉINE.....	- 35 -
FIGURE 1-4 : PRINCIPE D'UN RÉFLECTEUR ÉLECTROSTATIQUE	- 41 -
FIGURE 1-5 : SYSTÈME NANO-CHROMATOGRAPHIQUE LIQUIDE AVEC PRÉ-COLONNE.....	- 42 -
FIGURE 1-6 : PRINCIPE DE L'IONISATION ÉLECTROSPRAY. A : SCHÉMA D'UNE SOURCE ÉLECTROSPRAY	- 44 -
FIGURE 1-7 : ANALYSEUR QUADRIPOLAIRE	- 45 -
FIGURE 1-8 : DIAGRAMME DE STABILITÉ D'UN QUADRIPOLE.....	- 46 -
FIGURE 1-9 : SCHÉMA D'UN ANALYSEUR HYDRIDE QQ-TOF (EXTRAIT DE LA PUBLICATION DE CHERNUSHEVICH ⁷⁶)....	- 47 -
FIGURE 1-10: SCHÉMA D'UNE CELLULE ICR CUBIQUE	- 48 -
FIGURE 1-11: SCHÉMA INTERNE DU SPECTROMÈTRE DE MASSE FT-ICR BRUKER DALTONICS 9,4 T	- 50 -
FIGURE 1-12 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES STRATÉGIES D'ANALYSE PROTÉOMIQUE 'TOP-DOWN' ET 'BOTTOM-UP' (ISSUE DE LA PUBLICATION DE CHAIT ⁹⁰)	- 51 -
FIGURE 1-13 : NOMENCLATURE DES IONS FORMÉS LORS DE LA FRAGMENTATION DE PEPTIDES.....	- 53 -

Chapitre 1: Généralités

1. Introduction

Depuis les temps les plus anciens, les artistes utilisent des substances naturelles pour réaliser leurs œuvres. En peinture, par exemple, les pigments sont en général des matériaux d'origine minérale. A l'opposé, les liants et vernis sont souvent des matériaux organiques. Les liants les plus utilisés sont à base de protéines (œuf, colle animale, caséine du lait) ou d'huile (huile de lin, huile d'œillette...) et dans certains cas de la gomme végétale telle que la gomme arabique était employée. Les vernis protecteurs sont quant à eux fabriqués à partir de résines naturelles comme par exemple le dammar, le mastic, la sandaraque.

Le choix des matériaux dépend de la technique utilisée par l'artiste mais peut être également relié à l'époque ou la situation géographique. Les différents constituants d'une peinture peuvent être identifiés grâce à des techniques d'analyse chimique ce qui permet d'enrichir le savoir des Historiens de l'Art et fournit des informations primordiales quant au comportement à adopter pour la conservation et la restauration des œuvres. Toutefois, les œuvres d'art étant des biens d'une valeur inestimable, l'analyse chimique doit être de préférence non destructive ou alors micro-destructive, ce qui signifie que le prélèvement disponible pour l'analyse est de taille tellement infime que l'œuvre n'est pas dénaturée d'un point de vue esthétique. Ainsi, depuis des décennies, des progrès constants sont réalisés dans le domaine de la chimie analytique afin de proposer des techniques qui soient performantes et qui respectent ces critères.

L'analyse des matériaux protéiques dans les œuvres d'art a suscité un grand intérêt au cours des dernières années. En effet, ces biomolécules abondamment utilisées en peinture pour jouer le rôle de liant sont beaucoup plus complexes, d'un point de vue structural, que les autres molécules organiques fréquemment identifiées dans ce type d'échantillon. De plus, dans les peintures, les protéines sont soumises à des processus de dégradation pouvant être dus soit à des réactions avec les autres composés de la peinture (pigment, huile, vernis...) soit naturels (lumière, humidité, température, polluants...). Enfin, la taille des prélèvements fournis pour l'étude étant vraiment infime, les quantités de protéines disponibles pour

l'analyse sont très limitées. L'identification des protéines dans les objets d'art ainsi que la compréhension des mécanismes d'interaction et de dégradation associés à ces molécules constitue donc un véritable challenge d'un point de vue analytique.

Dans le domaine de l'archéologie, l'analyse de protéines peut également être considérée comme un défi analytique à relever. En effet, des traces de matière organique peuvent être retrouvées dans les céramiques archéologiques pouvant ainsi conduire à l'identification de ce qu'elles transportaient et ainsi fournir des informations sur le mode de vie des civilisations anciennes et retracer les voies des échanges commerciaux. Toutefois, dans ce type d'échantillon, les molécules organiques se trouvent dans un état de dégradation avancé à cause de l'enfouissement sous terre et du lessivage auxquelles les céramiques ont été soumises. En général, les molécules hydrophobiques telles que les lipides sont moins sensibles à ces conditions de conservation drastiques que les protéines qui ont tendance à se dénaturer et sont souvent présentes sous forme de résidus c'est à dire à l'état de fragments (peptides ou acides aminés) et par conséquent plus difficiles à identifier.

Ces travaux de thèse traitent de différentes problématiques liées à l'analyse des protéines dans les échantillons du patrimoine culturel (interaction avec d'autres composés, identification de leurs modifications chimiques ou de leur espèce d'origine). Pour cela nous avons utilisé deux techniques principales. D'une part la spectroscopie vibrationnelle, une technique d'analyse apportant des informations structurales et permettant de rendre compte des changements structuraux liés à l'environnement local des molécules d'investigation et d'autre part la protéomique, une discipline regroupant l'utilisation de diverses techniques et permettant une identification précise des protéines mais également leur quantification et l'identification de leurs modifications post-traductionnelles ou chimiques. Ainsi dans la suite de ce chapitre, ces deux techniques et plus précisément leur principe, les appareillages qui leur sont associés ainsi que les informations qu'elles peuvent fournir seront présentées.

2. Spectrométrie Raman

2.1. Le phénomène de diffusion Raman

Le phénomène physique intervenant en spectrométrie Raman est la diffusion inélastique d'une radiation monochromatique par une substance donnée. Le rayonnement émis par des molécules bombardées contient des photons de même fréquence que ceux du rayonnement incident mais aussi des photons de fréquences différentes. Cet effet est très faible,

approximativement 1 photon sur 1 million (0.0001%) sera émis avec une longueur d'onde légèrement différente de la longueur d'onde incidente. Ce phénomène, ensuite appelé d'après le nom de son découvreur, a été mis en évidence en 1928 par le physicien indien Sir C.V. Raman¹ et caractérise l'état vibrationnel d'une molécule polarisable. Il donne lieu à l'émission d'un rayonnement Stokes et d'un rayonnement anti-Stokes, décalés symétriquement par rapport à la longueur d'onde de la lumière excitatrice (voir figure 1-1). La mesure de l'intensité du rayonnement diffusé conduit à un spectre, véritable empreinte structurale du composé étudié, sur lequel la fréquence des bandes est liée aux énergies de vibration des liaisons atomiques de la matière éclairée.

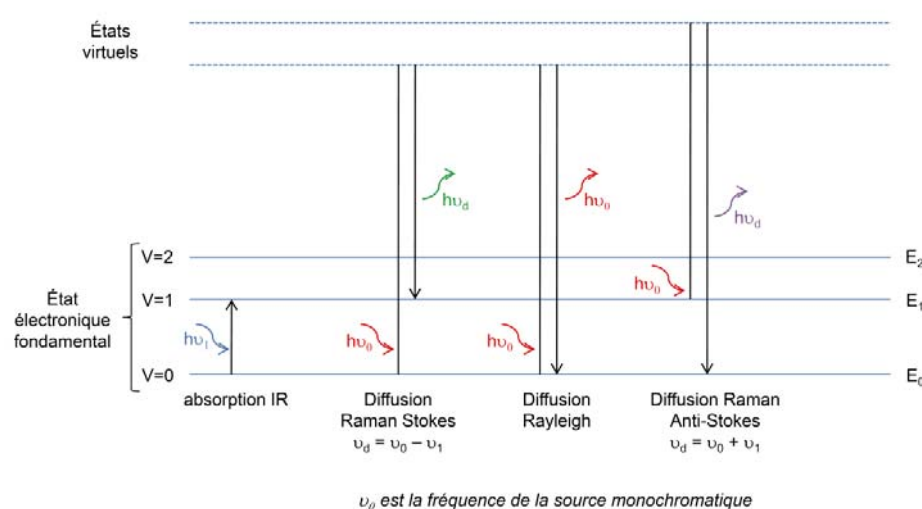


Figure 1-1: Principe de la diffusion Raman

Pour observer l'effet Raman, l'échantillon est éclairé par une lumière monochromatique, c'est-à-dire une radiation électromagnétique dont la fréquence est connue avec précision. Cette radiation, appelée radiation excitatrice, provient dans la majorité des cas d'une source laser. Les photons incidents sont en grande partie transmis, réfléchis ou absorbés et une fraction bien plus faible est diffusée dans toutes les directions de l'espace. Parmi les photons diffusés, la plupart ont la même fréquence (ν_0) que le rayonnement excitateur. Ce phénomène de diffusion élastique sans changement de fréquence est la diffusion Rayleigh. Pour moins d'un millième des photons diffusés, un changement de fréquence est observé et cela correspond à l'effet Raman.

Soit ν_d la fréquence des photons ainsi diffusés, deux cas peuvent se présenter :

- $\nu_d < \nu_0$: $\nu_d = \nu_0 - \nu_1$ c'est la diffusion Raman Stokes
- $\nu_d > \nu_0$: $\nu_d = \nu_0 + \nu_1$ c'est la diffusion Raman anti-Stokes

où ν_1 est la fréquence correspondant à l'énergie de vibration nécessaire à la transition de l'état fondamental $\nu = 0$ à l'état excité $\nu = 1$.

La diffusion Rayleigh est la plus probable, alors que les diffusions Stokes et anti-Stokes sont très peu favorisées. A une température donnée, la répartition en niveaux d'énergie d'un ensemble de molécules obéit à une distribution de Maxwell-Boltzmann et seules celles se trouvant dans un état excité pourront donner une transition anti-Stokes de type $\nu \rightarrow \nu - 1$. C'est donc pour cette raison que les raies anti-Stokes sont moins intenses que les raies Stokes. Le rapport des intensités des raies Stokes I_S et anti-Stokes I_{AS} est déterminé par la relation :

$$\frac{I_{AS}}{I_S} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_v}{\nu_0 - \nu_v} \right)^4 \exp\left(-\frac{h\nu_v}{kT}\right)$$

avec k constante de Boltzmann ($1,380658 \cdot 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$), T température thermodynamique, ν_0 fréquence de l'onde excitatrice.

Un spectre Raman représente l'intensité de la radiation diffusée inélastiquement, qui est proportionnelle au nombre de molécules diffusantes, en fonction du déplacement Raman exprimé en nombre d'ondes. Cette grandeur, proportionnelle à la fréquence, est définie par :

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}$$

où $\bar{\nu}$ est le nombre d'onde en cm^{-1} , λ la longueur d'onde en cm , ν la fréquence en s^{-1} et c la célérité de la lumière dans le vide soit $3 \cdot 10^{10} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$.

La fréquence d'une vibration est donnée par la relation $\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$ où k est la constante de force et μ la masse réduite (dans le cas d'une molécule diatomique $\mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B}$).

Le déplacement Raman est le nombre d'onde relatif ($\Delta\bar{\nu}$) correspondant à l'écart entre les nombres d'onde de la raie Raman ($\bar{\nu}_d$) et de la raie Rayleigh ($\bar{\nu}_0$). Cette grandeur est indépendante du choix de la radiation excitatrice et est caractéristique de la molécule. Néanmoins, pour que la diffusion Raman se produise il faut que les vibrations de la molécule soient actives en Raman c'est-à-dire que le champ électrique de la lumière excitatrice induise un changement de polarisabilité de la molécule.

2.2. La polarisabilité

Considérons une onde monochromatique de fréquence ν_0 incidente sur une molécule. Le champ électrique de cette onde s'écrit sous la forme:

$$E = E_0 \cdot \cos(2\pi\nu_0 t) \quad \text{où } E_0 \text{ est l'amplitude de l'onde.}$$

L'interaction entre le champ électrique et le nuage électronique de la molécule va créer un moment dipolaire induit P défini par :

$$P = \alpha E \quad (1)$$

où α , tenseur de polarisabilité moléculaire est représenté par une matrice d'ordre 3.

$$\alpha = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix}$$

La polarisabilité représente la facilité avec laquelle le nuage électronique de la molécule peut se déformer sous l'influence d'un champ électrique. Pour que la molécule puisse donner lieu à un effet Raman, la polarisabilité de la molécule doit être de la forme :

$$\alpha = \alpha_0 + (r - r_{eq}) \frac{\partial \alpha}{\partial r} \quad (2)$$

où α_0 est la polarisabilité de la molécule à la distance internucléaire d'équilibre r_{eq} , et r la distance internucléaire à tout instant.

Aussi :

$$r - r_{eq} = r_m \cos(2\pi\nu t) \quad (3)$$

où r_m est la séparation nucléaire maximale par rapport à la position d'équilibre et ν la fréquence de vibration de la molécule.

En substituant les équations (2) et (3) dans l'équation (1) et en appliquant la formule de trigonométrie $\cos(x).\cos(y) = \frac{1}{2} (\cos(x+y) + \cos(x-y))$, on obtient :

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos[2\pi(\nu_0 - \nu)t] + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos[2\pi(\nu_0 + \nu)t]$$

Dans cette expression, on retrouve les trois composantes de la lumière diffusée par une molécule ayant une transition vibrationnelle ν . Les termes en $\cos(2\pi\nu_0 t)$, $\cos[2\pi(\nu_0 - \nu)t]$ et $\cos[2\pi(\nu_0 + \nu)t]$ représentent respectivement les diffusions Rayleigh, Raman Stokes et Raman anti-Stokes. Il apparaît que la diffusion Rayleigh est indépendante de la vibration moléculaire.

2.3. Règles de sélection

La règle de sélection pour une vibration active en Raman est qu'il doit exister un changement de la polarisabilité dû à la vibration, c'est à dire que $\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \neq 0$ où Q est la coordonnée normale correspondant à la vibration. La polarisabilité α étant une matrice, la condition se ramène à ce que l'une au moins de ces composantes $\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q}$ (i et $j = x, y$ ou z) soit

non nulle. Ces conditions se visualisent aisément pour les molécules diatomiques mais deviennent très vite impossibles à estimer pour les molécules polyatomiques. C'est là que la théorie des groupes intervient. L'analyse vibrationnelle d'une molécule, à savoir dénombrement et activités des modes de vibration Raman et infrarouge, peut être effectuée entièrement à partir des tables de caractères. Une transition fondamentale sera active en Raman si le mode normal mis en jeu appartient à la même représentation irréductible que l'une au moins des composantes du tenseur de polarisabilité de la molécule (α_{ij}). La représentation irréductible pour la polarisabilité est la même que celle de l'un des termes quadratiques quelconque mettant en jeu les coordonnées cartésiennes x^2 , y^2 , z^2 , xy , yz et xz . Les représentations irréductibles associées à ces termes sont données dans les tables de caractères.

A partir de la théorie des groupes, il est aisé de montrer que si une molécule possède un centre de symétrie alors les vibrations qui sont actives en Raman seront interdites en infrarouge et *vice-versa*. Si une vibration ne change pas beaucoup la polarisabilité, alors la dérivée de la polarisabilité sera quasiment nulle, et l'intensité de la raie Raman sera faible. Des vibrations associées à des parties fortement polaires, comme l'élongation des liaisons O-H, sont habituellement faibles. Les centres fortement diffusants en Raman sont typiquement des entités moléculaires avec des nuages d'électrons très délocalisés, telles que par exemple les doubles liaisons carbone-carbone.

2.4. Appareillage

Un spectromètre Raman est équipé d'une source monochromatique permettant l'excitation de l'échantillon, d'un analyseur et d'un détecteur.

2.4.1. La source excitatrice

Le phénomène de diffusion Raman étant très faible, l'utilisation d'une source excitatrice monochromatique intense est requise. Les lasers, délivrant un flux de photons cohérents, sont les sources les plus appropriées pour les expériences Raman. Les lasers à gaz sont les plus fréquemment utilisés (argon, krypton, hélium-néon), en raison du grand nombre de longueurs d'onde accessibles avec une seule source. Le refroidissement à eau de ces lasers reste cependant une contrainte importante et il est plus avantageux de les remplacer par des lasers solides de meilleur rendement (laser à diode, laser Nd-YAG) mais ceux-ci n'offrent pas encore un choix aussi large de longueurs d'onde. On peut également utiliser des lasers pulsés pour les expériences de spectroscopie Raman résolue dans le temps.

Longueur d'onde (nm)	Nature du milieu excité	Zone d'émission spectrale	Source d'excitation
266	Nd-vanadate (doublé en fréquence par MBD)	UV	Diode laser
472,7	Ar ⁺	visible (bleu)	Décharge électrique
514,5	Ar ⁺	visible (vert)	Décharge électrique
632,8	He-Ne	visible (rouge)	Décharge électrique
785	Diode laser	proche infrarouge	
1064	Nd-YAG	infrarouge	Lampe flash, diode laser

Table 1-1: Caractéristiques des différents lasers disponibles au laboratoire

Le choix de la longueur d'onde d'excitation dépend fortement de l'échantillon à analyser. En particulier, lorsque la longueur d'onde d'excitation est proche de celle d'une transition électronique, le phénomène de fluorescence aura tendance à masquer le signal Raman beaucoup moins intense. Pour s'affranchir de la fluorescence on utilise en général un laser moins énergétique comme le laser Nd-YAG émettant dans l'infrarouge.

2.4.2. Le spectromètre

La lumière diffusée est envoyée sur le détecteur au moyen d'un double monochromateur. Si le détecteur est monocanal, le plus souvent un tube photomultiplicateur, le monochromateur est équipé d'un réseau de diffraction dont la rotation assure le défilement du spectre à analyser devant la fente de sortie du monochromateur. Si l'appareil est muni d'un détecteur multicanal (barrette de photodiodes ou CCD), tous les éléments spectraux qui composent le spectre arrivent simultanément sur le détecteur. Le gain apporté par la mesure simultanée des intensités de N éléments spectraux pendant le temps T est tel que le rapport signal sur bruit sur la mesure d'un élément spectral est \sqrt{N} fois meilleur qu'avec une installation monocanale. Toutefois, une installation multicanale doit comprendre avant la fente d'entrée du spectrographe un filtre pour éliminer le signal à la longueur d'onde de la radiation excitatrice qui sinon masquerait les faibles raies Raman. Pour obtenir une coupure raide, on utilise en général un double monochromateur soustractif comportant une fente intermédiaire large destinée à supprimer la radiation excitatrice et qui isole dans le spectre Raman une bande spectrale plus ou moins large selon les caractéristiques du montage. De plus en plus, pour améliorer la luminosité des spectrographes multicanaux on remplace le prémonochromateur soustractif par un filtre optique coupe-bande appelé filtre notch (notch signifiant réponse en créneau), obtenu par un procédé holographique pour les plus performants et qui a fait progresser considérablement les applications de la spectroscopie Raman ces dernières années.

2.4.3. Le microspectromètre Raman

La différence entre la micro-spectrométrie Raman (plus simplement appelée microsonde Raman) et la spectrométrie Raman conventionnelle est la focalisation du rayon lumineux incident sur l'échantillon à travers l'objectif d'un microscope. Les deux caractéristiques de ce montage microsonde Raman qui expliquent son efficacité sont l'éclairage local très intense et un très grand angle de collection de l'objectif.

L'objectif du microscope permet de focaliser la lumière excitatrice sur l'échantillon, le diamètre d de la tâche de focalisation est donné par l'expression : $d = \frac{1.22 \lambda}{ON}$ avec λ la longueur d'onde excitatrice et ON l'ouverture numérique qui est fonction de l'angle maximum de demi ouverture α et de l'angle de réfraction du milieu n ($ON = n \cdot \sin \alpha$).

Dans le cas d'un objectif x100 et d'une longueur d'onde excitatrice de 632.8 nm, le diamètre de la tâche de focalisation est de 0.86 μm . En général, le volume nécessaire à l'analyse par micro-Raman est fixé à 1 μm^3 .

L'analyse par micro-Raman ne nécessite pas de préparation d'échantillon et peut être réalisée sur un petit volume d'échantillon (1 μm^3) ce qui lui confère un caractère non-destructif. De plus, l'analyse par micro-Raman permet l'analyse de matériaux hétérogènes et de manière plus intéressante offre la possibilité de réaliser des cartographies permettant d'identifier et de localiser les différents composés de l'échantillon.

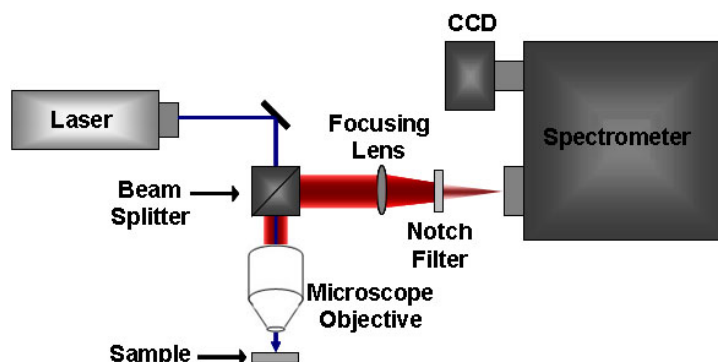


Figure 1-2: Représentation schématique d'une microsonde Raman
(source : <http://cnx.org/content/m34522/latest/>)

2.5. Etude des protéines par micro-Raman

2.5.1. Etat de l'art

Il y a une quarantaine d'années, le champ d'application de la spectrométrie Raman était encore très limité en raison de la faible sensibilité et de la lourdeur d'utilisation des

instruments disponibles. Restreinte aux laboratoires de recherche, cette technique était essentiellement réservée aux études fondamentales. Depuis une vingtaine d'années, la compacité, la sensibilité et la facilité d'utilisation des instruments n'ont cessé de s'améliorer grâce notamment à l'utilisation de détecteurs multicanaux performants, de filtres holographiques et à une informatisation poussée assurant une gestion automatisée de l'acquisition des données. Ces développements ont conduit à de nouvelles applications de la spectrométrie Raman dans des domaines tels que la biotechnologie, l'industrie pharmaceutique ou encore l'agro-alimentaire.

En particulier, dans le domaine de la biologie, l'étude des protéines, permettant de comprendre les processus biologiques d'une cellule par exemple, a suscité un grand intérêt². Ainsi, les informations fournies par spectroscopie Raman pour ces molécules, sont attribuées d'une part à la vibration de la chaîne polypeptidique et d'autre part à la vibration des chaînes latérales de la protéine^{3,4}.

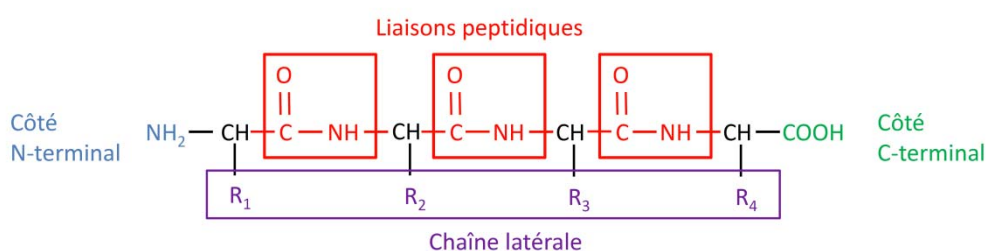


Figure 1-3: Représentation schématique d'une protéine

La chaîne polypeptidique se caractérise par la présence de liaisons amides (CO-NH) entre les différents acides aminés qui constituent la chaîne latérale de la protéine (voir figure 3). Les vibrations associées à la chaîne polypeptidique sont principalement reliées aux liaisons peptidiques. En Raman, sous excitation dans le domaine du visible, on distingue deux bandes dites amides : la bande amide I (à $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$) correspond principalement à la vibration d'élongation du groupement carbonyle du squelette peptidique ($\nu \text{ C=O}$) et la bande amide III (à $\sim 1250 \text{ cm}^{-1}$) plus complexe qui comprend la vibration de déformation δNH à laquelle s'ajoute une contribution de la vibration d'élongation νCN . Leurs fréquences reflètent la structure de la chaîne polypeptidique et sont indépendantes de la chaîne latérale de la protéine. Ainsi, les bandes amides I et III peuvent être utilisées pour déterminer la structure secondaire des protéines. Cependant, la bande amide I étant plus intense c'est souvent celle-ci qui est utilisée. Cette bande large et complexe peut être décomposée en plusieurs composantes dont la position est reliée aux différentes conformations de la protéine : hélices α , feuillets β ,

coudes et pelotes statistiques. En 1976, Lippert *et al.* ont été les premiers à introduire cette approche mais leurs études se sont limitées à des protéines en solution aqueuses. Plus tard, Williams et Dunker ont appliqué cette approche sur 17 protéines différentes. Dans la majorité des cas, l'erreur entre la structure secondaire estimée par diffraction de rayons X et celle déduite de la décomposition de la bande amide I des spectres Raman était inférieure à 6%^{5,6}. Ainsi, ces spectres ont été définis comme spectres de référence et ont été utilisés pour décomposer la bande amide I de protéines de structure secondaire inconnue. Cette méthode a ensuite été modifiée et améliorée à plusieurs reprises⁷⁻¹⁰. En général, la décomposition de la bande amide I est employée pour mettre en évidence les conditions responsables d'un changement de structure secondaire des protéines (solvant, température, pH ...).

Outre les vibrations des liaisons peptidiques, sur le spectre Raman d'une protéine des bandes dues à la vibration des acides aminés composant la chaîne latérale sont observées. Certains acides aminés ont donc un signal Raman qui leur est propre et qui fournit des informations sur leur environnement local. Les deux premiers marqueurs structuraux de la chaîne latérale d'une protéine ont été découverts dans les années 1970. Sugeta *et al.* ont établi la corrélation entre les fréquences des vibrations C-S et S-S et la conformation des ponts disulfures et des liaisons CC-S-S-CC^{11, 12}. A la même période, Siamwiza *et al.* ont montré que le doublet à 850-830 cm⁻¹ pouvait être utilisé comme marqueur du groupement phénol des tyrosines et que le rapport des intensités relatives $\frac{I_{850}}{I_{830}}$ était variable en fonction de l'environnement local¹³. Les fréquences des modes de vibration des résidus tryptophanes dans les protéines ont été établies dans les années 1980 par Takeushi et Harada¹⁴⁻¹⁶. En particulier, la bande à 780 cm⁻¹ et le doublet de Fermi à 1340-1360 cm⁻¹ peuvent être utilisés pour sonder l'environnement de ces résidus. Ainsi, plus le rapport des intensités relatives $\frac{I_{1360}}{I_{1340}}$ est grand, plus les résidus tryptophanes se trouvent dans un environnement hydrophobe¹⁴. Progressivement de nouveaux marqueurs structuraux des chaînes latérales ont été découverts caractérisant en particulier les acides aminés tryptophane¹⁴⁻¹⁹, tyrosine²⁰⁻²², phénylalanine²³, histidine^{19, 24} et cystéine²⁵.

Les études concernant les protéines ne se limitent pas au Raman visible et des variantes telles que le Raman de résonance UV ou le SERS (surface enhanced Raman scattering ou effet Raman exalté de surface en français) ont également été proposées. L'effet Raman exalté de surface (SERS) permet d'observer une amplification du signal Raman de molécules qui sont adsorbées sur des surfaces métalliques rendues rugueuses par diverses

méthodes (traitements électrochimiques, évaporation de métal sur un support...). Cet effet a été observé pour la première fois en 1974²⁶ mais la raison de l'exaltation du signal ne sera expliquée qu'en 1977^{27,28}. Il s'observe notamment pour des métaux ayant leur fréquence de résonance électromagnétique dans le visible, tels que l'argent, le cuivre et l'or. Le phénomène d'amplification a également été observé pour quelques autres métaux (Ni, Pt, Pd...) et même pour des semi-conducteurs. L'interprétation de l'exaltation du signal Raman met en jeu l'existence simultanée de phénomènes électromagnétique et chimique. Cette méthode qui combine la sensibilité de la fluorescence et la spécificité moléculaire de la spectroscopie Raman est donc bien adaptée à l'étude des molécules d'intérêt biologiques. Des travaux récents montrent que l'utilisation de substrats SERS à base de nanoparticules d'or ou d'argent permettent de détecter des molécules uniques, plaçant cette technique en concurrence directe avec la fluorescence^{29, 30}. Cette méthode s'est dernièrement illustrée comme nouvelle méthode de détection des protéines. Par exemple, après séparation des protéines sur gel d'électrophorèse, l'utilisation d'une solution colloïdale d'argent pour la coloration résulte en la formation d'agrégats d'argent permettant la détection des protéines par SERS^{31, 32}. Le Raman SERS permet également la détection d'interactions protéines-ligands et s'avère prometteur pour des applications dans le domaine médical³¹. Cependant, la difficulté liée à cette technique réside dans le choix et la préparation du substrat à utiliser. Différents substrats permettant d'obtenir l'effet SERS sont couramment employés : les électrodes métalliques, souvent des électrodes d'argent^{33, 34}, rendues rugueuses par réalisation de plusieurs cycles d'oxydation-réduction, les solutions colloïdales d'argent³⁵ préparées selon la méthode décrite par Lee et Meisel³⁶ et les dépôts d'ilots métalliques³⁷. Il faut donc trouver le substrat qui soit le mieux adapté à l'échantillon à analyser mais également le préparer avec le plus grand soin, ce qui fait du Raman SERS une technique beaucoup plus délicate à mettre en place que les techniques standards.

L'effet Raman est dit de résonance quand la longueur d'onde de la radiation excitatrice est voisine de celle d'une transition électronique de la molécule étudiée. Dans ce cas, l'effet Raman de certaines vibrations est fortement exalté et l'intensité des raies peut être multipliée par un facteur allant jusqu'à 10^6 . Dans le cas des protéines, une excitation avec un laser émettant dans l'UV exalte le signal des acides aminés aromatiques ce qui permet de sonder l'environnement de ces entités en évitant toute interférence avec le reste de la protéine environnante. De plus, cette méthode d'une grande sensibilité est tout à fait appropriée pour l'étude de solutions très diluées et permet d'obtenir des spectres relativement simples et spécifiques du chromophore. L'effet Raman de résonance est particulièrement utilisé pour

l'étude de molécules biologiques^{22, 38-41}. Par exemple, pour les protéines, quand la longueur d'onde d'excitation est située dans l'UV (200-250 nm), la bande amide II trop faible pour être observée en Raman visible peut-être identifiée. Cette bande est également corrélée à la structure secondaire des protéines et il a été montré que plus elle était intense, plus le nombre d'hélices α dans la protéine était élevé⁴². Néanmoins, l'utilisation d'une source excitatrice émettant dans l'UV n'est pas adaptée à tous les types d'échantillons et il faut d'abord s'assurer que ce rayonnement très énergétique ne va pas endommager l'échantillon.

2.5.2. Application à l'analyse d'échantillons du Patrimoine Culturel

Dans le domaine de l'analyse de matériaux du Patrimoine Culturel, la spectrométrie Raman s'est rapidement illustrée comme technique de choix pour l'identification de pigments grâce notamment au développement de la microsonde Raman^{43, 44}. Cette technique est couramment appliquée sur différents types d'objets tels que manuscrits^{45, 46}, céramiques⁴⁷, pierres précieuses⁴⁸, polychromies⁴⁹, peintures⁵⁰⁻⁵²... et de nos jours son utilisation n'est pas uniquement réduite à l'identification de pigments. Dans le domaine de la peinture, la microspectrométrie Raman est utilisée, par exemple, pour étudier l'effet du vieillissement sur les constituants de la peinture⁵³⁻⁵⁸. De plus, cette technique est intéressante pour l'étude de tels objets car elle permet également d'identifier les composés organiques qui sont généralement caractéristiques du liant employé^{59,60}. Cependant, c'est cette hétérogénéité qui est responsable de la complexité des peintures et la présence de composés aussi bien inorganiques qu'organiques peut engendrer des difficultés dans l'interprétation des spectres Raman. Ainsi, dans la majorité des cas, les différents constituants d'une peinture sont analysés de manière séparée. En ce qui concerne les liants protéiques, il a été montré récemment que l'analyse Raman suivie du traitement des données par des méthodes de chimiométrie conduisait à la différenciation des différents types de liants protéiques fréquemment employés en peinture c'est-à-dire l'œuf, les colles animales et la caséine du lait⁶¹. Suite à ce travail, des expériences ont été réalisées afin de montrer l'effet du vieillissement sur ce type de liant^{62, 63}. En revanche, jusqu'à présent, peu d'études basées sur l'analyse simultanée pigments-protéines ont été réalisées⁶⁴⁻⁶⁶. Or, l'analyse de tels systèmes est très importante pour la compréhension des mécanismes d'interaction et de dégradation.

Dans ces travaux de thèse, la spectrométrie Raman a été utilisée sur des échantillons de peinture modèle afin de caractériser le pigment et la protéine et d'évaluer l'effet du vieillissement sur ce système. Nous nous sommes limités à l'utilisation d'un spectromètre

micro-Raman classique avec une source excitatrice émettant dans le visible afin de privilégier le caractère non-destructif de l'examen scientifique.

3. Spectrométrie de masse et analyse protéomique

La spectrométrie de masse étant un outil indispensable à l'analyse protéomique, nous commencerons d'abord par décrire les différents appareils qui ont été utilisés dans ce travail de thèse.

3.1. Les spectromètres de masse utilisés au laboratoire

3.1.1. MALDI-TOF-TOF

3.1.1.1. La source MALDI

La désorption-ionisation laser assistée par matrice (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization en anglais), décrite à la fin des années 1980 par Karas et Hillenkamp d'une part ⁶⁷ et par Tanaka *et al.* d'autre part ⁶⁸, est une technique d'ionisation douce permettant l'analyse de biomolécules et de grosses molécules organiques qui tendent à se fragmenter lorsqu'elles sont ionisées par des méthodes plus conventionnelles.

La matrice, solide, est mise en solution, généralement dans un mélange d'eau ultra-pure et de solvant organique, puis cette solution matrice est mélangée à l'analyte (10⁴ molécules de matrice pour une molécule d'échantillon) et une gouttelette de ce mélange est déposée sur une plaque de dépôt. Ensuite, le solvant est évaporé et la matrice recristallise mais contient désormais des molécules d'analyte. L'échantillon et la matrice co-cristallisés sont irradiés par un faisceau laser dont la longueur d'onde est située dans la bande d'absorption de la matrice ce qui a pour effet de l'évaporer, entraînant avec elle l'échantillon en phase gazeuse par transfert d'énergie (phénomène de désorption). Dans cette phase gazeuse, les molécules de matrice ionisées transfèrent un proton aux molécules d'analyte. La matrice joue donc un double rôle: elle permet l'ionisation des molécules d'analyte tout en les protégeant de l'impact du laser. Les principales matrices utilisées en protéomique sont l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) et l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque (DHB) pour les peptides, l'acide sinapinique (SA) pour les protéines.

3.1.1.2. L'analyseur à temps de vol (TOF)

Le principe d'un analyseur à temps de vol (TOF), développé dans les années 1955⁶⁹, est de mesurer le temps de vol d'un ion, préalablement accéléré, au travers d'une zone libre de champ (tube de vol) avant d'atteindre le détecteur. En effet, quand une particule chargée est accélérée dans l'analyseur à temps de vol par la tension U , son énergie potentielle est transformée en énergie cinétique et on obtient l'équation suivante : $\frac{1}{2}mv^2 = zU$ (avec m la masse de la particule, v sa vitesse, z sa charge et U la tension d'accélération).

Or $v = \frac{d}{t}$ (avec d la distance de la zone libre de champ et t le temps de vol mesuré)

Par conséquent, on obtient : $zU = \frac{1}{2}m\left(\frac{d}{t}\right)^2$ d'où $\frac{m}{z} = 2U\left(\frac{t}{d}\right)^2$

Le rapport m/z (masse/charge) d'un ion est donc directement lié à son temps de vol.

Il existe deux modes d'analyse des ions : le mode linéaire et le mode réflectron. Dans le mode linéaire, les ions formés par irradiation laser sont expulsés de la source par paquets et accélérés vers le tube de vol par une différence de potentiel appliquée entre une électrode et la grille d'extraction conférant aux ions la même énergie cinétique. Ensuite, les ions entrent dans le tube de vol où ils sont séparés en fonction de leur vitesse acquise avant d'atteindre le détecteur à l'extrémité du tube de vol. L'analyseur en mode linéaire a une très bonne sensibilité mais est peu résolutif. Les facteurs principaux affectant la résolution du signal sont la distribution temporelle, la distribution spatiale et la distribution en énergie cinétique initiale des ions. Une manière d'améliorer la résolution en masse des analyseurs à temps de vol est d'employer un réflecteur électrostatique. Ce réflecteur, ou réflectron, est constitué d'une série d'anneaux ou grilles de potentiels croissants agissant comme un miroir électrostatique (figure 1-4). Le réflectron permet la refocalisation des ions de même rapport m/z mais possédant une dispersion en énergie cinétique. Ceci permet de synchroniser leur arrivée au détecteur. Pour cela, les ions sont ralentis, réfléchis et ré-accelérés par le réflecteur. Ainsi, la refocalisation des ions permet un gain en résolution mais diminue la sensibilité et introduit une limitation dans la gamme de masse.

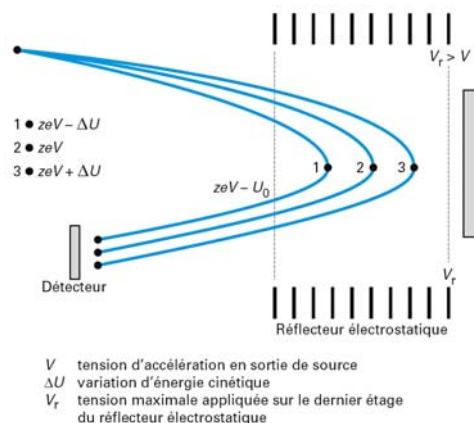


Figure 1-4: Principe d'un réflecteur électrostatique

(Source : <http://www.techniques-ingenieur.fr/>)

3.1.1.3. Le mode MS/MS

Le spectromètre MALDI-TOF-TOF offre la possibilité de réaliser des expériences de fragmentation permettant de procéder au séquençage d'un peptide ou d'identifier des modifications protéiques. Un ion précurseur, aussi appelé ion parent, est sélectionné pour être fragmenté dans la cellule de collision, située entre les deux analyseurs à temps de vol. Les collisions peuvent être réalisées avec un gaz inerte comme l'argon ou sans gaz. Après collision et fragmentation, les ions précurseurs restants et les ions fragments sont ré accéléérés par extraction pulsée et envoyés dans le deuxième tube de vol.

3.1.2. NanoLC-nanoESI-Qq-TOF

Le couplage en ligne de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse est devenu une technique de choix pour l'analyse de mélanges complexes de peptides et de protéines dans le domaine de la protéomique. Cet outil n'a cessé d'évoluer, notamment grâce au développement des sources d'ionisation à pression atmosphérique (ESI, APCI) à la fin des années 1980. Afin d'améliorer les seuils de détection en consommant le moins d'échantillon possible, les sources nano électrospray (nanoESI) ont été développées et le couplage en ligne adapté grâce à la nano chromatographie liquide.

3.1.2.1. La nano chromatographie liquide

La nano chromatographie liquide (nanoLC) a été développée à la fin des années 1980 par Karlsson et al.⁷⁰ par diminution du diamètre interne des colonnes. Elle présente trois

avantages majeurs comparée à la chromatographie liquide conventionnelle : l'augmentation de la sensibilité, la réduction de la consommation en échantillon et en solvant et la compatibilité avec les sources nanoESI. Les nanocolonnes classiquement utilisées en analyse protéomique ont un diamètre interne de 75 μm . Le corps est généralement constitué d'un capillaire en silice fondu de longueur comprise entre 5 et 25 cm au bout duquel est inséré un fritté. Plusieurs types de phases stationnaires existent, les plus couramment utilisées sont les phases inverses de type C4 ou C18. Les phases C4 avec des pores de 300 \AA sont dédiées à l'analyse de protéines entières tandis que les phases C18 avec des pores de 100 \AA sont privilégiées pour l'analyse de digests. Récemment, des colonnes C18 avec des pores de 300 \AA ont été développées et mises sur le marché favorisant l'analyse de mélanges possédant une gamme de masse étendue. Afin d'améliorer les performances de nanoséparation, un système de préconcentration vient compléter le système de séparation. Il a deux rôles majeurs : concentrer l'échantillon et le dessaler. Les colonnes de préconcentration sont courtes, 5 mm en général, et la phase est identique à celle de la colonne analytique. L'utilisation en ligne d'un système de préconcentration nécessite deux vannes d'injection et deux systèmes de pompes indépendants. L'injection de l'échantillon se déroule en trois étapes :

- L'échantillon est chargé dans la boucle d'injection : 1 μL d'échantillon est prélevé et complété à 10 μL avec un solvant ayant une faible force éluante (tampon aqueux).
- il est envoyé en tête de précolonne à l'aide du même solvant que lors de l'injection pour y être concentré et dessalé.
- Il est enfin désorbé par une élution en sens inverse (backflush) et envoyé sur la colonne analytique.

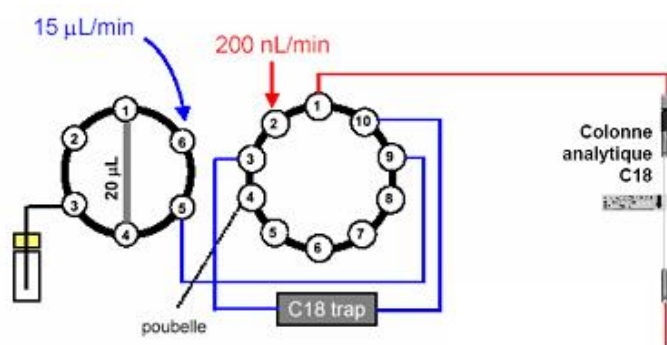


Figure 1-5: Système nano-chromatographique liquide avec pré-colonne

Les avancées technologiques réalisées en nano chromatographie liquide ont ainsi permis l'amélioration des couplages en ligne avec la spectrométrie de masse. Leur utilisation est devenue un outil indispensable à l'analyse protéomique.

3.1.2.2. La source nano électrospray

La méthode d'ionisation par électrospray est une technique d'ionisation décrite par Fenn *et al.* en 1984 ⁷¹. La source nano électrospray (nanoESI) est inspirée des sources électrospray et a été développée dans les années 1990 par Wilm et Mann ^{72, 73}. Deux types de sources nanoESI peuvent être décrites :

- La source off-line où l'échantillon est introduit dans une aiguille et poussé avec une seringue. La pointe de l'aiguille a une dimension de 1 à 2 μm permettant de travailler avec des débits de l'ordre de quelques dizaines de nL/min.
- La source on-line est utilisée en couplage avec la nano chromatographie liquide. Pour une meilleure compatibilité avec les débits de la nanoLC (environ 200 nL/min), la pointe de l'aiguille a un diamètre de 8 μm .

L'ionisation par nanoESI est obtenue par application, à pression atmosphérique, d'un potentiel (entre 1,5 et 2 kV) sur une aiguille en verre recouverte d'un alliage conducteur (généralement à base d'or et de palladium) dans laquelle est infusé l'échantillon. Ce potentiel provoque une accumulation de charge à la surface du liquide qui va se rompre pour former un spray (appelé cône de Taylor) contenant des gouttelettes fortement chargées. Le mécanisme d'ionisation est représenté sur la figure 1-6.

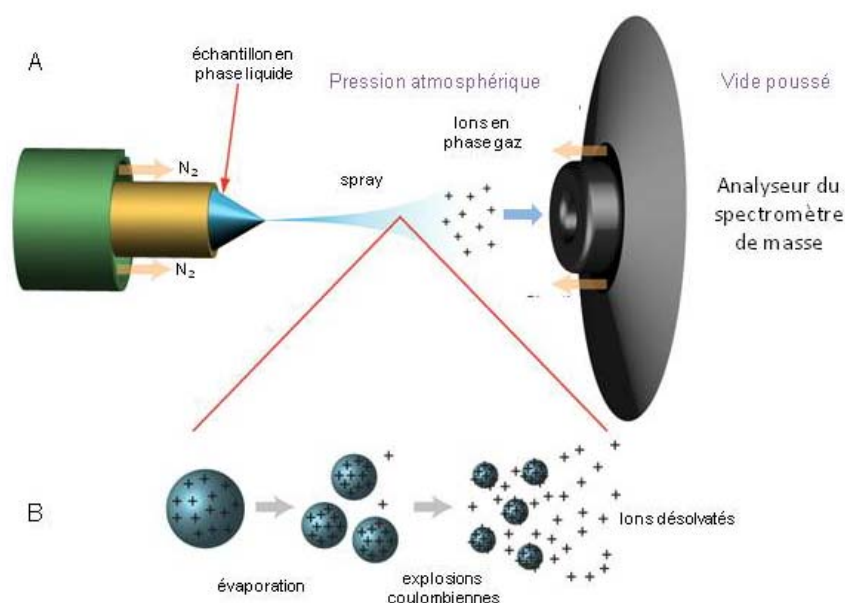


Figure 1-6: Principe de l'ionisation électrospray
A : Schéma d'une source électrospray
B : Mécanisme de la formation des ions désolvatés

L'évaporation du solvant contenu dans les gouttelettes va provoquer leur rétrécissement et ainsi augmenter la densité de charge jusqu'au moment où les forces coulombiennes répulsives approchent le niveau des forces de cohésion des gouttelettes et provoquent leur explosion formant un cône de Taylor. La fission des gouttelettes se produit avant la limite de Rayleigh car les gouttelettes sont déformées par le champ électrique intense auquel elles sont soumises. L'équation de la limite de Rayleigh montre une proportionnalité entre le rayon de la gouttelette R et sa charge (q_R) comme le montre l'équation ci-dessous :

$$q_R = z_R e = 8\pi (\gamma \epsilon_0 R^3)^{1/2}$$

où e est la charge élémentaire de la gouttelette, γ la tension superficielle du liquide et ϵ_0 la permittivité du vide

Ce processus se répète. La densité de charge augmente encore par évaporation du solvant ou par formation d'un nouveau jet de gouttelettes encore plus petites jusqu'au moment où leur densité de charge devient suffisante pour provoquer la désorption d'ion^{74, 75}. Les ions ainsi produits peuvent être mono ou multichargés en fonction du nombre de sites ionisables de la molécule. L'obtention de molécules multichargées permet l'analyse de molécules de hauts poids moléculaires (supérieur à 100 000 Da).

Les sources nanoESI connaissent un grand essor depuis 10 ans en raison de la sensibilité très élevée et de la facilité à réaliser des couplages avec la nano chromatographie liquide.

3.1.2.3. L'analyseur hybride Qq-TOF

Les appareils hybrides sont des spectromètres de masse associant deux types d'analyseur différents dans le but de cumuler leurs avantages. Les performances d'utilisation des spectromètres à temps de vol ont ainsi incité les constructeurs à proposer des appareils de type Qq-TOF. Cette configuration particulière peut être considérée comme celle d'un analyseur triple quadripôle auquel le 3^{ème} quadripôle aurait été remplacé par un analyseur à temps de vol. Le quadripôle procure ainsi une grande efficacité au processus MS/MS, tandis que le TOF apporte son excellente sensibilité, sa grande rapidité d'analyse et ses résolution et précision en masse bien meilleures sur les ions produits par rapport à une configuration triple quadripôle. Un quadripôle est constitué de quatre électrodes cylindriques parfaitement parallèles, idéalement de section hyperbolique, entre lesquelles on applique un potentiel continu U et un potentiel alternatif radiofréquence $V_0 \cos \omega t$ (figure 1-7). Le potentiel électrique Φ en un point du plan xOy est donné par : $\Phi = (U - V_0 \cos \omega t) (x^2 - y^2) / r_0^2$ où r_0 est la distance séparant les barres de l'axe optique Oz .

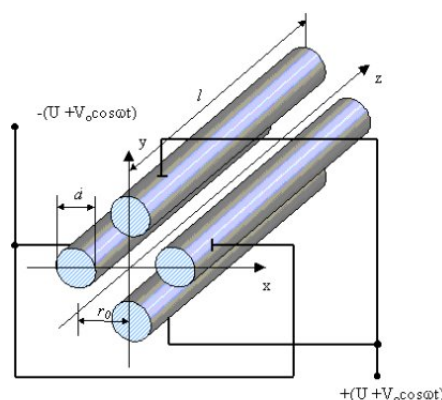


Figure 1-7: Analyseur quadripolaire
(Source : <http://www.techniques-ingenieur.fr/>)

À partir de cette expression, il est possible de décrire le mouvement d'un ion de masse m et de charge ze pénétrant dans le quadripôle avec une vitesse v , dans la direction z , au moyen des trois équations différentielles suivantes:

$$\begin{aligned} d^2x/dt^2 + x 2ze (U - V_0 \cos \omega t) / mr_0^2 &= 0 \\ d^2y/dt^2 + y 2ze (U - V_0 \cos \omega t) / mr_0^2 &= 0 \\ d^2z/dt^2 &= 0 \end{aligned}$$

Moyennant un changement de variables approprié, ces équations peuvent se mettre sous la forme d'équations dont les solutions ont été décrites il y a plus d'un siècle: les équations de Mathieu.

En effet, en posant : $\zeta = \omega t / 2$

$$a_x = -a_y = 8zeU / (mr_0^2 \omega^2)$$

$$q_x = -q_y = 4zeV_0 / (mr_0^2 \omega^2)$$

on obtient: $d^2x/d\zeta^2 + x(a_x - 2q_x \cos 2\zeta) = 0$

$$d^2y/d\zeta^2 - y(a_y - 2q_y \cos 2\zeta) = 0$$

$$d^2z/d\zeta^2 = 0$$

Selon les valeurs de m , U et V , certains ions peuvent avoir une trajectoire oscillante leur permettant de passer entre les barres du quadripôle et d'arriver au détecteur, les autres sont éjectés. Les conditions de stabilité des trajectoires, déduites des solutions des équations de Mathieu sont imposées par les valeurs des paramètres a et q dans le plan xOy . L'ensemble de ces solutions est souvent représenté sous la forme d'un « diagramme de stabilité » où a est porté en fonction de q (figure 1-8). On notera par ailleurs que les définitions de a et de q imposent, pour une fréquence ω déterminée, une proportionnalité directe entre m et U ou V . Par conséquent, en balayant simultanément ces deux tensions tout en maintenant leur rapport constant, les ions de différentes masses sont transmis à la condition que ce rapport U/V corresponde à un point situé à l'intérieur du diagramme de stabilité.

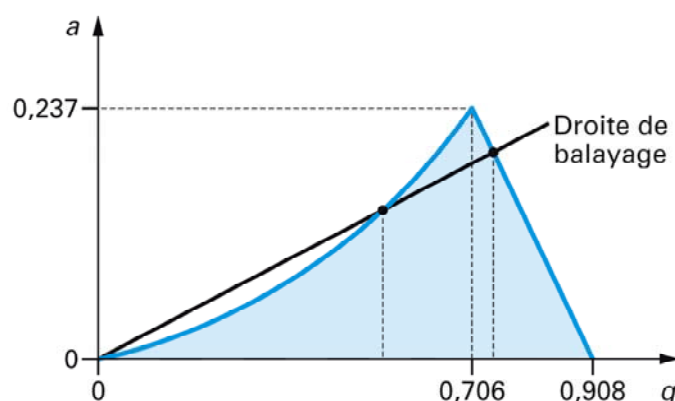


Figure 1-8: Diagramme de stabilité d'un quadripôle
(Source : <http://www.techniques-ingenieur.fr/>)

Le quadripôle peut également fonctionner en mode radiofréquence seulement, cela signifie que la tension appliquée sur le quadripôle est limitée à sa composante radiofréquence $V_0 \cos \omega t$. Cette tension impose aux ions un mouvement oscillant autour de l'axe optique du système allongeant considérablement leurs trajectoires. Ceci peut être mis à profit pour augmenter la probabilité de rencontre entre un ion et des particules neutres présentes dans cette région. Si l'énergie cinétique des ions est faible et la pression en particules neutres relativement élevée, les collisions auront pour effet de thermaliser et de focaliser les ions. Un

multipôle radiofréquence est, dans ces conditions, un élément optique de transmission des ions utilisé par exemple à la sortie d'une source électrospray. Lorsque l'énergie cinétique des ions est de plusieurs électronvolts, les collisions peuvent conduire à la dissociation des ions.

Dans le spectromètre de masse utilisé dans le cadre de cette thèse (Q-Star Pulsar, AB Sciex), on compte trois quadripôles au total dont deux fonctionnant en mode radiofréquence. Le premier est situé à la sortie de la source électrospray, il joue le rôle de guide d'ions et les focalise au centre des pôles. Le second est le quadripôle précédent l'analyseur à temps de vol. Il est utilisé comme cellule de collision dans laquelle un ion précurseur, préalablement sélectionné, est fragmenté. Les ions fragments sont accélérés vers un modulateur d'ions qui les envoie dans une direction orthogonale pour qu'ils rejoignent l'analyseur à temps de vol (dont le principe a été décrit précédemment).

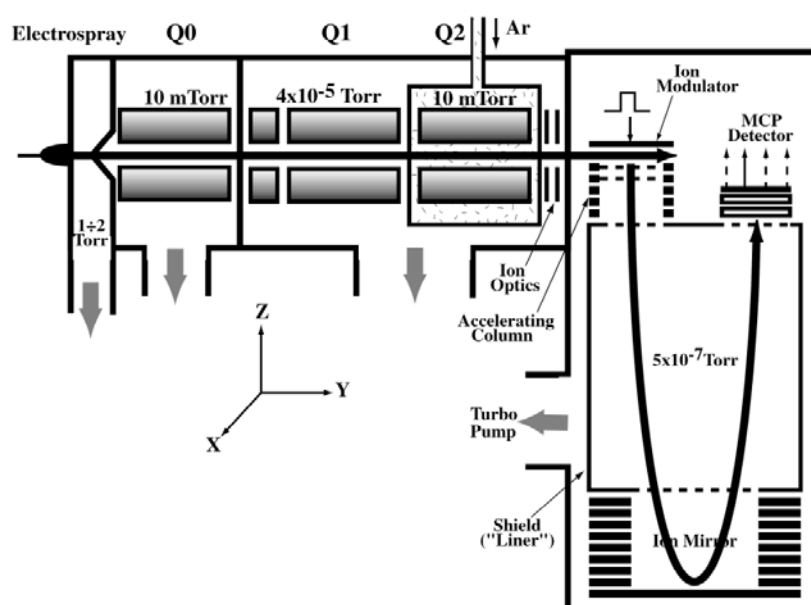


Figure 1-9: Schéma d'un analyseur hybride Qq-TOF
(extrait de la publication de Chernushevich ⁷⁶)

3.1.3. NanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR

Les principes de la nano-chromatographie liquide et de la source d'ionisation nano-électrospray ayant été expliqués auparavant, seul le principe de fonctionnement de l'analyseur de ce spectromètre de masse sera décrit.

L'utilisation de la résonance d'ions cyclotronique (ICR pour Ion Cyclotron Resonance) avec la spectrométrie a été développée par Sommer en 1949 ⁷⁷ mais c'est seulement dans les années 1980 que la spectrométrie de masse à transformée de Fourier a été décrite par

Comisarow et Marshall^{17, 78, 79}. Cette technique a montré de très grandes capacités en termes de résolution et de précision de masse et est à présent incontournable dans le domaine de l'analyse protéomique. Le principe de détection des ions est basé sur la mesure de la fréquence de rotation des ions dans un champ magnétique intense. Il peut être décrit dans le cas d'une cellule cubique constituée de six plaques où chaque paire de plaques parallèles tient un rôle distinct : piégeage, excitation et détection (figure 1-10). Cependant différents types de cellules ont été développées comme la cellule cylindrique fermée, la cellule cylindrique ouverte ou encore la double cellule cubique⁸⁰, l'objectif commun à ces différents types de cellules étant de concilier les impératifs de piégeage avec ceux de l'excitation et de la détection.

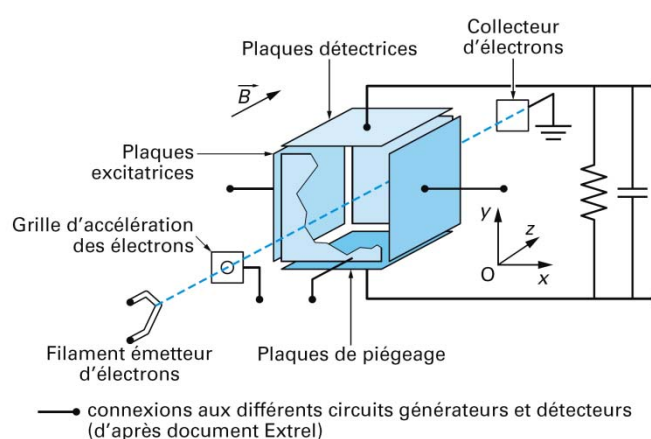


Figure 1-10: Schéma d'une cellule ICR cubique
(Source : <http://www.techniques-ingenieur.fr/>)

Une particule chargée q ayant une vitesse v dans un champ magnétique uniforme B est animée d'un mouvement de rotation appelé mouvement cyclotronique. Ce mouvement résulte de l'action opposée de la force de Lorentz définie par l'équation $\vec{F}_B = qv \wedge \vec{B}$ et la force centrifuge $F_c = \frac{mv^2}{r}$ où m est la masse de l'ion, r le rayon de la trajectoire qu'il décrit.

La vitesse angulaire de l'ion étant définie par $\omega = \frac{v}{r}$.

Ainsi, l'ion a une trajectoire circulaire résultant de l'équilibre de ces deux forces permettant de déterminer la fréquence de rotation cyclotronique : $m\omega^2 r = qB\omega r$

$$\text{D'où } \omega = \frac{qB}{m} = \frac{eB}{m/z} \text{ et } \nu = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{eB}{2\pi m/z} = \frac{1,535611 \times 10^7 B}{m/z}$$

(avec ν en Hertz et B en Tesla).

Il résulte de cette équation que la fréquence cyclotronique ne dépend que du champ magnétique et du rapport m/z de l'ion. Cependant, cette mesure ne peut pas être effectuée juste après le piégeage dans la cellule. Avant de procéder à leur détection, il est nécessaire de mettre en phase tous les ions de même rapport m/z par résonance cyclotronique. Cela consiste à appliquer, entre les plaques d'excitation, une différence de potentiel alternative de fréquence précisément égale à la fréquence cyclotronique des ions considérés. Sous l'effet de ce champ électrique alternatif, les ions sont accélérés et le rayon de leur trajectoire est accru. Durant cette phase d'excitation, tous les ions de même m/z sont mis en phase sur des orbites circulaires de dimensions croissantes. L'excitation est stoppée avant que le diamètre de l'orbite n'excède les dimensions intérieures de la cellule. Il a été démontré que lors de l'excitation d'un ion à sa fréquence cyclotronique avec une tension V_0 appliquée pendant une durée T_{exc} , le rayon de l'orbite est donné par l'équation $r = \frac{V_0 T_{\text{exc}}}{B_0}$ où r est le rayon cyclotron, V_0 la tension appliquée, T_{exc} le temps d'excitation et B_0 le champ magnétique⁸¹. Le rayon cyclotron des ions ne dépend donc que de la tension appliquée et du temps de l'excitation et pas du rapport m/z . Aussi le contrôle de ces deux paramètres permet d'amener les ions à un rayon optimal de manière à les faire passer près des plaques de détection pour une mesure sensible sans distorsion du signal. La rotation cohérente des ions à large rayon crée un courant miroir sur les plaques de détection par interaction électrostatique entre les ions et les électrons du métal. Le signal transitoire observé pour des ions de même rapport m/z est une sinusoïde amortie exponentiellement. Ce signal amorti est dû à divers facteurs dont les collisions ion-molécule et la répulsion coulombienne⁸², qui détruisent la cohérence du paquet d'ions, qui finit par avoir une distribution radiale homogène et ne plus induire de courant dans les plaques de détection. Dans le cas où un ensemble d'ions de rapports m/z différents sont détectés, le signal correspond à la superposition des courants induits pour chaque rapport m/z . La transformée de Fourier permet de transformer ce signal en un spectre de fréquences cyclotroniques, lui-même converti en un spectre de masse.

Il existe deux modes principaux de transport des ions entre la source d'ions et la cellule ICR : les multipôles et les guides électrostatiques. Concernant les multipôles, ce sont généralement des hexapôles ou des octopôles qui sont utilisés. La fréquence et l'intensité de la tension radiofréquence appliquée aux électrodes des multipôles sont réglées afin de transmettre tous les ions suivant l'axe z . Pour les guides électrostatiques, un système de lentilles électrostatiques assure l'accélération, la focalisation puis la décélération des ions pour les transporter de la source à la cellule. Les instruments actuels sont basés soit sur du transport

multipolaire soit sur un guide électrostatique, avec un hexapôle de stockage en aval de la source d'ionisation, ce qui permet d'optimiser la sensibilité de l'appareil.

La résolution est liée au champ magnétique et au rapport m/z d'après la relation :

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{zeBcste}{2m}$$

où $cste$ est une constante d'amortissement du signal qui est inversement proportionnelle à la pression. La résolution de l'appareil augmente avec l'intensité du champ magnétique et diminue avec la pression dans la cellule ICR. Dans tous les cas, étant donné la durée limitée de la mesure du signal, la résolution augmente avec la fréquence cyclotron, ce qui implique qu'elle diminue avec le rapport m/z des ions. La précision en masse dépend de la résolution mais également de la qualité de la calibration de l'appareil ⁸³. Une calibration interne permet d'atteindre une précision de l'ordre de 1-2 ppm sur une gamme de masse de 500 à 1500. Ainsi, les spectromètres de masse FT-ICR font partie des appareils qui offrent les meilleurs pouvoirs de résolution et de précision de masse et permettent la détermination des structures primaires et secondaires des protéines par analyse MS et MS/MS, ainsi que de leur conformation par étude d'échanges H/D ⁸⁴.

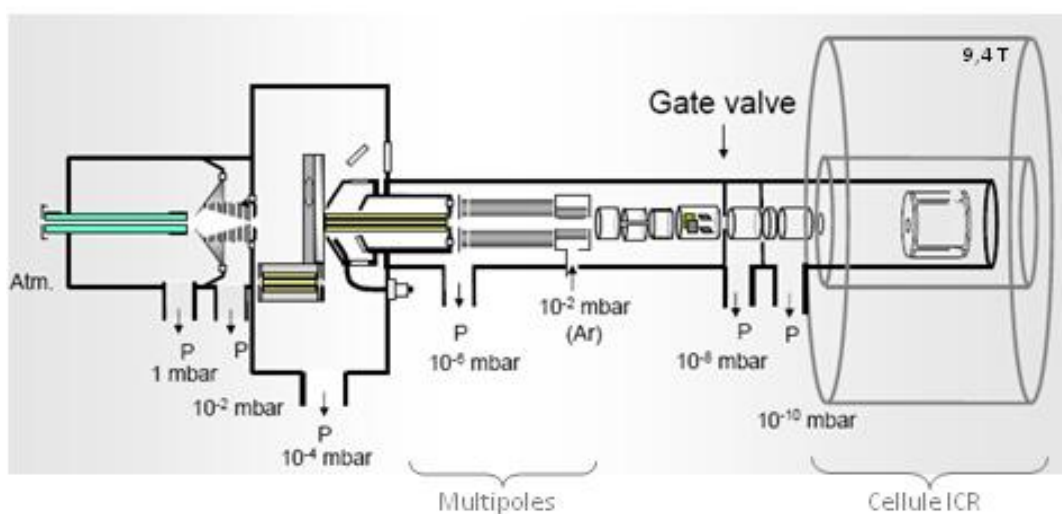


Figure 1-11: Schéma interne du spectromètre de masse FT-ICR Bruker Daltonics 9,4 T

3.2. La protéomique

3.2.1. Définition

Le terme protéome, construit par analogie avec le terme génome, est apparu dans la littérature scientifique en 1995 ⁸⁵. Le protéome est défini comme étant l'ensemble des

protéines présentes dans un échantillon biologique donné (liquide physiologique, tissus, organes...) dans une situation physiologique ou pathologique donnée. Le protéome résulte de la traduction du génome en protéines par l'ARN messager dans des conditions de vie définies. Un seul génome peut donc conduire à différents protéomes en fonction des étapes du cycle cellulaire, de la différenciation, de la réponse à différents signaux biologiques ou physiques, de l'état physiopathologique... Alors que le génome d'une cellule est constant, le protéome reflète les répercussions de ces événements cellulaires, il est de nature dynamique ⁸⁶. Par ailleurs, une protéine peut être modifiée chimiquement après sa synthèse ou au cours de sa vie dans la cellule. Le plus souvent ces modifications sont induites par une enzyme mais il existe également des modifications qui ne sont pas induites de manière enzymatique et qui apparaissent après exposition à des facteurs extérieurs (exposition aux UV...). Cela augmente la complexité du protéome et montre que seule son étude permet la compréhension globale d'un système biologique donné dans une situation déterminée. La protéomique désigne donc la science qui étudie les protéomes. Cette science s'est fortement développée ces dernières années grâce, d'une part, à l'augmentation exponentielle des séquences de génomes disponibles et, d'autre part aux progrès de la spectrométrie de masse. La démarche classique de l'analyse protéomique se divise en plusieurs étapes et consiste, dans un premier temps, à extraire les protéines du milieu d'étude (fluide biologique, cellule, plante...). Ensuite, l'analyse des protéines peut être effectuée selon deux stratégies différentes appelées 'top-down' et 'bottom-up' ⁸⁷⁻⁹⁰ (voir figure 1-12). La stratégie dite 'top down' permet l'analyse de protéines sans hydrolyse chimique ou enzymatique au préalable. Dans ce cas les protéines sont fragmentées directement dans le spectromètre de masse (dans la source ou dans l'analyseur selon l'appareil utilisé). Cette approche n'ayant pas été utilisée dans ces travaux de thèse, nous n'en détaillerons pas le principe.

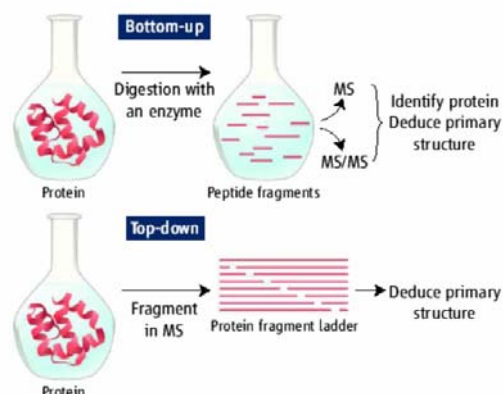


Figure 1-12: Représentation schématique des stratégies d'analyse protéomique 'top-down' et 'bottom-up' (issue de la publication de Chait ⁹⁰)

3.2.2. La stratégie 'bottom-up'

3.2.2.1. Principe général

La stratégie d'analyse appelée 'bottom-up' est la plus fréquemment utilisée. Elle consiste en l'identification d'une protéine à partir des peptides la constituant, souvent générés par hydrolyse enzymatique. Les protéines de l'échantillon peuvent être préalablement séparées soit sur gel d'électrophorèse en fonction de leur poids moléculaire ou/et de leur charge par application d'un champ électrique soit par chromatographie. L'hydrolyse enzymatique des protéines se fait alors respectivement *in gel* ou en solution par une protéase dont le site de coupure est connu, ce qui génère un set de peptides, lesquels constituent, dans leur ensemble, la signature de la protéine. Enfin la spectrométrie de masse permet de mesurer précisément la masse de ces différents peptides. L'identification de la protéine est réalisée à l'aide d'outils bioinformatiques ⁹¹ par comparaison des masses mesurées avec les masses théoriques stockées dans des banques de données.

3.2.2.2. La spectrométrie de masse en tandem: pourquoi ?

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) permet de sélectionner un ion, appelé ion parent, et de le fragmenter ce qui génère des ions fils qui sont à leur tour analysés. Cette analyse en tandem permet donc de mesurer avec précision la masse des ions fils. Cette information combinée à la connaissance des mécanismes de fragmentation conduit à l'identification de la structure moléculaire de l'ion parent ⁹². Dans le cas de l'analyse protéomique la spectrométrie de masse en tandem est devenue une technique de choix pour le séquençage de peptides et pour la détermination des modifications protéiques.

L'application de la spectrométrie de masse en tandem sur des biomolécules telles que les protéines ou les peptides est devenue possible grâce au développement de techniques d'ionisation douces (ionisation électrospray ⁹³ ou MALDI ^{67, 68}) qui permettent d'obtenir des ions protéiques ou peptidiques intacts, c'est-à-dire sans fragmentation. Ainsi, les ions peptidiques peuvent être fragmentés en aval dans une cellule de collision. Le spectre de fragmentation résultant dépend de différents paramètres comme par exemple la composition en acides aminés, la taille du peptide, l'état de charge, la technique d'ionisation... Toutefois, les ions peptidiques sont, en général, fragmentés par des collisions se produisant à basse énergie ce qui cause la rupture des liaisons amides ⁹⁴ et entraîne principalement la formation d'ions b (rupture du côté N-term) et y (rupture du côté C-term) ^{95, 96} comme montré sur la

figure 1-13. La séquence d'acides aminés d'un peptide peut donc être déterminée à partir de la différence de masse de deux fragments successifs de même type (par exemple, b_n et b_{n-1}).

La détermination de la séquence d'un peptide sur la base de son spectre MS/MS est appelée séquençage *De Novo*⁹⁷. Ce procédé est particulièrement utilisé lorsque le protéome de l'organisme d'étude n'a pas été séquencé. Par ailleurs, la spectrométrie de masse en tandem permet également d'identifier la nature des modifications protéiques et leur localisation. En effet, ces modifications impliquent des changements au niveau de la structure des protéines ce qui entraîne une variation de leur masse. Chaque acide aminé possédant une masse qui lui est propre, excepté la leucine et l'isoleucine, le spectre de fragmentation d'un peptide est donc « prévisible ». Si un peptide est modifié, l'acide aminé sur lequel est localisée la modification aura une masse différente de celle attendue et sera donc rapidement identifié. De plus, l'écart de masse permet de manière générale d'identifier la nature de la modification.

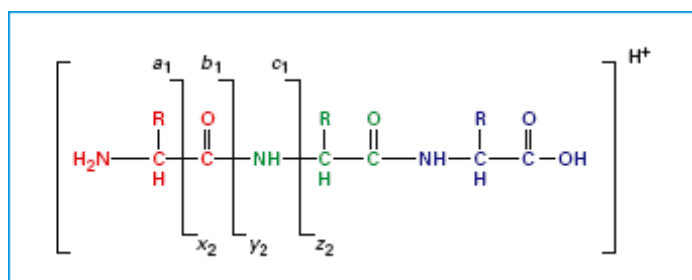


Figure 1-13: Nomenclature des ions formés lors de la fragmentation de peptides

3.2.2.3. Les outils bioinformatiques

La bioinformatique est la discipline de l'analyse de l'information biologique contenue dans les séquences nucléotidiques (séquences de nucléotides) et protéiques (séquences d'acides aminés). Son apparition dans les années 1980 coïncide avec la création des premières banques de données (EMBL et GenBank). Dans le domaine de l'analyse protéomique, la bioinformatique permet la modélisation et la prédiction de la structure et de la fonction des protéines, elle regroupe les banques de données de séquences de protéines et offre des outils d'analyse conduisant à leur identification, leur quantification ou encore l'identification de leurs modifications post-traductionnelles.

- Identification des protéines

Dans ce travail de thèse, la bioinformatique a surtout été utilisée dans un but d'identification des protéines et de leurs modifications. Nous avons travaillé avec la banque

de données Swiss-Prot (<http://web.expasy.org/docs/relnotes/relstat.html> 07/2011 530264 entrées). Afin de réaliser l'interrogation de cette banque de données, nous avons utilisé l'interface Mascot (<http://www.matrixscience.com/>). L'interrogation peut être faite de deux manières : soit à partir du spectre MS de l'échantillon (*peptide mass fingerprint*), soit à partir des spectres MS/MS (*MS/MS ion search*). L'identification par *peptide mass fingerprint* s'effectue par comparaison des masses expérimentales des peptides (générées à partir des valeurs des rapports m/z lues sur le spectre MS de l'échantillon) avec des masses calculées stockées dans la banque de données. Toutefois, même si l'empreinte peptidique d'une protéine conduit généralement à son identification elle ne permet pas d'obtenir d'informations concernant les modifications de cette dernière par exemple. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser la spectrométrie de masse en tandem. Dans ce cas, lors de l'analyse du digest peptidique par spectrométrie de masse, chaque ion est fragmenté et l'interrogation des banques de données s'effectue à partir des spectres MS/MS obtenus (*MS/MS ion search*). Comme pour l'interrogation par *peptide mass fingerprint*, les valeurs expérimentales sont comparées à des valeurs théoriques stockées dans la banque de données, à la différence que cette fois-ci les valeurs comparées ne sont pas les masses des peptides mais les masses des fragments de chaque peptide. Afin d'aider le logiciel dans sa recherche, différents paramètres peuvent être précisés comme l'enzyme utilisée pour la digestion de la protéine, la taxonomie, le spectromètre de masse utilisé, l'écart de masse maximal toléré ...

- Identification de modifications

En ce qui concerne l'identification de modifications sur les protéines, nous avons la possibilité d'entrer dans le logiciel Mascot des modifications dites variables qui seront prises en compte par le logiciel pour le calcul des spectres de fragmentation. Cependant, cette fonction implique d'avoir une idée du type de modification recherché. Une autre fonction disponible dans Mascot peut nous donner des indications sur les modifications, il s'agit de la fonction 'error tolerant'. Quand ce mode est activé, le logiciel propose des modifications afin que les valeurs calculées correspondent aux valeurs expérimentales. Néanmoins, les informations fournies par le logiciel ne sont que des suggestions et une vérification manuelle des spectres est toujours indispensable.

- Séquençage *De Novo*

Certaines protéines ne sont pas encore séquencées et dans ce cas l'identification est réalisée par homologie de séquence avec une espèce dont la séquence est proche. Néanmoins,

il est possible de retrouver la séquence exacte de la protéine à partir des spectres de fragmentation. En particulier, le mode 'error tolerant' du logiciel mascot propose des substitutions d'acides aminés correspondant à la différence de masse observée entre fragments calculés et fragments théoriques. Toutefois, comme pour les modifications, une vérification manuelle des spectres est indispensable.

3.2.3. Application à l'analyse d'échantillons du Patrimoine Culturel

La protéomique a été proposée pour la première fois comme technique analytique permettant l'identification précise des protéines utilisées dans les liants de peinture ancienne par Tokarski *et al.* en 2002 lors de la 7^{ème} conférence internationale « Analyses non destructives et microanalyses pour la conservation du patrimoine culturel et environnemental » qui s'est déroulée à Anvers (Belgique) ⁹⁸.

L'approche protéomique peut être appliquée sur tout type d'échantillon à partir du moment où les protéines qu'il contient en sont extraites. Partant de ce constat, différentes techniques d'extraction ont été testées afin d'extraire les protéines des peintures. La méthodologie a été développée et optimisée sur des échantillons de peinture modèles, de composition semblable à celle des peintures anciennes, qui ont été fabriqués au laboratoire. Une fois les conditions optimales d'extraction protéique trouvées, l'analyse protéomique classique comprenant hydrolyse enzymatique et analyse par spectrométrie de masse a été effectuée. Enfin, les protéines ont été identifiées à l'aide d'outils bioinformatique. Cette méthodologie a été appliquée avec succès sur deux échantillons provenant de peintures exposées au musée du Petit Palais d'Avignon datées de la Renaissance. Dans le cas du tryptique de Benedetto Bonfigli (1420-1496) 'La Vierge et l'Enfant. Saint Jean le Baptiste. Saint Sébastien' daté du XV^{ème} siècle, quatre protéines ont été identifiées suite à l'analyse par spectrométrie de masse : l'ovotransferrine, l'ovalbumine et le lysozyme qui sont des protéines du blanc d'œuf et la vitellogénine qui est une protéine du jaune d'œuf. L'analyse de la seconde peinture 'La Vierge et l'Enfant' de Niccolo di Pietro Gerini (1368-1415) datée du XIV^{ème} siècle, a conduit à l'identification de deux protéines du blanc d'œuf (ovotransferrine et ovalbumine) et une protéine du jaune d'œuf (vitellogénine). L'analyse protéomique a permis d'identifier la nature du liant protéique et ainsi de révéler la technique utilisé pour l'exécution de ces œuvres ⁹⁹. Ces résultats ont montré le potentiel de l'analyse protéomique dans le domaine de la science de la conservation et d'autres travaux basés sur ces premiers résultats ont ensuite été publiés.

Dans des travaux plus récents, l'approche protéomique a été appliquée sur un échantillon de peinture murale provenant de la cathédrale Saint Dimitar de Vidin (Bulgarie), ce qui a permis d'identifier des protéines de blanc d'œuf, jaune d'œuf et également de la caséine qui est une protéine du lait ¹⁰⁰. L'emploi de colle animale par l'artiste Bruegel le Jeune (1565-1636) a été révélé grâce à l'analyse de deux micro-prélèvements provenant des œuvres 'Sermon de Saint Jean le Baptiste' et 'Crucifixion' exposées respectivement au musée Groeninge de Bruges et au musée des Arts Appliqués de Budapest ¹⁰¹.

Un peu plus tard, l'approche protéomique a été appliquée sur une céramique archéologique, montrant ainsi que le champ d'application de cette discipline ne se limite pas aux peintures d'art et que la protéomique permet également l'étude d'autres matériaux du Patrimoine Culturel ^{102, 103}. La céramique archéologique d'intérêt étant un tesson de poterie Iñupiak provenant de la région de Point Barrow en Alaska, la méthode d'identification des protéines a d'abord été développée sur des échantillons de muscles et de graisse de baleines et de phoques de différentes espèces. En effet, les Iñupiat étant un peuple d'Alaska dont la subsistance repose aujourd'hui encore sur la chasse et la pêche et particulièrement la pêche à la baleine, les muscles et la graisse de baleine représentaient une source potentielle de résidus protéiques dans les céramiques archéologiques retrouvées. Ensuite, des tessons de céramique contenant du muscle et de la graisse de phoque ou de baleine ont été chauffés afin de reproduire une céramique ayant été utilisée pour la cuisson de ces aliments. Une extraction protéique avec de l'eau acidifiée suivi de l'hydrolyse enzymatique des protéines extraites a permis d'identifier différentes protéines localisées principalement dans les cellules musculaires et de manière plus intéressante il a été montré que certains peptides étaient spécifiques aux espèces de baleines et de phoques étudiées. Ainsi, leur identification pouvait attester de la présence de muscle et/ou graisse de baleine ou de phoque dans les céramiques. La méthode optimisée a été appliquée sur un échantillon de poterie Iñupiak et les résultats de l'analyse ont permis d'identifier des peptides de la myoglobine dont un peptide spécifique du phoque, prouvant que cet animal était consommé par les peuples Esquimaux.

La protéomique est donc une technique qui offre de nouvelles perspectives quant à l'analyse des protéines dans les matériaux du patrimoine culturel. Dans le cadre de cette thèse, nous l'avons utilisée dans trois buts différents : recherche de modifications chimiques sur les protéines des liants de peinture, identification de l'espèce d'origine des colles animales et identification de résidus de protéines dans les amphores.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Raman, C. V.; Krishnan, K. S. *Nature* **1928**, *121*, 501-502.
- (2) Sijtsema, N. M.; Wouters, S. D.; Grauw, C. J. D.; Otto, C.; Greve, J. *Appl. Spectrosc.* **1998**, *52*, 348-355.
- (3) Kitagawa, T.; Hirota, S. In *Handbook of Vibrational Spectroscopy*; John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- (4) Tuma, R. *Journal of Raman Spectroscopy* **2005**, *36*, 307-319.
- (5) Williams, R. W.; Dunker, A. K. *Journal of Molecular Biology* **1981**, *152*, 783-813.
- (6) Williams, R. W. *Journal of Molecular Biology* **1983**, *166*, 581-603.
- (7) Williams, R. W.; Hirs, C. H. W.; Timasheff, S. N. In *Methods in Enzymology*; Academic Press, 1986; Vol. Volume 130, pp 311-331.
- (8) Bussian, B. M.; Sander, C. *Biochemistry* **1989**, *28*, 4271-4277.
- (9) Berjot, M.; Marx, J.; Alix, A. J. P. *Journal of Raman Spectroscopy* **1987**, *18*, 289-300.
- (10) Alix, A. J. P.; Pedanou, G.; Berjot, M. *Journal of Molecular Structure* **1988**, *174*, 159-164.
- (11) Sugeta, H.; Go, A.; Miyazawa, T. *Bull Chem Soc Jpn.* **1973**, *46*, 3407-3411.
- (12) Nogami, N.; Sugeta, H.; Miyazawa, T. *Bull Chem Soc Jpn* **1975**, *48*, 2417-2420.
- (13) Siamwiza, M. N.; Lord, R. C.; Chen, M. C.; Takamatsu, T.; Harada, I.; Matsuura, H.; Shimanouchi, T. *Biochemistry* **1975**, *14*, 4870-4876.
- (14) Harada, I.; Miura, T.; Takeuchi, H. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* **1986**, *42*, 307-312.
- (15) Miura, T.; Takeuchi, H.; Harada, I. *Biochemistry* **1988**, *27*, 88-94.
- (16) Miura, T.; Takeuchi, H.; Harada, I. *Journal of Raman Spectroscopy* **1989**, *20*, 667-671.
- (17) Comisarow, M. B.; Marshall, A. G. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26*, 489-490.
- (18) Maruyama, T.; Takeuchi, H. *Journal of Raman Spectroscopy* **1995**, *26*, 319-324.
- (19) Takeuchi, H. *Biopolymers* **2003**, *72*, 305-317.
- (20) Takeuchi, H.; Watanabe, N.; Satoh, Y.; Harada, I. *Journal of Raman Spectroscopy* **1989**, *20*, 233-237.
- (21) Hildebrandt, P. G.; Copeland, R. A.; Spiro, T. G.; Otlewski, J.; Laskowski, M.; Prendergast, F. G. *Biochemistry* **1988**, *27*, 5426-5433.

- (22) Rodgers, K. R.; Su, C.; Subramaniam, S.; Spiro, T. G. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 3697-3709.
- (23) Hernandez, B.; Pfluger, F.; Adenier, A.; Kruglik, S. G.; Ghomi, M. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114*, 15319-15330.
- (24) Caswell, D. S.; Spiro, T. G. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 6470-6477.
- (25) Li, H.; Thomas, G. J. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 456-462.
- (26) Fleischmann M; Hendra PJ; AJ, M. *Chem Phys Lett* **1974**, *26*, 163-166.
- (27) Albrecht MG; JA, C. *J Am Chem Soc* **1977**, *99*, 5215-5217.
- (28) Jeanmaire DL; RP, V. D. *J Electroanal Chem* **1977**, *84*, 1-17.
- (29) Porter, M. D.; Lipert, R. J.; Siperko, L. M.; Wang, G.; Narayanan, R. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1001-1011.
- (30) Kneipp, K.; Kneipp, H.; Kneipp, J. *Accounts of Chemical Research* **2006**, *39*, 443-450.
- (31) Han, X.; Zhao, B.; Ozaki, Y. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *394*, 1719-1727.
- (32) Han, X. X.; Jia, H. Y.; Wang, Y. F.; Lu, Z. C.; Wang, C. X.; Xu, W. Q.; Zhao, B.; Ozaki, Y. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 2799-2804.
- (33) Cotton, T. M.; Schultz, S. G.; Van Duyne, R. P. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102*, 7960-7962.
- (34) Grabbe, E. S.; Buck, R. P. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 8362-8366.
- (35) Kneipp, K.; Flemming, J. *Journal of Molecular Structure* **1986**, *145*, 173-179.
- (36) Lee, P. C.; Meisel, D. *The Journal of Physical Chemistry* **1982**, *86*, 3391-3395.
- (37) Chen, C. Y.; Burstein, E. *Physical Review Letters* **1980**, *45*, 1287.
- (38) Asher, S. A.; Ludwig, M.; Johnson, C. R. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 3186-3197.
- (39) Fodor, S. P. A.; Spiro, T. G. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 3198-3205.
- (40) Wen, Z. Q.; Thomas, G. J. *Biopolymers* **1998**, *45*, 247-256.
- (41) William L. Kubasek; Bruce Hudson; Peticolas, W. L. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 2369-2373.
- (42) Copeland, R. A.; Spiro, T. G. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 1281-1285.

- (43) Guineau, B. *Studies in Conservation* **1984**, 29, 35-41.
- (44) Bell, I. M.; Clark, R. J. H.; Gibbs, P. J. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1997**, 53, 2159-2179.
- (45) Clark, R. J. H. *Chemical Society Reviews* **1995**, 24, 187-196.
- (46) Clark, R. J. H.; Gibbs, P. J. *Chem. Commun* **1997**, 1003-1004.
- (47) Colomban, P.; Sagon, G.; Faurel, X. *Journal of Raman Spectroscopy* **2001**, 32, 351-360.
- (48) Hänni, H.; Schubiger, B.; Kiefert, L.; Häberli, S. *Gems & Gemology* **1998**, 34, 102-113.
- (49) Edwards, H. G. M.; Farwell, D. W.; Newton, E. M.; Rull Perez, F.; Jorge Villar, S. *Journal of Raman Spectroscopy* **2000**, 31, 407-413.
- (50) Daniilia, S.; Sotiropoulou, S.; Bikiaris, D.; Salpistis, C.; Karagiannis, G.; Chryssoulakis, Y.; Price, B. A.; Carlson, J. H. *Journal of Cultural Heritage* **2000**, 1, 91-110.
- (51) Bersani, D.; Antonioli, G.; Lottici, P. P.; Casoli, A. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2003**, 59, 2409-2417.
- (52) Edwards, H. G. M.; Middleton, P. S.; Jorge Villar, S. E.; de Faria, D. L. A. *Analytica Chimica Acta* **2003**, 484, 211-221.
- (53) Athanassiou, A.; Hill, A. E.; Fourrier, T.; Burgio, L.; Clark, R. J. H. *Journal of Cultural Heritage* **2000**, 1, S209-S213.
- (54) Burgio L; Clark RJ; Firth S *Analyst* **2001**, 126, 222-227.
- (55) Smith, G. D.; Clark, R. J. H. *Journal of Cultural Heritage* **2002**, 3, 101-105.
- (56) Aze, S.; Vallet, J.-M.; Baronnet, A.; Grauby, O. *European Journal of Mineralogy* **2006**, 18, 835-843.
- (57) Pérez-Alonso, M.; Castro, K.; Madariaga, J. M. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 571, 121-128.
- (58) Aze, S.; Vallet, J.-M.; Pomey, M.; Baronnet, A.; Grauby, O. *European Journal of Mineralogy* **2007**, 19, 883-890.
- (59) Vandenabeele, P.; Wehling, B.; Moens, L.; Edwards, H.; De Reu, M.; Van Hooydonk, G. *Analytica Chimica Acta* **2000**, 407, 261-274.
- (60) Lau, D.; Livett, M.; Prawer, S. *Journal of Raman Spectroscopy* **2008**, 39, 545-552.
- (61) Nevin, A.; Osticioli, I.; Anglos, D.; Burnstock, A.; Cather, S.; Castellucci, E. *Anal Chem* **2007**, 79, 6143-6151.

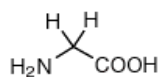
- (62) Nevin, A.; Osticioli, I.; Anglos, D.; Burnstock, A.; Cather, S.; Castellucci, E. *Journal of Raman Spectroscopy* **2008**, *39*, 993-1000.
- (63) Osticioli, I.; Nevin, A.; Anglos, D.; Burnstock, A.; Cather, S.; Becucci, M.; Fotakis, C.; Castellucci, E. *Journal of Raman Spectroscopy* **2008**, *39*, 307-313.
- (64) Romero-Pastor, J.; Cardell, C.; Manzano, E.; Yebra-Rodríguez, Á.; Navas, N. *Journal of Raman Spectroscopy* **2011**, n/a-n/a.
- (65) Navas, N.; Romero-Pastor, J.; Manzano, E.; Cardell, C. *Journal of Raman Spectroscopy* **2010**, *41*, 1486-1493.
- (66) Manzano, E.; Romero-Pastor, J.; Navas, N.; Rodríguez-Simón, L. R.; Cardell, C. *Vibrational Spectroscopy* **2010**, *53*, 260-268.
- (67) Karas, M.; Hillenkamp, F. *Analytical Chemistry* **1988**, *60*, 2299-2301.
- (68) Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yohida, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151-153.
- (69) Wiley, W. C.; McLaren, I. H. *Rev. Sci. Instrum.* **1955**, *26*, 1150-1157.
- (70) Karlsson, K. E.; Novotny, M. *Anal Chem* **1988**, *60*, 1662-1665.
- (71) Yamashita, M.; Fenn, J. B. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4451-4459.
- (72) Wilm, M.; Mann, M. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1-8.
- (73) Wilm, M. S.; Mann, M. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, *136*, 167-180.
- (74) Kebarle, P.; Tang, L. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 972A-986A.
- (75) Kebarle, P.; Verkerk, U. H. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 898-917.
- (76) Chernushevich, I. V.; Loboda, A. V.; Thomson, B. A. *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, *36*, 849-865.
- (77) Hipple, J. A.; Sommer, H.; Thomas, H. A. *Physical Review* **1949**, *76*, 1877.
- (78) Comisarow, M. B.; Marshall, A. G. *Can. J. Chem.* **1974**, *52*, 1997-1999.
- (79) Comisarow, M. B.; Marshall, A. G. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *25*, 282-283.
- (80) Nikolaev, E. N.; Gorshkov, M. V. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1985**, *64*, 115-125.
- (81) Gorshkov, M. V.; Nikolaev, E. N. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1993**, *125*, 1-8.
- (82) Nikolaev, E. N.; Heeren, R. M. A.; Popov, A. M.; Pozdneev, A. V.; Chingin, K. S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 3527-3546.
- (83) Shi, S. D. H.; Drader, J. J.; Freitas, M. A.; Hendrickson, C. L.; Marshall, A. G. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *195/196*, 591-598.

- (84) Emmett, M. R.; Kazazic, S.; Marshall, A. G.; Greig, M. J.; (Florida State University Research Foundation, USA). Application: US
US, 2010, pp 11pp , Cont -in-part of U S Ser No 672,789.
- (85) Kahn, P. *Science* **1995**, *270*, 369-370.
- (86) Anderson, N. L.; Anderson, N. G. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1853-1861.
- (87) Bogdanov, B.; Smith, R. D. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 168-200.
- (88) Kelleher, N. L. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 196 A-203 A.
- (89) Reid, G. E.; McLuckey, S. A. *J. Mass Spectrom.* **2002**, *37*, 663-675.
- (90) Chait, B. T. *Science* **2006**, *314*, 65-66.
- (91) Pappin, D. J. C.; Hojrup, P.; Bleasby, A. J. *Current Biology* **1993**, *3*, 327-332.
- (92) McLafferty, F. W. *Tandem mass spectrometry* edited by F. W. McLafferty ed.: New York, 1983.
- (93) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. *Science* **1989**, *246*, 64-71.
- (94) Papayannopoulos, I. A. *Mass Spectrom. Rev.* **1995**, *14*, 49-73.
- (95) Roepstorff, P.; Fohlman, J. *Biomedical Mass Spectrometry* **1984**, *11*, 601-601.
- (96) Biemann, K. *Biological Mass Spectrometry* **1988**, *16*, 99-111.
- (97) Taylor, J. A.; Johnson, R. S. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 2594-2604.
- (98) Tokarski, C.; Cren-Olive, C.; Martin, E.; Rolando, C., Antwerp, Belgium 2002.
- (99) Tokarski, C.; Martin, E.; Rolando, C.; Cren-Olivé, C. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 1494-1502.
- (100) Chambery, A.; Di Maro, A.; Sanges, C.; Severino, V.; Tarantino, M.; Lamberti, A.; Parente, A.; Arcari, P. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *395*, 2281-2291.
- (101) Fremout, W.; Dhaenens, M.; Saverwyns, S.; Sanyova, J.; Vandenabeele, P.; Deforce, D.; Moens, L. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *658*, 156-162.
- (102) Solazzo, C.; Rolando, C.; Tokarski, C. *Actualité Chimique* **2008**, *318*, 1-6.
- (103) Solazzo, C.; Fitzhugh, W. W.; Rolando, C.; Tokarski, C. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 4590-4597.

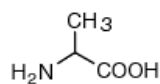
ANNEXE

Table des acides aminés

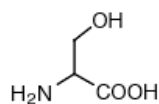
Small



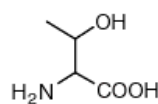
Glycine (Gly, G)
MW: 57.05



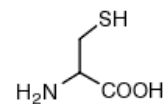
Alanine (Ala, A)
MW: 71.09



Serine (Ser, S)
MW: 87.08, pK_a ~ 16

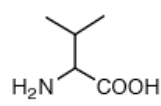


Threonine (Thr, T)
MW: 101.11, pK_a ~ 16

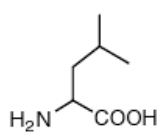


Cysteine (Cys, C)
MW: 103.15, pK_a = 8.35

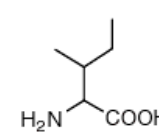
Hydrophobic



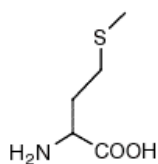
Valine (Val, V)
MW: 99.14



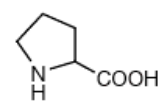
Leucine (Leu, L)
MW: 113.16



Isoleucine (Ile, I)
MW: 113.16

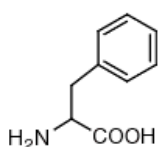


Methionine (Met, M)
MW: 131.19

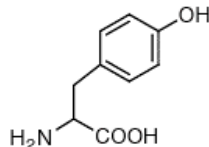


Proline (Pro, P)
MW: 97.12

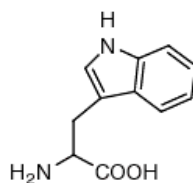
Aromatic



Phenylalanine (Phe, F)
MW: 147.18

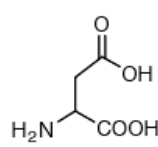


Tyrosine (Tyr, Y)
MW: 163.18

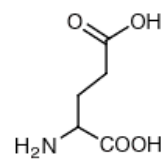


Tryptophan (Trp, W)
MW: 186.21

Acidic

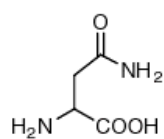


Aspartic Acid (Asp, D)
MW: 115.09, pK_a = 3.9

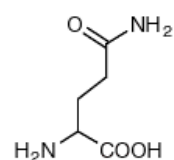


Glutamic Acid (Glu, E)
MW: 129.12, pK_a = 4.07

Amide

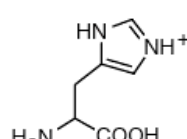


Asparagine (Asn, N)
MW: 114.11

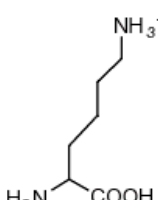


Glutamine (Gln, Q)
MW: 128.14

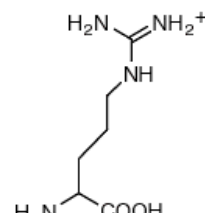
Basic



Histidine (His, H)
MW: 137.14, pK_a = 6.04



Lysine (Lys, K)
MW: 128.17, pK_a = 10.79



Arginine (Arg, R)
MW: 156.19, pK_a = 12.48

Chapitre 2: Le devenir des protéines dans les liants de peinture : étude spectroscopique et protéomique

CHAPITRE 2: LE DEVENIR DES PROTEINES DANS LES LIANTS DE PEINTURE : ETUDE SPECTROSCOPIQUE ET PROTEOMIQUE

1. INTRODUCTION	- 69 -
1.1. HISTOIRE ET ÉVOLUTION DE LA PEINTURE MURALE EN OCCIDENT	- 69 -
1.2. L'ÉTUDE SCIENTIFIQUE DES PEINTURES MURALES	- 71 -
1.3. CAS PARTICULIER DES LIANTS PROTÉIQUES.....	- 72 -
2. SYSTÈMES MODÈLES ÉTUDIÉS	- 75 -
3. CARACTÉRISATION DES COMPOSÉS UTILISÉS POUR LA FORMULATION DES PEINTURES MODÈLES	- 77 -
3.1. LE BLANC DE PLOMB	- 77 -
3.2. LE LYSOZYME.....	- 81 -
3.2.1. <i>Caractérisation par micro-Raman</i>	- 81 -
3.2.2. <i>Etude protéomique</i>	- 85 -
3.3. L'HUILE DE LIN	- 89 -
4. ETUDE DES PEINTURES MODÈLES.....	- 90 -
4.1. PEINTURE MODÈLE BLANC DE PLOMB-LYSOZYME.....	- 90 -
4.1.1. <i>Etude structurale par micro-Raman</i>	- 90 -
4.1.2. <i>Analyse protéomique: identification de modifications chimiques</i>	- 94 -
4.2. PEINTURE MODÈLE BLANC DE PLOMB-LYSOZYME-HUILE DE LIN	- 95 -
4.2.1. <i>Etude structurale par micro-Raman</i>	- 95 -
4.2.2. <i>Analyse protéomique: identification de modifications chimiques</i>	- 100 -
5. EFFET DU VIEILLISSEMENT SUR LES PEINTURES MODÈLES.....	- 104 -
5.1. VIEILLISSEMENT ARTIFICIEL	- 104 -
5.1.1. <i>Etude par micro-Raman</i>	- 104 -
5.1.2. <i>Analyse protéomique</i>	- 108 -
5.2. VIEILLISSEMENT NATUREL	- 110 -
5.2.1. <i>Etude par micro-Raman</i>	- 110 -
5.2.2. <i>Analyse protéomique</i>	- 112 -
6. DISCUSSION.....	- 116 -
6.1. PEINTURES NON-VIEILLIES.....	- 116 -

6.2. MODIFICATIONS CHIMIQUES INDUITES PAR LA PRÉSENCE D'HUILE DE LIN DANS LA PEINTURE NON-VIEILLIE.....	- 117 -
6.3. EFFET DU VIEILLISSEMENT ARTIFICIEL.....	- 119 -
6.4. EFFET DU VIEILLISSEMENT NATUREL	- 122 -
7. CONCLUSION	- 123 -
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 125 -
ANNEXES	- 131 -

LISTE DES TABLES ET FIGURES

TABLE 2-1: PROTEINES MAJORITAIRES DU BLANC D'ŒUF ³²	- 76 -
TABLE 2-2: TABLE DE CORRELATION (<i>[R]</i> SIGNIFIE QUE LE MODE EST ACTIF EN RAMAN)	- 79 -
TABLE 2-3: CARACTERISTIQUES DES COMPOSANTES ISSUES DE LA DECOMPOSITION DE LA BANDE AMIDE I DU LYSOZYME NATIF	- 84 -
TABLE 2-4: RESULTAT MASCOT POUR L'ANALYSE DU DIGEST DE LYSOZYME NATIF PAR MALDI-TOF-TOF.....	- 88 -
TABLE 2-5: CARACTERISTIQUES DES COMPOSANTES ISSUES DE LA DECOMPOSITION DE LA BANDE AMIDE I DU LYSOZYME UTILISE EN LIANT DE PEINTURE AVEC LE BLANC DE PLOMB	- 93 -
TABLE 2-6: CARACTERISTIQUES DES COMPOSANTES ISSUES DE LA DECOMPOSITION DE LA BANDE AMIDE I DU LYSOZYME UTILISE EN LIANT D'UNE PEINTURE COMPOSEE DE BLANC DE PLOMB, LYSOZYME ET HUILE DE LIN	- 99 -
TABLE 2-7: MODIFICATIONS CHIMIQUES IDENTIFIEES SUR LE LYSOZYME EXTRAIT DE LA PEINTURE BLANC DE PLOMB, LYSOZYME ET HUILE DE LIN NON-VIEILLIE	- 104 -
TABLE 2-8: RESULTATS OBTENUS PAR ANALYSES RAMAN ET PROTEOMIQUE POUR CHAQUE PEINTURE MODELE.....	- 115 -
TABLE 2-9: MODIFICATIONS CHIMIQUES IDENTIFIEES SUR LE LYSOZYME EXTRAIT DES DIFFERENTS ECHANTILLONS DE PEINTURE	- 116 -
FIGURE 2-1: PHOTOGRAPHIES DE LA VOUTE DE L'EGLISE ABBATIALE DE SAINT-SAVIN SUR GARTEMPE (VIENNE, FRANCE) (<i>SOURCE : HTTP://FRANCE.JEDITOO.COM/POITOUCHAR/ABBAYE-ST-SAVIN.HTM</i>).....	- 72 -
FIGURE 2-2: FORMULES SEMI-DEVELOPPEES DES ACIDES GRAS TROUVES MAJORITAIREMENT DANS L'HUILE DE LIN.....	- 76 -
FIGURE 2-3: A) STRUCTURE CRISTALLINE DE $2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$ B) PROJECTION DE LA COUCHE A LE LONG DE [001] C) PROJECTION DE LA COUCHE B LE LONG DE [001] (<i>SCHEMAS ISSUS DE LA PUBLICATION DE MARTINETTO ³⁹</i>). -	- 78 -
FIGURE 2-4: SPECTRE MICRO-RAMAN ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) DE L'HYDROCERUSITE SYNTHETIQUE ($2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$).....	- 78 -
FIGURE 2-5: SPECTRES MICRO-RAMAN ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) DU BLANC DE PLOMB.....	- 80 -
FIGURE 2-6: REPRESENTATION DES DIFFERENTS MODES DE VIBRATION DES IONS CARBONATES	- 80 -
FIGURE 2-7: SPECTRE MICRO-RAMAN ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) DU LYSOZYME COMMERCIAL.....	- 81 -
FIGURE 2-8: STRUCTURE SECONDAIRE D'UNE PROTEINE ET REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES FEUILLETS B.....	- 82 -
FIGURE 2-9: SPECTRE MICRO-RAMAN ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) DU LYSOZYME ENREGISTRE ENTRE $1500 \text{ ET } 1800 \text{ cm}^{-1}$	- 83 -
FIGURE 2-10: DECOMPOSITION DE LA BANDE AMIDE I DU LYSOZYME NATIF	- 84 -
FIGURE 2-11: SEQUENCE EN ACIDES AMINES DU LYSOZYME DU BLANC D'ŒUF DE POULE (<i>GALLUS GALLUS</i>).....	- 85 -
FIGURE 2-12: SPECTRE DU LYSOZYME COMMERCIAL	- 86 -
FIGURE 2-13: SPECTRE MS OBTENU PAR ANALYSE MALDI-TOF-TOF DU DIGEST DE LYSOZYME NATIF	- 87 -
FIGURE 2-14: HAUT : REACTION DE CARBAMIDOMETHYLATION SE PRODUISANT ENTRE LA CYSTEINE ET L'IDOACETAMIDE BAS : REACTION DE PYRO-CARBAMIDOMETHYLATION SE PRODUISANT ENTRE UNE CYSTEINE EN POSITION N-TERMINALE ET L'IDOACETAMIDE	- 87 -
FIGURE 2-15: RECOUVREMENT DE SEQUENCE OBTENU LORS DE L'ANALYSE DU DIGEST DE LYSOZYME PAR MALDI-TOF-TOF (PEPTIDES IDENTIFIES INDIQUES EN ROUGE)	- 88 -
FIGURE 2-16: SPECTRE MICRO-RAMAN ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) DE L'HUILE DE LIN.....	- 89 -
FIGURE 2-17: SPECTRES MICRO-RAMAN ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) DU LYSOZYME, DE LA PEINTURE COMPOSEE DE BLANC DE PLOMB ET DE LYSOZYME ET DU BLANC DE PLOMB	- 90 -

FIGURE 2-18: SPECTRES MICRO-RAMAN ($\lambda=632,8$ nm) DU LYSOZYME, DE LA PEINTURE COMPOSEE DE BLANC DE PLOMB ET DE LYSOZYME ET DU BLANC DE PLOMB ENREGISTRES ENTRE 500 ET 1025 cm^{-1} - 91 -

FIGURE 2-19: SPECTRES MICRO-RAMAN ($\lambda=632,8$ nm) DU LYSOZYME, DE LA PEINTURE COMPOSEE DE BLANC DE PLOMB ET DE LYSOZYME ET DU BLANC DE PLOMB ENREGISTRES ENTRE 1070 ET 1800 cm^{-1} - 92 -

FIGURE 2-20: DECOMPOSITION DE LA BANDE AMIDE I DU LYSOZYME UTILISE EN LIANT DE PEINTURE..... - 93 -

FIGURE 2-21: SPECTRES MS MALDI-TOF-TOF DU DIGEST DE LYSOZYME EXTRAIT DE LA PEINTURE BLANC DE PLOMB-LYSOZYME ET DU DIGEST DE LYSOZYME NATIF - 95 -

FIGURE 2-22: SPECTRES MICRO-RAMAN ($\lambda=632,8$ nm) DU LYSOZYME, DE L'HUILE DE LIN, DE LA PEINTURE COMPOSEE DE BLANC DE PLOMB, LYSOZYME ET HUILE DE LIN ET DU BLANC DE PLOMB - 96 -

FIGURE 2-23: SPECTRES MICRO-RAMAN ($\lambda=632,8$ nm) DU LYSOZYME, DE L'HUILE DE LIN, DE LA PEINTURE COMPOSEE DE BLANC DE PLOMB, LYSOZYME ET HUILE DE LIN ET DU BLANC DE PLOMB ENREGISTRES ENTRE 500 ET 1025 cm^{-1} . - 97 -

FIGURE 2-24: SPECTRES MICRO-RAMAN ($\lambda=632,8$ nm) DU LYSOZYME, DE L'HUILE DE LIN, DE LA PEINTURE COMPOSEE DE BLANC DE PLOMB, LYSOZYME ET HUILE DE LIN ET DU BLANC DE PLOMB ENREGISTRES ENTRE 1070 ET 1800 cm^{-1} - 98 -

FIGURE 2-25: DECOMPOSITION DE LA BANDE AMIDE I DU LYSOZYME UTILISE EN LIANT D'UNE PEINTURE COMPOSEE DE BLANC DE PLOMB, LYSOZYME ET HUILE DE LIN - 99 -

FIGURE 2-26: SPECTRES MS MALDI-TOF-TOF - 100 -

FIGURE 2-27: SPECTRE MS/MS DE L'ION MONOCHARGE A M/Z 1009,39 ET PRESENTANT LES FRAGMENTS Y ET B DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE WWCNDGR AVEC CARBAMIDOMETHYLATION DE LA CYSTEINE ET OXYDATION DU PREMIER TRYPTOPHANE - 102 -

FIGURE 2-28: OXYDATION DU TRYPTOPHANE EN HYDROXYTRYPTOPHANE ET N-FORMYLKYNURENINE - 103 -

FIGURE 2-29: SPECTRE MICRO-RAMAN ($\lambda=632,8$ nm) DE LA PEINTURE COMPOSEE DE BLANC DE PLOMB ET DE LYSOZYME APRES 3 SEMAINES DE VIEILLISSEMENT ARTIFICIEL (HAUT) ET NON VIEILLIE (BAS) - 106 -

FIGURE 2-30: SPECTRES MICRO-RAMAN ($\lambda=632,8$ nm) DE LA PEINTURE COMPOSEE DE BLANC DE PLOMB, LYSOZYME ET HUILE DE LIN APRES 3 SEMAINES DE VIEILLISSEMENT ARTIFICIEL (HAUT) ET NON VIEILLIE (BAS)..... - 107 -

FIGURE 2-31: SPECTRES MS MALDI-TOF-TOF DU DIGEST DE LYSOZYME EXTRAIT DE LA PEINTURE BLANC DE PLOMB LYSOZYME APRES 3 SEMAINES DE VIEILLISSEMENT ARTIFICIEL (HAUT) ET NON VIEILLIE (BAS) - 108 -

FIGURE 2-32: SPECTRES MS MALDI-TOF-TOF DU DIGEST DE LYSOZYME EXTRAIT DE LA PEINTURE BLANC DE PLOMB, LYSOZYME ET HUILE DE LIN APRES 3 SEMAINES DE VIEILLISSEMENT ARTIFICIEL (HAUT) ET NON VIEILLIE (BAS)... - 109 -

FIGURE 2-33: SPECTRES ($\lambda=632,8$ nm) MICRO-RAMAN DE LA PEINTURE COMPOSEE DE BLANC DE PLOMB ET DE LYSOZYME APRES 2 ANS DE VIEILLISSEMENT NATUREL (HAUT) ET NON VIEILLIE (BAS) - 111 -

FIGURE 2-34: SPECTRE MICRO-RAMAN ($\lambda=632,8$ nm) DE LA PEINTURE COMPOSEE DE BLANC DE PLOMB, LYSOZYME ET HUILE DE LIN APRES 2 ANS DE VIEILLISSEMENT NATUREL..... - 112 -

FIGURE 2-35: SPECTRES MS MALDI-TOF-TOF DU DIGEST DE LYSOZYME EXTRAIT DE LA PEINTURE BLANC DE PLOMB LYSOZYME APRES 2 ANS DE VIEILLISSEMENT NATUREL (HAUT) ET NON VIEILLIE (BAS) - 113 -

FIGURE 2-36: SPECTRE MS MALDI-TOF-TOF DU DIGEST DE LYSOZYME EXTRAIT DE LA PEINTURE BLANC DE PLOMB, LYSOZYME ET HUILE DE LIN APRES 2 ANS DE VIEILLISSEMENT NATUREL (HAUT) ET NON VIEILLIE (BAS)..... - 114 -

FIGURE 2-37: SPECTRES MICRO-RAMAN ($\lambda=632,8$ nm) ENREGISTRE ENTRE 500 ET 1025 cm^{-1} DE LA PEINTURE BLANC DE PLOMB-LYSOZYME. HAUT : NON EXPOSEE AUX RAYONS UV. BAS : EXPOSEE AUX RAYONS UV. - 120 -

Chapitre 2:

Le devenir des protéines dans les liants de peinture: étude spectroscopique et protéomique

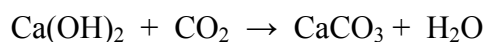
1. Introduction

1.1. Histoire et évolution de la peinture murale en Occident

Les premières peintures murales apparaissent à l'époque aurignacienne, au début du paléolithique supérieur, soit environ 30 000 ans avant J.C. Il s'agit d'empreintes de mains appliquées sur les parois des grottes. Néanmoins, c'est au magdalénien que la peinture rupestre paléolithique atteint son plein développement, ce qui est attesté par les chefs d'œuvre d'Altamira et de Lascaux. Une caractéristique générale des peintures rupestres paléolithiques est l'exécution directe sur la roche. Il faut attendre le néolithique pour voir la peinture s'associer à l'architecture. La surface naturelle de la roche fait place au plan du mur, construit et dressé par l'homme, couvert d'un enduit d'argile qui reçoit la peinture. L'essor de la technologie de l'argile est d'ailleurs l'une des caractéristiques de la nouvelle ère. Ce type de technique s'est perfectionné dans les grandes civilisations agraires où le limon des fleuves offrait la matière première des enduits comme en témoignent les revêtements des murs en Mésopotamie et en Egypte.

Dans le monde antique occidental, la Grèce et Rome ont profondément révolutionné la technique de la peinture murale en développant le principe de la fresque bien qu'il semblerait que ce principe soit apparu dans la Grèce archaïque et qu'il était déjà connu des Crétois et des Mycéniens. Des peintures grecques découvertes à Paestum et datant du V^{ème} siècle avant J.C. attestent d'une telle technique. L'élément nouveau résiderait donc dans la généralisation de la fresque et principalement dans son perfectionnement, notamment dans la composition de l'enduit et les modalités d'application mais surtout dans la généralisation du polissage qui est considéré comme un apport spécifiquement romain. La technique de la peinture murale romaine est décrite par Vitruve au livre VII de son traité sur l'architecture ¹. De nombreuses allusions y sont également faites par Pline dans son œuvre intitulée *Historiae Naturalis* ². La technique de la fresque se caractérise par la nécessité de peindre sur un enduit frais de sorte

que les pigments soient fixés par la carbonatation de la chaux. Lorsque l'enduit réalisé à base de chaux commence à sécher, l'hydroxyde de calcium, qu'il contient à l'état dissous, migre vers la surface où il réagit avec le dioxyde de carbone de l'air pour former du carbonate de calcium tandis que l'eau s'évapore.



Au cours de cette réaction, les pigments se trouvent enrobés dans les cristaux de calcite superficiels, ce qui les fixe comme s'ils devenaient partie intégrante d'une plaque de calcaire. La carbonatation se produit de la surface vers la profondeur. Il en résulte que la peinture durcit d'abord en surface et que la pellicule superficielle est généralement plus résistante que les couches sous-jacentes. Finalement, une étape de lissage réalisée manuellement avec une petite truelle appelée langue de chat va induire une certaine orientation aux cristaux de calcite et assurer une bonne cohésion de la surface peinte. La découverte des peintures de Pompéi, dont la qualité technique est des plus impressionnantes par la perfection, la dureté et la profondeur des enduits peints, témoigne d'une technique bien maîtrisée permettant d'obtenir un aspect lisse et profond rappelant le marbre poli.

A la fin de l'empire romain, on assiste à une simplification de la technique. On observe alors un enduit de moins en moins épais et un lissage de la surface qui a tendance à disparaître progressivement. Même si les artistes de l'époque se réfèrent aux traités de Plin ou de Vitruve, la technique est moins bien maîtrisée et d'importantes parties sont traitées à sec. Il se peut aussi que l'artiste, ayant préparé une surface trop grande d'enduit, ne puisse exécuter la peinture à fresque sur la totalité. Lorsque l'artiste est confronté à ce problème deux solutions s'offrent à lui. Il peut remouiller l'enduit ; cependant, la réaction de carbonatation étant irréversible, la cohésion caractéristique de la fresque ne se produira plus et il en résultera une peinture de qualité et de solidité moindres. Il peut également peindre à sec en mélangeant les pigments à un liant aqueux ou en émulsion qui va jouer le rôle de colle et permettre leur fixation sur l'enduit en séchant : c'est ce qu'on appelle peindre à la détrempe. Ces techniques, dérivées de la fresque, donnent lieu à de nombreuses variantes selon les pays. En Italie et à Byzance, on observe une certaine persistance de la « vraie » fresque, même si elle commence à différer sensiblement de la peinture pompéienne, alors que plus au Nord et notamment en France, il semble qu'on assiste davantage à des exécutions à la détrempe, du moins sur une partie importante de la peinture. La technique évolue ainsi insensiblement vers celle de la peinture romane.

La technique de la détrempe apparaît donc en Europe à l'époque romane. Elle n'est pas uniforme et varie avec les périodes et les pays. Le principal traité relatif à cette époque est

celui du moine Théophile ³. Il évoque l'utilisation de matériaux organiques mais souligne également la possibilité d'utiliser des liants différents en fonction de la couleur. Les principaux liants de détrempe utilisés en peinture murale sont l'œuf, la caséine du lait, les colles animales et certaines gommages végétales telle que la gomme arabique. Une autre technique d'exécution à sec est la peinture à l'huile : l'huile de lin et l'huile d'œillette ont été utilisées pour la peinture de chevalet comme pour la peinture murale. L'utilisation de l'huile est mentionnée dès le XII^{ème} siècle mais c'est au cours du XIV^{ème} siècle que son usage va réellement prendre de l'importance. Cet usage est d'ailleurs attesté par plusieurs auteurs en France mais aussi en Italie où Cennino Cennini décrit avec précision la technique pour peindre à l'huile sur un mur ⁴.

L'utilisation de liants organiques en peinture murale est donc liée au déclin de la technique de la fresque. Cette technique n'étant plus maîtrisée, les artistes ont dû recourir à l'emploi de substances naturelles possédant des propriétés adhésives permettant la fixation des pigments sur le support, parmi lesquelles des liants protéiques tels que l'œuf, la caséine du lait ou encore la colle animale.

1.2. L'étude scientifique des peintures murales

L'étude scientifique d'une œuvre d'art est indispensable à sa sauvegarde. En effet, l'identification de ses composants va non seulement apporter des informations d'un point de vue de l'histoire de l'art en ce qui concerne par exemple la compréhension d'une technique liée à un courant artistique en particulier, mais également permettre d'utiliser des matériaux identiques aux matériaux originaux dans le cas d'éventuels travaux de restauration, ou encore de détecter des falsifications. De plus, la compréhension des mécanismes chimiques régissant la dégradation d'une œuvre est primordiale afin de trouver les meilleures conditions de conservation. A la différence des peintures de chevalet qui attiraient beaucoup plus l'attention, l'intérêt porté aux peintures murales est apparu assez tardivement. Lorsque les scientifiques ont commencé à s'intéresser à ces œuvres, ils se sont heurtés à quelques difficultés, inhérentes pour la plupart, à la nature même de l'art mural. Tout d'abord le manque d'accessibilité: les peintures murales sont souvent des œuvres monumentales situées dans des lieux difficiles d'accès (par exemple la voûte de l'église abbatiale de Saint-Savin est située à plus de 20 m de haut). De plus, les œuvres sont dispersées géographiquement et il faut se rendre dans plusieurs pays pour procéder à un échantillonnage caractéristique. Les scientifiques sont également confrontés au manque de documentation. Encore une fois,

contrairement à la peinture de chevalet, peu d'indications concernant les matériaux utilisés en peinture murale sont disponibles mis à part les techniques relatives à la chaux. Finalement, les conditions de conservation sont également à prendre en compte, particulièrement lorsqu'on s'intéresse aux matériaux organiques. Ceux-ci, fragiles par nature, ont souvent été soumis à des conditions environnementales dégradantes. De plus, des interventions de restauration et/ou de consolidation humaines ont pu être effectuées par le passé, ce qui rend l'identification de ces matériaux encore plus délicate.



Figure 2-1: Photographies de la voûte de l'église abbatiale de Saint-Savin sur Gartempe (Vienne, France) (source : <http://france.jeditoo.com/PoitouChar/abbaye-st-savin.htm>)

1.3. Cas particulier des liants protéiques

Différentes méthodes ont été proposées au cours des dernières décennies afin d'identifier les liants protéiques utilisés en peinture (caséine, œuf, colle animale). Les premières méthodes développées étaient des méthodes de détection permettant de localiser les protéines dans des coupes stratigraphiques de peinture. On peut citer notamment les techniques de coloration ou de détection par immunofluorescence⁵⁻⁷. Toutefois, ces méthodes ne permettent pas une identification précise des protéines et ne peuvent en aucun cas fournir d'informations concernant la dégradation de ces biomolécules. L'identification de composés organiques dans des objets d'art par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est apparue dans les années 1990⁸⁻¹¹. Cette technique, dont l'avantage principal est la possibilité d'identifier différents types de molécules au sein d'un même échantillon (protéines, lipides, terpènes...) ^{12,13} s'est très vite imposée pour l'identification de liants et c'est la technique la plus utilisée de nos jours ¹⁴. Toutefois, en ce qui concerne les liants protéiques, leur identification par GC-MS repose sur l'hydrolyse totale des protéines en acides aminés. Ainsi, cette technique ne peut fournir d'informations liées à la structure des protéines, ce qui n'en privilégie pas l'utilisation en ce qui concerne la compréhension des mécanismes d'interaction

et/ou de dégradation des liants protéiques. Or, cet aspect est très important pour la conservation des œuvres. Différentes études, visant à comprendre les mécanismes de dégradation liés au vieillissement des peintures ont tout de même été réalisées par le passé. La technique de la détrempe à l'œuf ayant été très utilisée en Europe, différentes études ont été menées afin de comprendre par exemple l'effet de la lumière sur de telles formulations de peinture. Les résultats issus de ces études ont surtout permis d'identifier les produits d'oxydation des lipides présents dans le jaune d'œuf ou dans les huiles¹⁵⁻¹⁸. Des études plus approfondies concernant la formation de ces composés ont ensuite été réalisées principalement par spectrométrie de masse. Ainsi, des marqueurs permettant d'identifier les produits d'oxydation des phosphatidylcholines, des triglycérides et du cholestérol de l'œuf¹⁹,²⁰ et de l'huile de lin ont été mis en évidence^{21,22}.

En ce qui concerne les liants protéiques, les mécanismes de dégradation sont encore très mal connus à l'heure actuelle et peu d'études ont été publiées jusqu'à présent. En 2000, une équipe italienne a réalisé des expériences de vieillissement artificiel (UV, température et humidité) afin d'évaluer la dégradation de différents liants¹⁶. Les résultats de l'analyse par GC-MS suggèrent, dans le cas d'un liant à l'œuf (œuf entier), qu'après vieillissement artificiel le profil d'acides aminés présente une diminution en acides aminés lysine et tyrosine. La perte de lysines pourrait être expliquée par réaction des groupements amines des lysines avec les hydroperoxydes provenant des lipides ou avec les groupes carbonyles des carbohydrates. Quant à la perte de tyrosines, elle pourrait être due à la photo oxydation de ces acides aminés. Plus tard, en 2004, une étude a été menée afin de comprendre l'effet du blanc de plomb sur des liants protéiques. L'analyse par FTIR montre que le maximum de la bande attribuée au mode de vibration dit amide I est déplacé vers les plus grands nombres d'onde. Afin d'expliquer ce changement, deux théories différentes ont été exposées. Selon la première théorie, le déplacement du maximum de la bande amide I vers les plus grands nombres d'onde résulte de l'influence des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau sur les sites d'hydratation des protéines (C=O et N-H) alors que d'autres personnes l'attribuent plus simplement à un changement de structure secondaire des protéines²³. Néanmoins, aucune autre étude n'a été entreprise par la suite afin d'approfondir ces résultats préliminaires.

Ce n'est que récemment que de nouvelles études focalisées sur les liants protéiques ont été publiées. Différentes techniques ont été employées dans ce but en particulier la fluorescence et la spectroscopie Raman. Les premières études ont montré qu'il était possible de différencier les liants protéiques couramment utilisés en peinture, parmi lesquels le jaune et le blanc d'œuf, la caséine et différentes colles animales, à partir de la fluorescence émise par les acides

aminés constituant les protéines^{24,25}. L'analyse Raman de ces liants protéiques a conduit au même résultat c'est-à-dire que les spectres Raman de chaque liant présentent des particularités pouvant conduire à leur identification²⁶. Néanmoins, ces études ont été réalisées sur des films de protéines seules. Afin de valider ces résultats, l'analyse d'échantillons reproduisant des couches picturales doit être réalisée. Toutefois, l'influence de la lumière et de certains pigments sur les spectres de fluorescence de plusieurs liants protéiques a été étudiée^{27,28}. Ces auteurs ont observé que l'exposition à la lumière entraînait une augmentation d'intensité du signal de fluorescence émis à 435 nm. Cette fluorescence est attribuée aux produits de dégradation des protéines et en particulier aux molécules résultant de l'oxydation des acides aminés tryptophanes. Les résultats de l'analyse par spectroscopie Raman concernant des films de blanc d'œuf exposés et non exposés à la lumière ont montré que la bande Raman attribuée aux tryptophanes n'était plus observée après exposition de l'échantillon à la lumière²⁹. Des changements relatifs aux liaisons C-S ont également été observés et attribués à des réactions de photo-oxydation.

Ainsi, les études concernant la dégradation des liants protéiques ont été principalement réalisées sur des films de protéine, c'est-à-dire sans pigment. Même si certains changements, notamment sur les spectres de fluorescence et les spectres Raman, ont été montrés, des études sur des peintures doivent être réalisées afin de comprendre ce qui se passe dans de tels systèmes. Seule une étude préliminaire réalisée par FTIR sur des peintures modèles vieilles artificiellement a été publiée³⁰. Les résultats indiquent que la zone spectrale affectée par le processus de vieillissement correspond à la bande amide I des protéines. Néanmoins, aucune conclusion n'a pu être tirée quant aux mécanismes responsables de ce changement.

L'étude bibliographique montre que quelques études préliminaires sur des liants protéiques ont été réalisées mais que des études approfondies sur des peintures sont indispensables. Ainsi, nous avons décidé dans cette thèse de nous intéresser dans un premier temps à l'interaction pigment-protéine dans une peinture et ensuite aux effets du vieillissement sur ces constituants. Pour cela, nous avons eu recours à deux techniques différentes : la spectroscopie Raman et la protéomique. En effet, la spectroscopie Raman nous permet d'étudier les changements structuraux concernant le pigment mais aussi le liant, ce qui nous renseigne sur l'ensemble du système étudié. D'autre part, la protéomique nous permet d'étudier les modifications chimiques apparaissant sur les protéines et donc peut nous renseigner quant aux mécanismes chimiques impliqués dans la dégradation des protéines.

L'utilisation de ces deux techniques nous permet donc d'obtenir des informations complémentaires et permet une étude globale du système étudié.

2. Systèmes modèles étudiés

Ce chapitre a pour but l'étude des protéines dans les liants de peinture. Afin de réaliser les différentes expériences nécessaires à notre étude, nous avons travaillé sur des peintures modèles.

Concernant le pigment, nous avons choisi de travailler avec le blanc de plomb qui fût le seul pigment blanc utilisé depuis l'Antiquité et jusqu'à la moitié du XX^{ème} siècle. Ce pigment était également mélangé à d'autres pigments pour obtenir des teintes particulières (bleu du ciel, rose des carnations³¹...). Le premier procédé de fabrication du blanc de plomb remonte à l'époque romaine : des feuilles de plomb étaient exposées à des vapeurs de vinaigre dans un récipient en argile formant ainsi de l'acétate de plomb. Ces pots étaient placés sous du fumier, riche en dioxyde de carbone, afin de transformer l'acétate en carbonate. La croute de blanc de plomb ainsi formée était séparée du métal n'ayant pas réagi, puis broyée et lavée. En France, un nouveau procédé mis au point par Thénard en 1801 en facilita la production industrielle. L'utilisation considérable du blanc de plomb se comprend aisément puisque ce composé était utilisé non seulement comme pigment mais intervenait aussi dans la couche de préparation et dans l'*imprimatura* en peinture de chevalet. De plus, le blanc de plomb s'associe avec une grande variété de liants, il se combine avec un liant à l'œuf et se mélange tout aussi bien avec une huile siccatrice. Même si ce pigment possède de réelles qualités du point de vue artistique, c'est sa toxicité qui a conduit à l'interdiction de son utilisation industrielle.

Pour le liant, nous avons choisi de travailler avec l'œuf, un liant caractéristique de la technique de la détrempe qui était utilisé soit seul (jaune ou blanc ou œuf entier) soit en émulsion avec de l'huile. L'œuf étant un liant protéique complexe composé de plusieurs protéines mais également de lipides pour le jaune, nous avons décidé de nous focaliser sur le blanc d'œuf, constitué à 90% de protéines et à 10% d'eau. Néanmoins, le blanc d'œuf reste un liant protéique complexe car il est composé de plusieurs protéines appartenant à des classes différentes (voir table 2-1), nous avons donc décidé de le modéliser par une seule des protéines entrant dans sa composition.

Protéine	Proportion	Poids Moléculaire
Ovalbumine	54%	42 881 Da
Ovotransferrine	13%	77 777 Da
Ovomucoïde	11%	22 591 Da
Lysozyme	3,5%	16 239 Da
Ovomucine	1,5%	233 553 Da
Flavoprotéine	0,8%	72 931 Da
Ovoinhibiteur	0,1%	51 920 Da
Avidine	0,05%	16 768 Da

Table 2-1: Protéines majoritaires du blanc d'œuf ³²

Le lysozyme n'est pas la protéine majoritaire du blanc d'œuf, toutefois cette protéine a été choisie pour notre étude car, d'une part, c'est l'une des premières protéines à avoir été séquencée et sa structure est bien connue ³³⁻³⁶, d'autre part, son faible poids moléculaire représente un critère de choix pour l'analyse par spectrométrie de masse.

Les émulsions huile-œuf ayant été très utilisées en liant de peinture, nous avons décidé de travailler aussi sur des peintures modèles contenant de l'huile. Dans ce cas, l'œuf a également été remplacé par une solution de lysozyme et l'huile que nous avons utilisée est de l'huile de lin. Cette huile, riche en acides gras polyinsaturés, se compose principalement d'acide linoléique (45 à 70%), d'acide linoléique (12 à 24%) et d'acide oléique (10 à 21%). Elle était très prisée des artistes pour ses propriétés siccatives c'est-à-dire sa capacité à polymériser spontanément avec l'air ce qui conférait un séchage très rapide à la peinture.

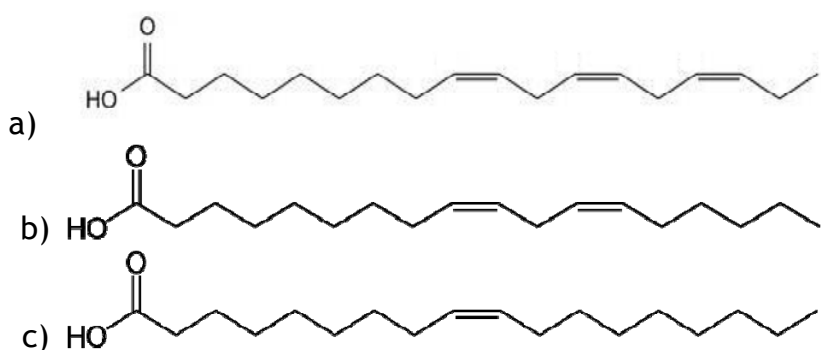


Figure 2-2: Formules semi-développées des acides gras trouvés majoritairement dans l'huile de lin a) acide linoléique b) acide linoléique c) acide oléique

Ainsi, les systèmes modèles que nous avons préparés pour cette étude sont :

- une peinture composée uniquement de pigment et de protéines (blanc de plomb et lysozyme), ce qui nous permet d'étudier l'interaction pigment-protéine et d'évaluer l'effet du vieillissement sur ces deux composés.

- une peinture composée de pigment, protéines et lipides (blanc de plomb, lysozyme et huile de lin). Cette formulation va nous permettre de déterminer l'incidence de la présence d'huile sur le liant protéique.

3. Caractérisation des composés utilisés pour la formulation des peintures modèles

Les peintures modèles étudiées dans ce travail sont composées de blanc de plomb, d'un liant protéique modélisé par le lysozyme et dans certains cas d'huile de lin. Avant de s'intéresser à l'étude de ces peintures modèles, nous avons caractérisé les différents composés utilisés pour leur formulation.

3.1. Le blanc de plomb

Le pigment blanc de plomb est en général considéré comme étant de l'hydrocérusite, un carbonate de plomb basique de formule $2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$. Toutefois, des analyses réalisées sur différentes peintures de la Renaissance ont montré que ce pigment pouvait également être un mélange d'hydrocérusite et de cérusite (PbCO_3) ou alors uniquement de la cérusite³⁷. Dans cette étude, nous avons décidé d'utiliser de l'hydrocérusite synthétique pure à 99% pour la préparation de nos peintures modèles. Par ailleurs, ce pigment est intéressant car il possède l'avantage de ne pas se dégrader sous le faisceau laser du spectromètre Raman ce qui permet des analyses avec des temps d'exposition assez longs³⁸. L'analyse par diffraction de rayons X a permis de mettre en évidence la structure cristalline de l'hydrocérusite synthétique³⁹ : deux couches distinctes (A et B) sont empilées suivant un schéma BAABAA... (figure 2-3). La couche A est composée d'atomes de plomb (Pb) et de groupes carbonates (CO_3) alors que la couche B est composée d'atomes de plomb et de groupes hydroxyles (OH).

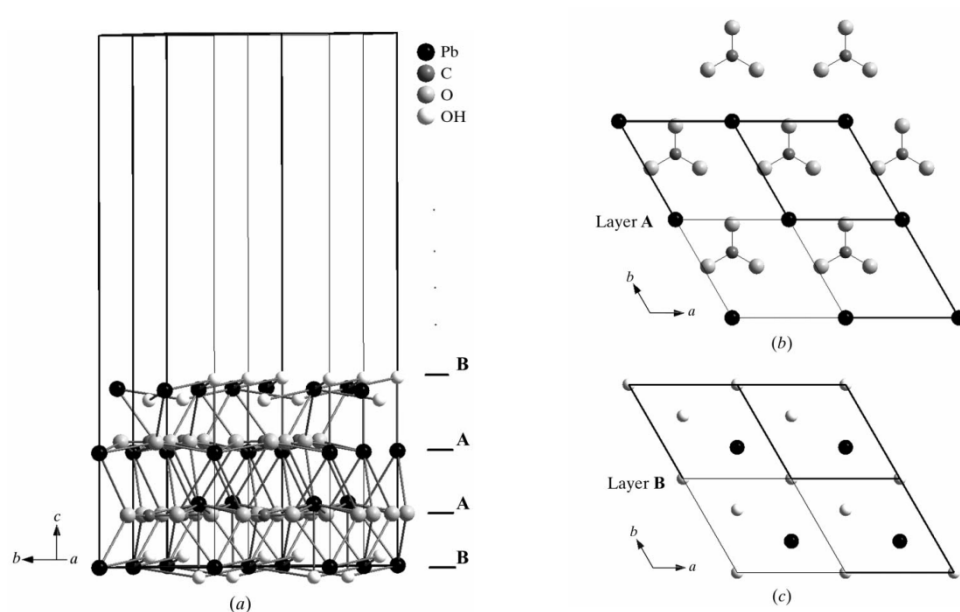


Figure 2-3: a) Structure cristalline de $2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$ b) Projection de la couche A le long de $[001]$ c) Projection de la couche B le long de $[001]$
(schémas issus de la publication de Martinetto ³⁹)

Afin de caractériser le blanc de plomb que nous avons utilisé, nous avons enregistré son spectre Raman.

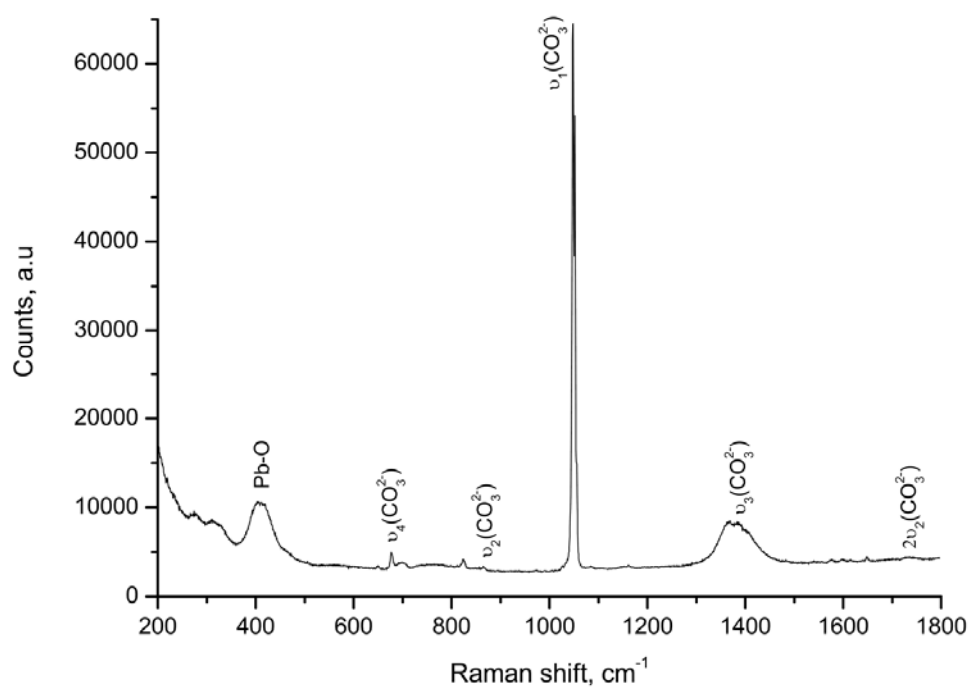


Figure 2-4: Spectre micro-Raman ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) de l'hydrocérusite synthétique ($2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$)

La majorité des bandes sont attribuées aux vibrations fondamentales des ions carbonates et pour justifier ces attributions nous pouvons établir une comparaison entre

l'entité PbCO_3 de l'hydrocérusite et la cérusite de formule PbCO_3 . Le minéral cérusite dont la structure cristalline est orthorombique se classe dans le groupe de l'aragonite (CaCO_3)⁴⁰. Les minéraux de ce groupe appartiennent au groupe d'espace P_{mcn} et au groupe ponctuel de symétrie D_{2h} . Les tables de caractères issues de la théorie des groupes indiquent que pour le groupe D_{2h} les 4 modes en g sont actifs en Raman et les modes en u sont actifs en infrarouge excepté le mode A_u qui est totalement inactif.

Groupe de symétrie de l'ion carbonate libre (CO_3^{2-}) : D_{3h}	Symétrie du site C_2	Groupe de symétrie du groupe carbonate (CO_3^{2-}) dans le cristal PbCO_3 : D_{2h}
A_1' (ν_1) [R]	A [IR + R]	A_g [R]
A_2'		B_{1g} [R]
E' [IR + R]	B [IR + R]	B_{2g} [R]
A_1''		B_{3g} [R]
A_2'' (ν_2) [IR]		A_u
E'' ($\nu_3 ; \nu_4$) [R]		B_{1u} [IR]
		B_{2u} [IR]
		B_{3u} [IR]

Table 2-2: Table de corrélation ([R] signifie que le mode est actif en Raman)

Le spectre du blanc de plomb se caractérise par une bande très intense à $\sim 1050 \text{ cm}^{-1}$. En réalité cette bande, attribuée au mode de vibration ν_1 des ions carbonates (CO_3^{2-}) consiste en 2 raies situées à 1048 et 1052 cm^{-1} (figure 2-4). Deux composantes actives en Raman sont issues du mode de vibration ν_1 : A_g et B_{2g} comme indiqué par la table de corrélation (voir table 2-2). Cependant, pour la majorité des minéraux appartenant au groupe de l'aragonite (CaCO_3), la vibration A_g est très intense mais la composante B_{2g} s'observe difficilement. Dans notre cas deux bandes sont observées (voir figure 2-5 gauche) et pour interpréter ce dédoublement nous suivons l'analyse effectuée par Brooker *et al.* qui indique que ce dédoublement est dû à la présence d'entités carbonates sur deux types de sites non équivalents dans l'hydrocérusite⁴¹.

Deux bandes d'intensité moyennes sont observées à ~ 410 et $\sim 1380 \text{ cm}^{-1}$. La bande à 410 cm^{-1} ne correspond pas à un mode de vibration des ions carbonates mais à la vibration d'élongation de la liaison Pb-O⁴²⁻⁴⁴. La bande à $\sim 1380 \text{ cm}^{-1}$ est attribuée au mode de vibration ν_3 des ions carbonates. Tout comme la vibration ν_1 , cette bande est éclatée en plusieurs composantes. En effet, la théorie des groupes prédit 4 composantes actives en Raman pour le mode de vibration ν_3 ($A_g, B_{1g}, B_{3g}, B_{2g}$)⁴⁰. Par rapport à la vibration ν_1 ces

composantes sont moins bien résolues mais peuvent tout de même être distinguées les unes des autres comme montré sur la figure 2-5 à droite. Ici, on peut voir 3 composantes à 1368, 1385 et 1408 cm^{-1} qui peuvent être attribuées respectivement aux modes A_g , B_{1g} et B_{3g} . La bande associée au mode B_{2g} est observée à 1483 cm^{-1} .

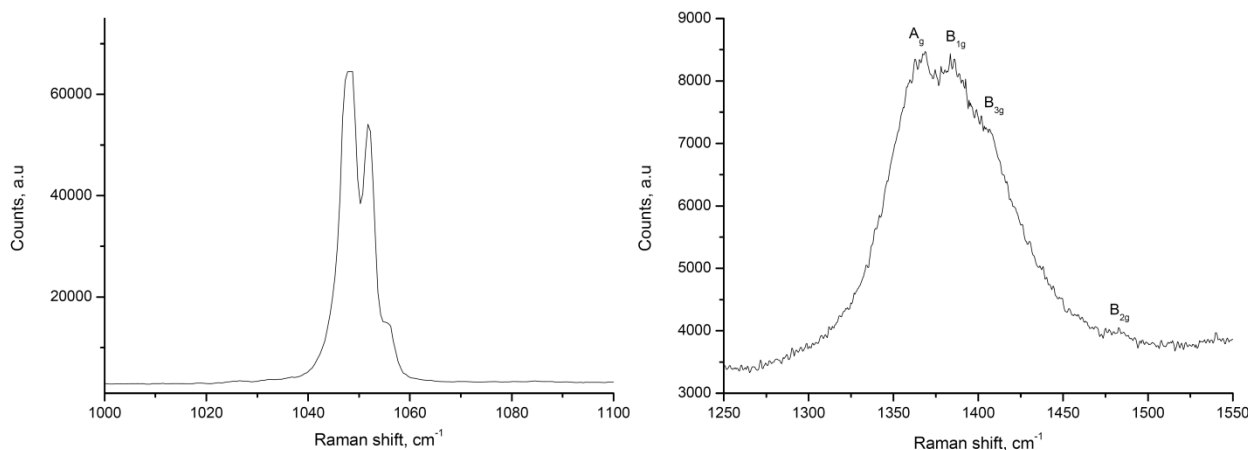


Figure 2-5: Spectres micro-Raman ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) du blanc de plomb

À gauche : dédoublement de la raie attribuée au mode de vibration ν_1 des ions carbonates

À droite : composantes de la raie attribuée au mode de vibration ν_3 des ions carbonates

Enfin, plusieurs bandes de faible intensité sont observées. La bande à 676 cm^{-1} est attribuée au mode de vibration ν_4 des ions carbonates. La table de corrélation montre que cette bande se décompose en 4 composantes actives en Raman (A_g , B_{1g} , B_{3g} , B_{2g}) ; néanmoins à cause de la faible intensité de cette transition, les 4 composantes ne sont pas aisément identifiées. Ici, on observe uniquement celle à 676 cm^{-1} attribuée à la composante A_g . La bande à 867 cm^{-1} est attribuée au mode de vibration ν_2 . En théorie, il y a deux composantes actives en Raman pour cette vibration (B_{1g} et B_{3g}) mais la composante B_{3g} n'est pas détectée de manière distincte sur le spectre Raman. La bande observée à 1732 cm^{-1} est attribuée à une harmonique correspondant à $2\nu_2$ ⁴¹.

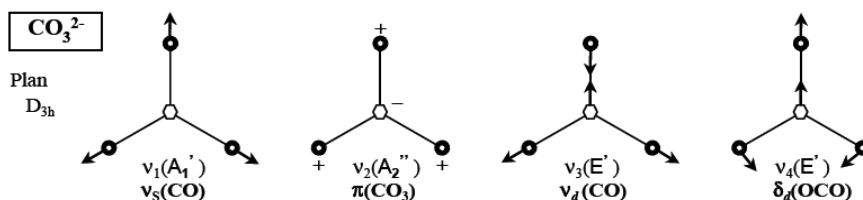


Figure 2-6: Représentation des différents modes de vibration des ions carbonates

Le spectre Raman du blanc de plomb se caractérise également par une bande à $\sim 3540 \text{ cm}^{-1}$ de faible intensité attribuée à l'élongation des groupements hydroxyles OH de l'entité de Pb-OH.

3.2. Le lysozyme

3.2.1. Caractérisation par micro-Raman

3.2.1.1. Spectre de la protéine native

Le spectre Raman du lysozyme commercial utilisé dans la formulation des peintures modèles se caractérise par la présence de plusieurs bandes intenses (voir figure 2-7) dont la bande attribuée aux liaisons S-S caractérisant les ponts disulfures, les bandes attribuées aux acides aminés tryptophanes (760, 1011, 1550 cm^{-1}) et phénylalanines (1003 cm^{-1}), les bandes dues aux déformations des groupements CH (1450 cm^{-1}) et CH_2 (1340 cm^{-1}) des chaînes latérales et les bandes dites amide I (1660 cm^{-1}) et amide III (1250 cm^{-1}).

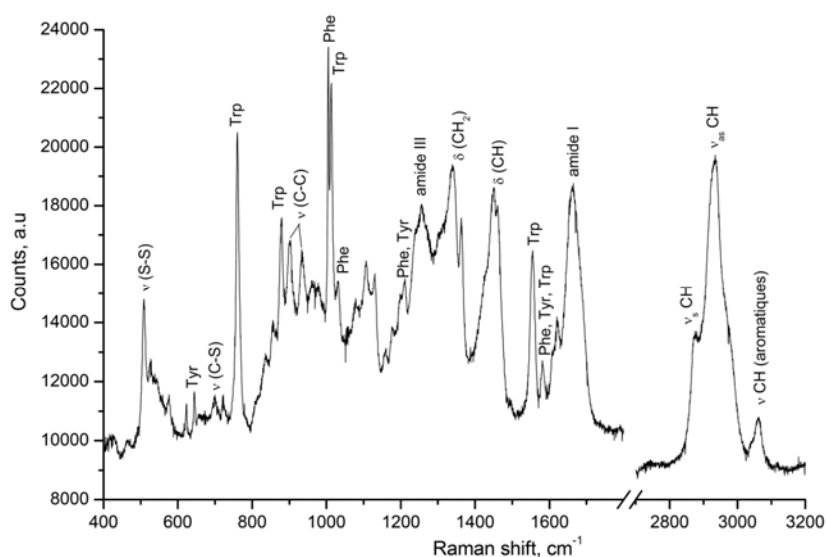


Figure 2-7: Spectre micro-Raman ($\lambda=632,8$ nm) du lysozyme commercial

Le spectre du lysozyme se caractérise également par la présence de bandes entre 2800 et 3100 cm^{-1} dues à l'élongation des groupements CH_3 , CH_2 et CH aliphatiques et aromatiques.

3.2.1.2. Détermination de la structure secondaire du lysozyme par décomposition de la bande amide I

3.2.1.2.1. Structure secondaire d'une protéine : définition

La structure primaire d'une protéine correspond à la succession linéaire des acides aminés la constituant sans référence à une structure spatiale. La structure secondaire se

rapporte à la description de la structure tridimensionnelle localement adoptée par certains segments de molécules biologiques (protéines, ADN, ARN).

En ce qui concerne les protéines, la structure secondaire est définie par des arrangements de liaisons hydrogènes entre les groupements -NH et -CO du squelette peptidique. Les structures secondaires les plus courantes sont les hélices α et les feuillets β (voir figure 2-8). L'hélice α est une structure périodique très fréquente dans le repliement des protéines et des peptides. Elle se caractérise par la formation de liaisons hydrogènes entre le groupement -CO d'un résidu i et le groupement -NH d'un résidu $i+4$. D'autres types d'hélices, comme les hélices 3_{10} et les hélices π sont prédites comme ayant des arrangements favorables de liaisons hydrogènes, mais ne sont observées que de manière exceptionnelle dans les protéines naturelles, sauf à l'extrémité des hélices α . Le brin β est une structure périodique étendue. Les liaisons hydrogènes qui le stabilisent se font entre résidus distants plutôt qu'entre résidus consécutifs, comme dans le cas de l'hélice α . En fait, un brin β seul n'est pas stable. Il a besoin de former des liaisons hydrogènes avec d'autres brins β pour se stabiliser. On parle alors de feuillets β . Les feuillets β ne sont pas plans, ils présentent un plissement sur leur surface, avec des plis alternativement orientés vers le haut et vers le bas. Les résidus acides aminés sont placés face à face dans deux chaînes qui peuvent se déployer, soit en sens contraire (feuillelet β antiparallèle), soit dans le même sens (feuillelet β parallèle) comme montré sur la figure 2-8. Des coudes (β turn), régions où le squelette change brutalement de direction, et des régions flexibles et irrégulières connectent entre eux les éléments réguliers que sont les hélices et les feuillets. La pelote aléatoire n'est pas à proprement parler une structure secondaire, mais plutôt une catégorie par défaut, dans laquelle on classe les conformations qui ne correspondent pas à une structure secondaire régulière.

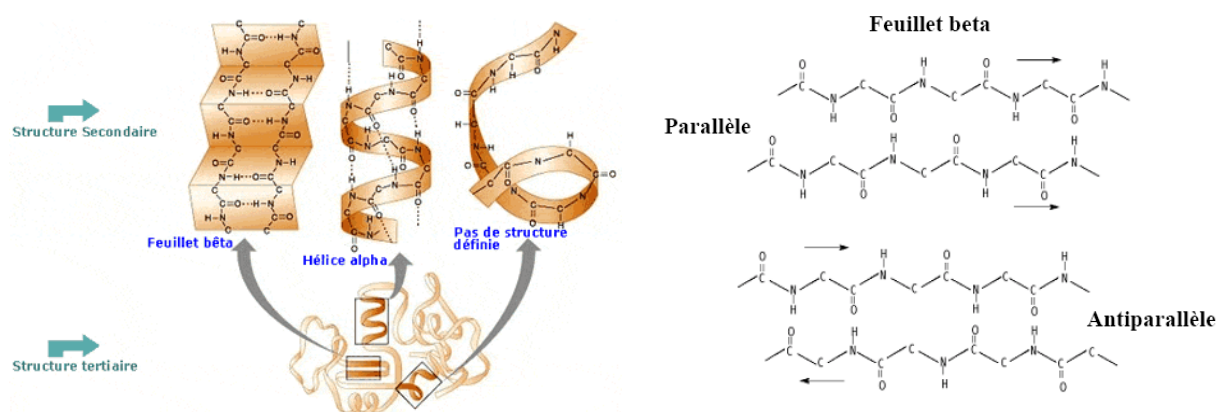


Figure 2-8: Structure secondaire d'une protéine et représentation schématique des feuillets β

3.2.1.2.2. Structure secondaire du lysozyme

La chaîne principale du lysozyme est constituée de 129 acides aminés. Le domaine α de la protéine est composé de quatre hélices (trois hélices α et une hélice 3_{10}) alors que le domaine β est constitué d'un feuillet anti-parallèle et d'une boucle⁴⁵. Le spectre Raman dans la région caractéristique de la bande dite amide I présente plusieurs bandes principales (voir figure 2-9). La bande dite amide I ($\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$) est une bande complexe qui peut être décomposée en plusieurs composantes⁴⁶⁻⁵⁴, chaque composante étant représentative d'un type de conformère comme cela a été expliqué dans le chapitre précédent.

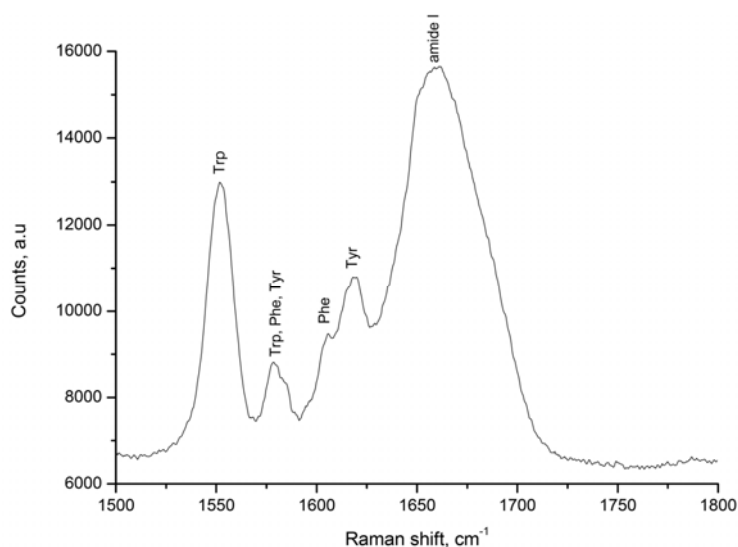


Figure 2-9: Spectre micro-Raman ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) du lysozyme enregistré entre 1500 et 1800 cm^{-1} (4 accumulations de 15 minutes)

Nous avons donc étudié la structure secondaire du lysozyme à l'état natif en utilisant la décomposition de la bande amide I. Nous remarquons que cette bande est précédée de 4 bandes (figure 2-9). Les deux bandes à 1605 et 1619 cm^{-1} attribuées respectivement aux acides aminés phénylalanines et tyrosines n'étant pas bien séparées de la bande amide I, elles ont été prises en compte lors de la décomposition spectrale.

La bande amide I a été décomposée en utilisant le logiciel Labspec, propre aux spectromètres commercialisés par la société Horiba Jobin-Yvon. La décomposition est basée sur trois critères : la position des composantes, leur profil et leur largeur. Le nombre de composantes doit être maintenu au minimum sachant que l'existence d'une bande nécessite un sens d'un point de vue structural. Dans cette étude, le profil que nous avons utilisé pour chaque composante est un mélange Gaussien/Lorentzien (avec une contribution Lorentzienne $\geq 50\%$) et nous avons fixé une largeur à mi-hauteur de 25 cm^{-1} au maximum.

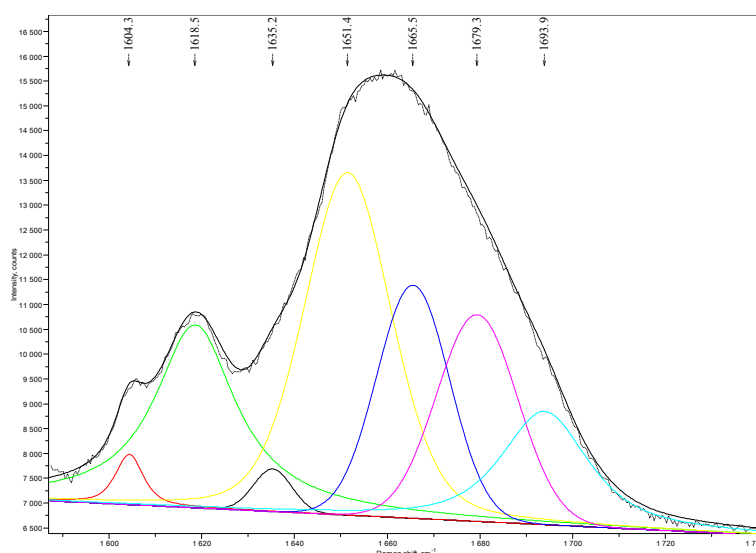


Figure 2-10: Décomposition de la bande amide I du lysozyme natif

La bande amide I du spectre expérimental (représenté en pointillés sur la figure 2-10) est donc décomposée en 5 bandes dont la position, la largeur à mi-hauteur et l'aire sont récapitulées dans la table 2-3 présentée ci-dessous. Dans les années 1980, plusieurs groupes de recherche ont proposé une décomposition de la bande amide I basée sur 3 structures : hélices α , feuilletts β et structure dite indéfinie qui regroupe les coudes et les régions en pelote statistique. Dans ce travail, nous avons décidé d'inclure une composante attribuée aux coudes, qui sont également des structures ordonnées, comme cela a été suggéré récemment par Vass et al ⁵⁵. Suivant ce modèle, la conformation en hélice α est caractérisée par une composante à $1651,4 \text{ cm}^{-1}$, les bandes à $1635,2$ et $1665,5 \text{ cm}^{-1}$ sont attribuées aux conformères de type β alors que celle à $1679,3 \text{ cm}^{-1}$ est attribuée aux coudes et enfin la composante à $1693,9 \text{ cm}^{-1}$ correspond à la structure désordonnée de la protéine. L'aire de chaque composante est liée à la proportion de chaque conformère présent dans la protéine et permet de quantifier les différentes conformations.

Raman shift, cm^{-1}	Largeur à mi-hauteur, cm^{-1}	Aire	Conformation	Pourcentage de conformère
1635,2	9,70	19619,5	Brin β	2,03
1651,4	22,19	392706	Hélices α	40,67
1665,5	18,45	204633	Feuilletts β	21,19
1679,3	20,58	202497	Coudes	20,97
1693,9	22,15	146062	Structure désordonnée	15,13

Table 2-3: Caractéristiques des composantes issues de la décomposition de la bande amide I du lysozyme natif

Les données obtenues nous permettent d'estimer la structure secondaire du lysozyme que nous avons utilisé. Nous obtenons donc ~41% d'hélices α , ~23% de conformères de type β , ~21% de coudes et 15% de régions en pelote statistique, ce qui est en accord avec les résultats présentés précédemment dans la littérature qui reportent entre 39 et 46 % d'hélices, entre 19 et 25% de conformères β et entre 32 et 41% de structures dites indéfinies^{49, 51, 56}.

3.2.2. Etude protéomique

Le lysozyme est une petite protéine globulaire que l'on rencontre dans un certain nombre de sécrétions telles que les larmes, la salive, le lait maternel et dans le blanc d'œuf. Elle est sécrétée par les granulocytes et les monocytes et détruit la paroi bactérienne en catalysant l'hydrolyse des glycosaminoglycanes (GAG) la constituant. Le lysozyme du blanc d'œuf est constitué de 147 acides aminés dont les dix-huit premiers acides aminés correspondent au pré-peptide, sa formule brute est $C_{705}H_{1116}N_{214}O_{204}S_{12}$ et son poids moléculaire est de 16 239 Da. Parmi les 9 cystéines que contient le lysozyme, 8 sont reliées par des ponts disulfures (24-145, 48-133, 82-98 et 94-112). Deux ponts disulfures sont localisés dans le domaine α de la protéine (24-145 et 48-133), un autre se situe dans le domaine β (82-98) et le dernier (94-112) fait la liaison entre les deux domaines⁴⁵. La seule cystéine libre est celle en position 10 appartenant au pré-peptide.

MRSLILVLC¹⁰ FLPLAALGKV²⁰ FGRCELAAAM³⁰ KRHGLDNYRG⁴⁰ YSLGNWVCAA⁵⁰
 KFESNFNTQA⁶⁰ TNRNTDGSTD⁷⁰ YGILQINSRW⁸⁰ WCNDGRTPGS⁹⁰ RNLCNIPCSA¹⁰⁰
 LLSSDITASV¹¹⁰ NCAKKIVSDG¹²⁰ NGMNAWVAWR¹³⁰ NRCKGTDVQA¹⁴⁰ WIRGCR

Figure 2-11: Séquence en acides aminés du lysozyme du blanc d'œuf de poule (*gallus gallus*)

3.2.2.1. Analyse en protéine entière par MALDI-TOF-TOF

Afin de vérifier la masse du produit commercial, le lysozyme est d'abord analysé en protéine entière en utilisant le mode linéaire positif. Trois pics sont observés sur le spectre (figure 2-12), le premier à $m/z=7142$ correspond à la molécule protonée dans un état dichargé, le second à $m/z=14276$ correspond à la molécule protonée dans un état monochargé et enfin le dernier à $m/z=28527$ correspond au dimère protoné dans un état monochargé. Auparavant, nous avons indiqué que la masse du lysozyme était de 16,2 kDa. Cependant, si on calcule la masse du lysozyme sans pré-peptide (formule brute $C_{613}H_{959}N_{193}O_{185}S_{10}$), on obtient 14,3 kDa

ce qui correspond à la valeur lue sur le spectre de masse. Cette première analyse nous indique que la protéine commerciale est synthétisée sans pré-peptide et dans la suite de ce travail nous considérerons la protéine à partir de l'acide aminé 19. Le spectre présenté ci-dessous nous montre que l'analyse en mode linéaire conduit à l'obtention de massifs larges. Cette technique est donc peu résolutive et peu précise et il est évident que l'identification des modifications ne sera pas réalisée de cette façon.

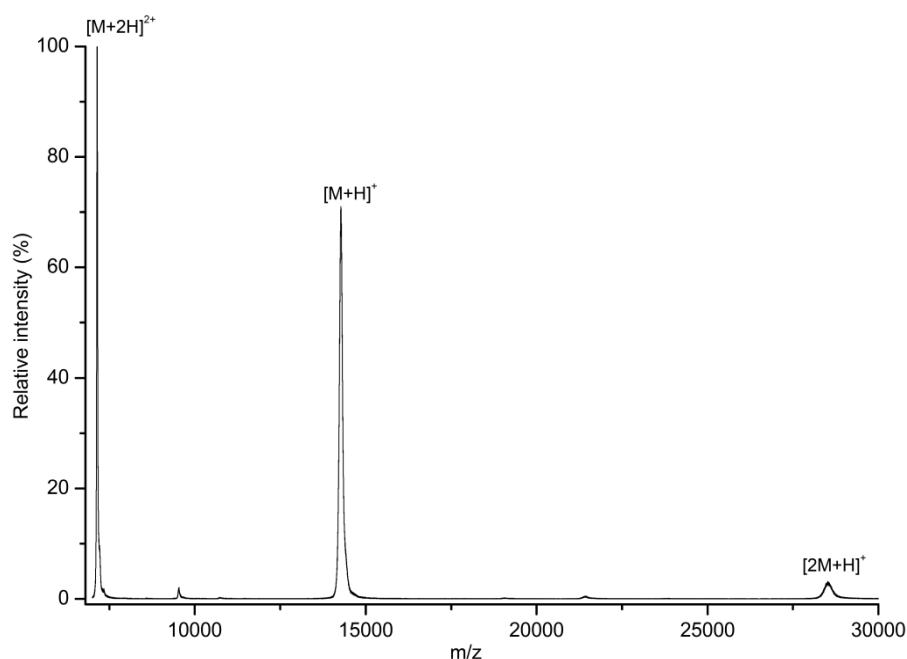


Figure 2-12: Spectre du lysozyme commercial (Analyse MALDI-TOF-TOF en mode linéaire positif)

3.2.2.2. Hydrolyse enzymatique à la trypsine

L'analyse du digest protéique s'avère être une technique plus appropriée pour atteindre l'objectif de notre étude. Afin d'identifier et de localiser les modifications apparaissant sur les protéines dans les liants de peinture, il est impératif de bien connaître le spectre de masse du digest de la protéine native. L'hydrolyse enzymatique se déroule en plusieurs étapes. La protéine est dénaturée par le trifluoroéthanol puis réduite par le dithiothreitol, ce qui entraîne la rupture des ponts disulfures. Afin d'empêcher leur reformation, la protéine est traitée avec de l'iodoacétamide, ce qui a pour effet d'alkyler les cystéines. La protéine est enfin digérée à la trypsine, une enzyme dont la spécificité est de couper derrière les acides aminés arginine et lysine sauf s'ils sont suivis d'une proline. Le spectre de masse du digest protéique ainsi obtenu représente l'empreinte peptidique de la protéine, celle du lysozyme est montrée figure 2-13.

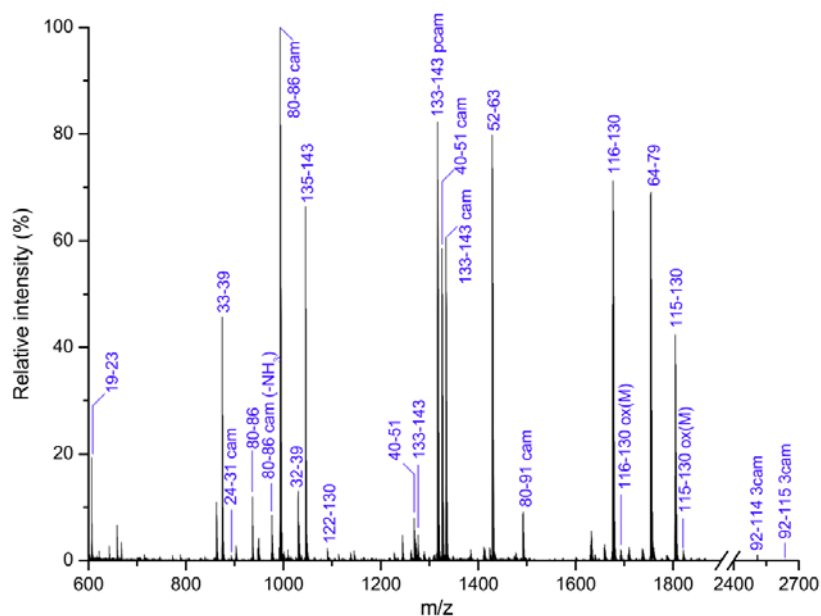


Figure 2-13: Spectre MS obtenu par analyse MALDI-TOF-TOF du digest de lysozyme natif

Après calibration du spectre de masse, la liste des rapports m/z correspondants aux pics monoisotopiques a été générée pour réaliser l'interrogation dans la banque de données Swiss-Prot *via* l'interface Mascot. Pour que tous les peptides soient identifiés correctement, nous devons préciser les modifications dites variables, c'est-à-dire pouvant être trouvées mais qui ne sont pas systématiques. Ces modifications peuvent être naturelles, comme par exemple l'oxydation des méthionines, ou alors induites par l'utilisation de certains produits chimiques comme la carbamidométhylation des cystéines qui est due à l'utilisation d'iodoacétamide.

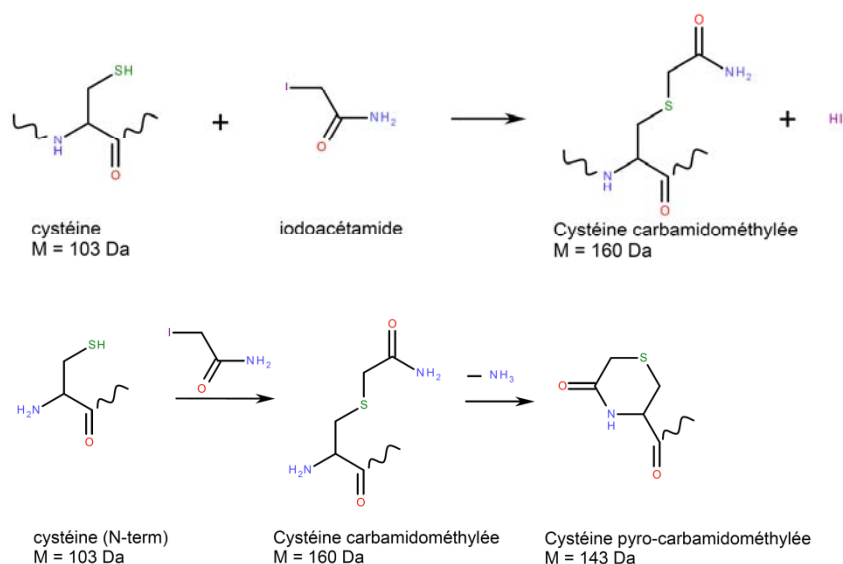


Figure 2-14: Haut : réaction de carbamidométhylation se produisant entre la cystéine et l'iodoacétamide
Bas : réaction de pyro-carbamidométhylation se produisant entre une cystéine en position N-terminale et l'iodoacétamide

Peptide	(m/z) observé	Masse expérimentale (Da)	Masse théorique (Da)	Δm (ppm)	Séquence	Clivages manqués	Modifications
19-23	606,37	605,3655	605,3649	1	KVFGR	0	
33-39	874,42	873,4093	873,4093	0	HGLDNYR	0	
24-31	893,42	892,4113	892,4146	-4	CELAAAMK	0	Carbamidomethyl (C)
80-86	936,38	935,3693	935,3708	-2	WWCNDGR	0	
80-86	993,40	992,3919	992,3923	-0	WWCNDGR	0	Carbamidomethyl (C)
32-39	1030,52	1029,5127	1029,5104	2	RHGLDNYR	1	
24-32	1032,50	1031,4940	1031,4892	5	CELAAAMKR	1	Pyro-carbamidomethyl (N-term C)
135-143	1045,54	1044,5351	1044,5352	-0	GTDVQAWIR	0	
24-32	1049,53	1048,5204	1048,5157	4	CELAAAMKR	1	Carbamidomethyl (C)
40-51	1268,61	1267,6042	1267,6019	2	GYSLGNWVCAAK	0	
133-143	1276,64	1275,6375	1275,6394	-1	CKGTDVQAWIR	1	
133-143	1316,64	1315,6345	1315,6343	0	CKGTDVQAWIR	1	Pyro-carbamidomethyl (N-term C)
40-51	1325,63	1324,6232	1324,6234	-0	GYSLGNWVCAAK	0	Carbamidomethyl (C)
133-143	1333,67	1332,6623	1332,6609	1	CKGTDVQAWIR	1	Carbamidomethyl (C)
52-63	1428,65	1427,6431	1427,6429	0	FESNFNTQATNR	0	
80-91	1491,65	1490,6476	1490,6473	0	WWCNDGRTPGSR	1	Carbamidomethyl (C)
116-130	1675,80	1674,7938	1674,7937	0	IVSDGNGMNAWVAWR	0	
116-130	1691,79	1690,7857	1690,7886	-2	IVSDGNGMNAWVAWR	0	Oxidation (M)
64-79	1753,83	1752,8279	1752,8278	0	NTDGSTDYGILQINSR	0	
115-130	1803,89	1802,8872	1802,8886	-1	KIVSDGNGMNAWVAWR	1	
115-130	1819,88	1818,8622	1818,8835	-8	KIVSDGNGMNAWVAWR	1	Oxidation (M)
33-51	2181,01	2180,0032	2180,0221	-9	HGLDNYRGYSLGNWVCAAK	1	Carbamidomethyl (C)
92-114	2451,17	2450,1614	2450,1603	0	NLCNIPCSALLSSDITASVNCAK	0	2 Carbamidomethyl (C)
92-114	2508,19	2507,1861	2507,1818	2	NLCNIPCSALLSSDITASVNCAK	0	3 Carbamidomethyl (C)
92-115	2579,26	2578,2517	2578,2553	-1	NLCNIPCSALLSSDITASVNCAKK	1	2 Carbamidomethyl (C)
92-115	2636,28	2635,2759	2635,2768	-0	NLCNIPCSALLSSDITASVNCAKK	1	3 Carbamidomethyl (C)

Table 2-4: Résultat Mascot pour l'analyse du digest de lysozyme natif par MALDI-TOF-TOF

MRSLILVLC¹⁰ FLPLAALGKV²⁰ FGRCELAAAM³⁰ KRHGLDNYRG⁴⁰ YSLGNWVCAA⁵⁰
 KFESNFNTQA⁶⁰ TNRNTDGSTD⁷⁰ YGILQINSRW⁸⁰ WCNDGRTPGS⁹⁰ RNLCNIPCSA¹⁰⁰
 LLSSDITASV¹¹⁰ NCAKKIVSDG¹²⁰ NGMNAWVAWR¹³⁰ NRCKGTDVQA¹⁴⁰ WIRGCRLL¹⁴⁷

Figure 2-15: Recouvrement de séquence obtenu lors de l'analyse du digest de lysozyme par MALDI-TOF-TOF (peptides identifiés indiqués en rouge)

En ce qui concerne le recouvrement de séquence établi par Mascot, nous remarquons que le peptide ($^1\text{MRSLLILVLCFLPLAALG}^{18}$) n'est pas identifié, ce qui est normal car nous avons vu précédemment que ce pré-peptide n'était pas synthétisé dans la protéine commerciale. En ce qui concerne les peptides $^{131}\text{NR}^{132}$ et $^{144}\text{GCRL}^{147}$, ils ne sont pas identifiés non plus. En effet, ces peptides ont des masses théoriques respectives de 288,1546 et 447,2264 Da, or la méthode d'acquisition employée ne permet de détecter que les ions de rapport m/z compris entre 600 et 4000.

3.3. L'huile de lin

Comme de l'huile de lin a été ajoutée dans certaines peintures modèles afin d'étudier l'influence de la présence de lipides sur le liant protéique, nous l'avons également caractérisé par spectroscopie Raman. Le spectre Raman obtenu est en accord avec les spectres publiés dans la littérature^{57,58} et présente principalement des bandes caractéristiques des tryglycérides c'est-à-dire principalement dues aux vibrations des groupements CH_2 (à 1300 cm^{-1} et à 1440 cm^{-1}), CH (élongations entre 2900 et 3000 cm^{-1}), $\text{C}=\text{C}$ (1660 cm^{-1}) et $\text{C}=\text{O}$ (1740 cm^{-1}).

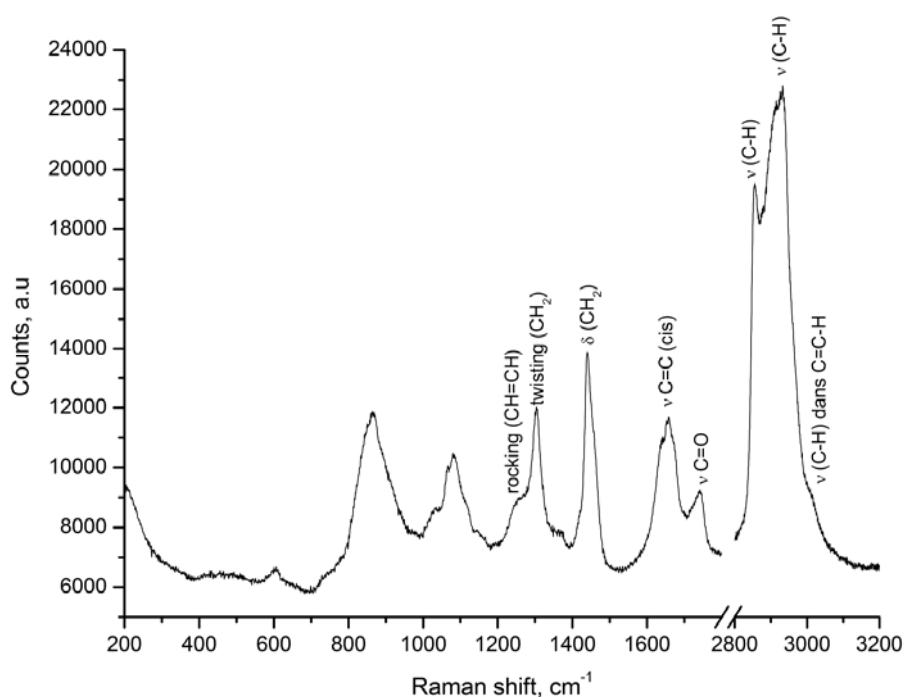


Figure 2-16: Spectre micro-Raman ($\lambda=632,8\text{ nm}$) de l'huile de lin

4. Etude des peintures modèles

4.1. Peinture modèle blanc de plomb-lysozyme

4.1.1. Etude structurale par micro-Raman

Le spectre de la peinture composée de blanc de plomb et de lysozyme, qui a été enregistré avec un laser He-Ne ($\lambda=632,8$ nm), est présenté sur la figure 2-17 et comparé aux spectres du blanc de plomb et du lysozyme enregistrés individuellement.

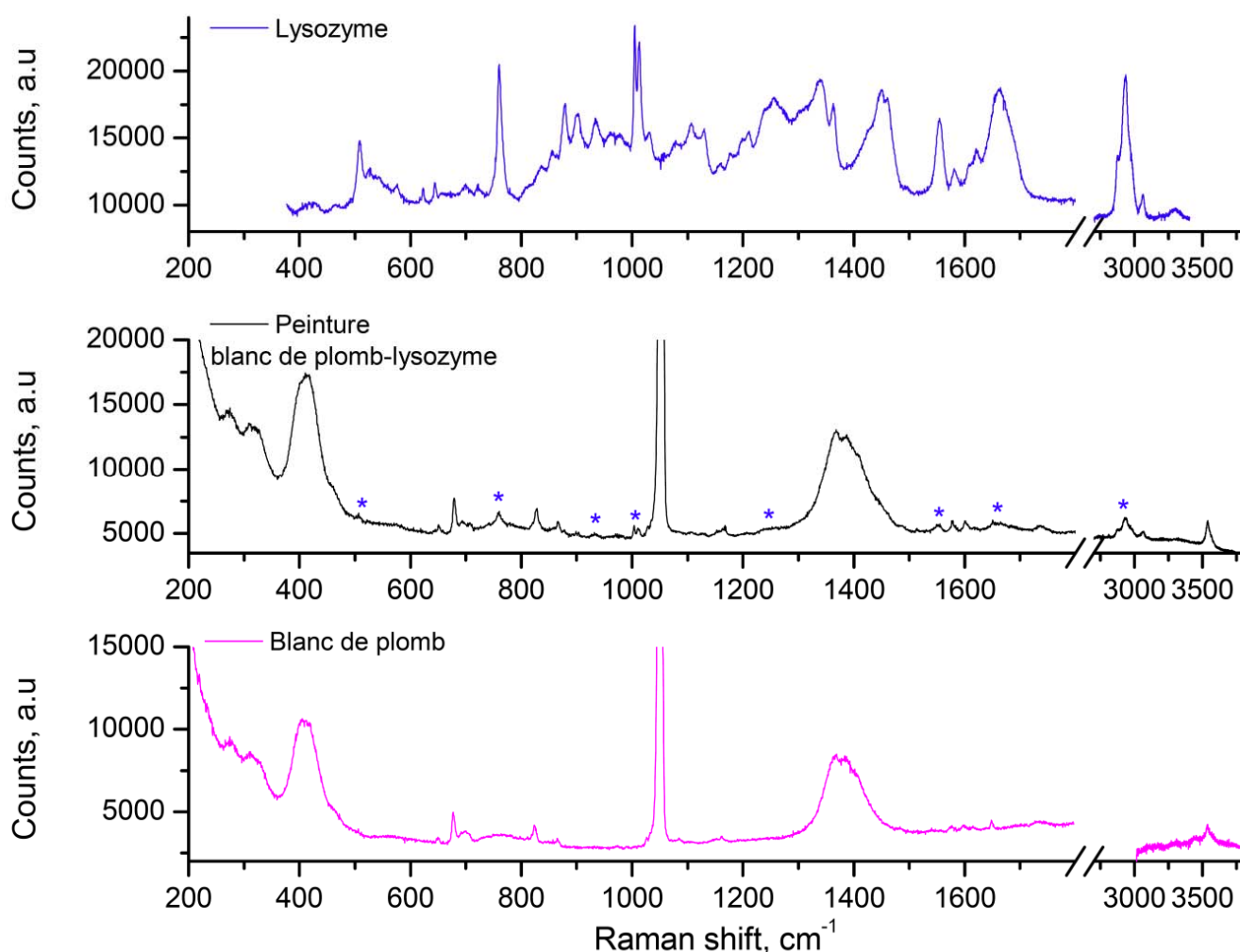


Figure 2-17: Spectres micro-Raman ($\lambda=632,8$ nm) du lysozyme, de la peinture composée de blanc de plomb et de lysozyme et du blanc de plomb

Nous remarquons que le spectre de la peinture est dominé par les bandes du blanc de plomb. Toutefois, certaines bandes caractéristiques de la protéine, présente en faible quantité dans la peinture, sont visibles (signalées par les symboles * sur le spectre) notamment les bandes à 760, 1003 et 1550 cm^{-1} attribuées au tryptophane, la bande à 1003 cm^{-1}

caractéristique des acides aminés aromatiques phénylalanines, les bandes amide I (1660 cm^{-1}) et amide III (1250 cm^{-1}) ainsi que les bandes dues aux élongations des liaisons S-S (508 cm^{-1}) et C-C (934 cm^{-1}). Entre 2800 et 3800 cm^{-1} , nous retrouvons les bandes attribuées à la vibration des groupements CH de la chaîne latérale de la protéine (entre 2800 et 3100 cm^{-1}) ainsi que la bande de la vibration d'élongation de la liaison OH de l'entité $\text{Pb}(\text{OH})_2$ du pigment. Le spectre étant 'écrasé' par la bande à 1050 cm^{-1} très intense (ν_1 des ions carbonates), nous avons décidé d'enregistrer les spectres entre 500 et 1025 cm^{-1} et entre 1070 et 1800 cm^{-1} séparément afin de mieux observer les bandes peu intenses présentes dans ces zones et de repérer d'éventuels changements.

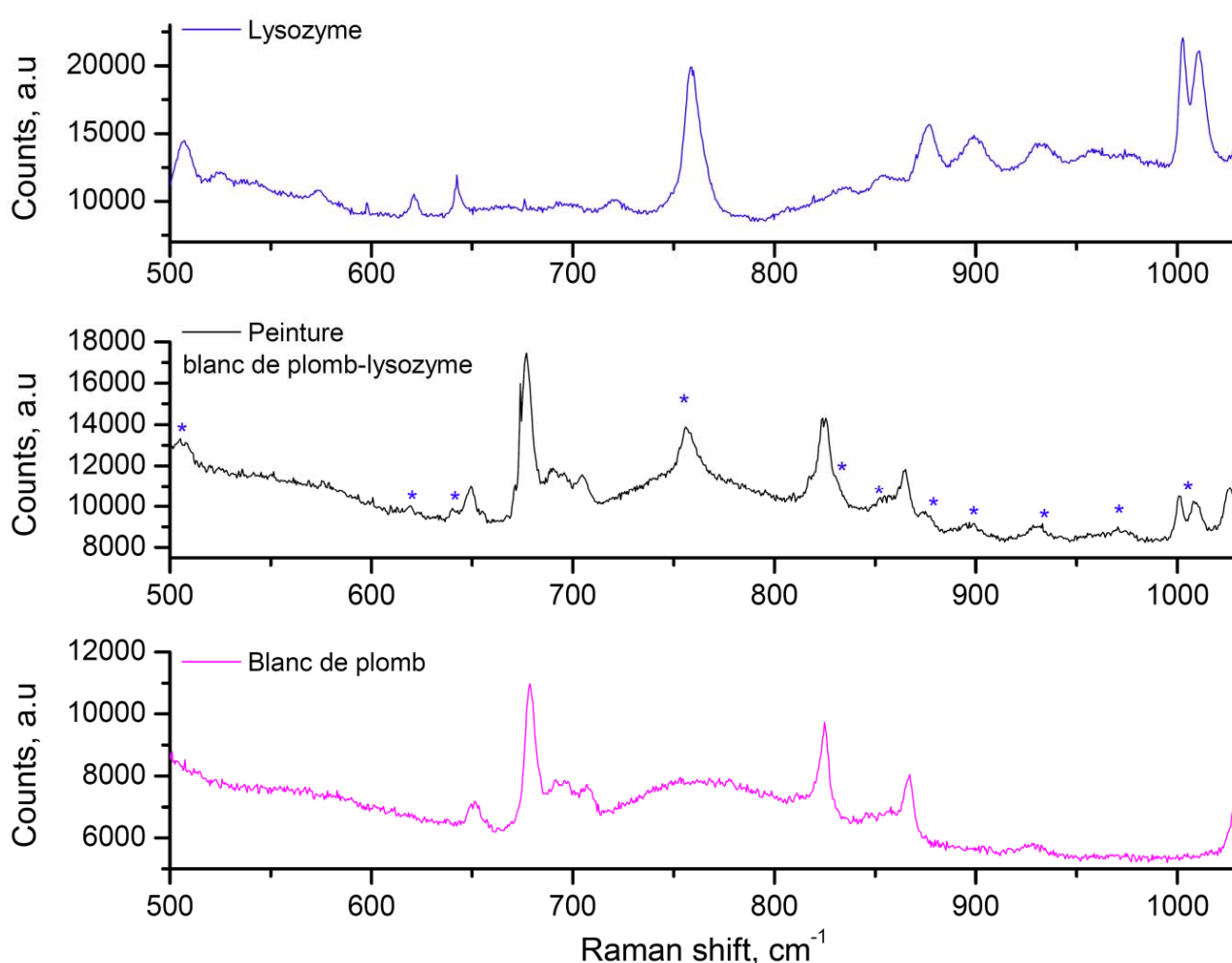


Figure 2-18: Spectres micro-Raman ($\lambda=632,8\text{ nm}$) du lysozyme, de la peinture composée de blanc de plomb et de lysozyme et du blanc de plomb enregistrés entre 500 et 1025 cm^{-1}

Entre 500 et 1025 cm^{-1} (figure 2-18), de nombreuses bandes peu intenses correspondent au lysozyme (*). Dans cette région, aucun changement, déplacement de bande ou changement significatif d'intensité, n'est noté par rapport aux composés seuls. Le spectre

de la peinture correspond donc à la superposition des spectres des molécules entrant dans sa composition.

Le spectre de la peinture enregistré entre 1070 et 1800 cm^{-1} (figure 2-19) présente également des bandes de faible intensité appartenant au lysozyme (*).

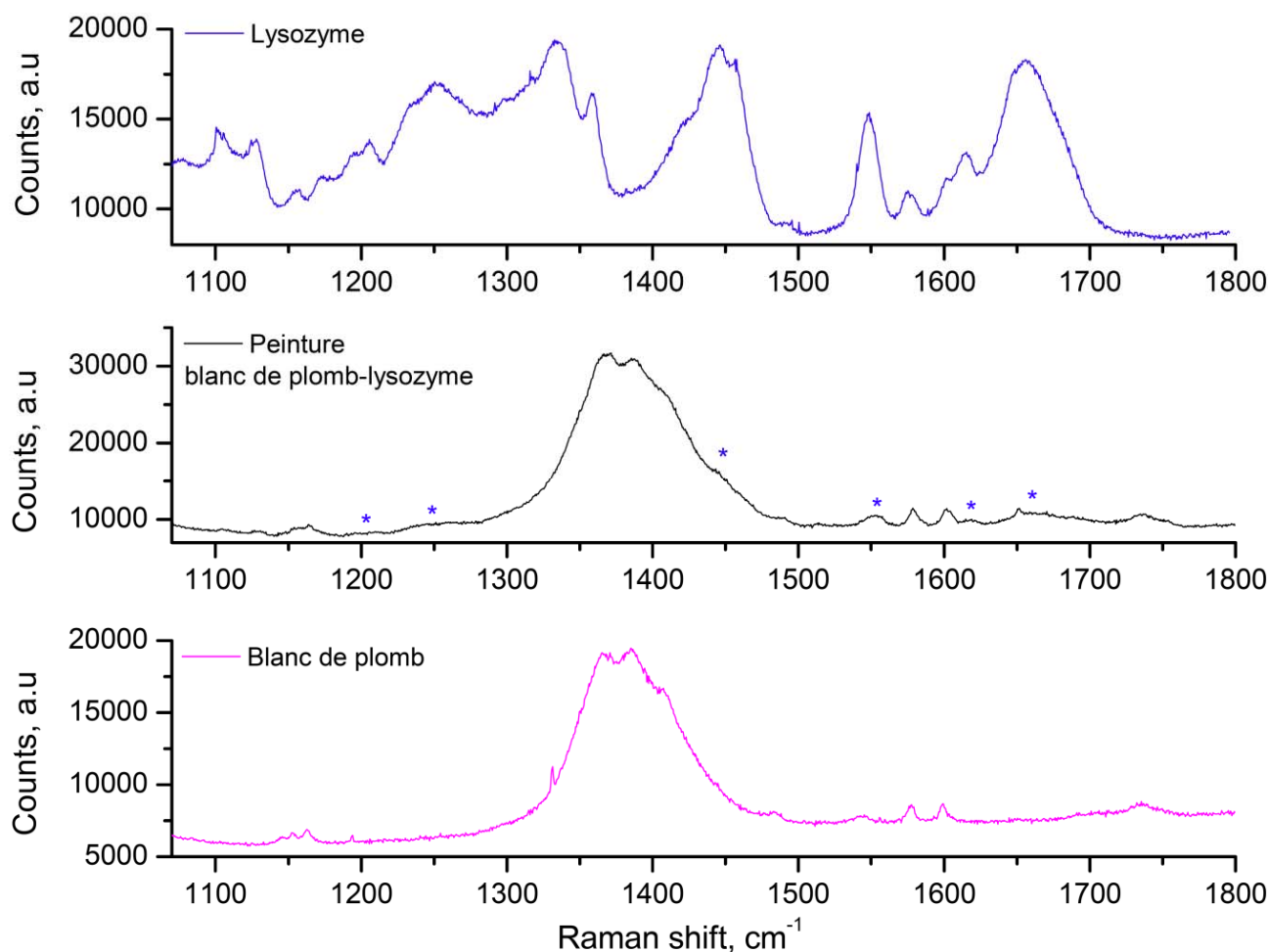


Figure 2-19: Spectres micro-Raman ($\lambda=632,8 \text{ nm}$) du lysozyme, de la peinture composée de blanc de plomb et de lysozyme et du blanc de plomb enregistrés entre 1070 et 1800 cm^{-1}

Afin d'étudier un éventuel changement de la structure secondaire du lysozyme utilisé en liant de peinture, nous avons décidé d'effectuer une décomposition de la bande amide I. Pour cela, un spectre a été enregistré entre 1500 et 1800 cm^{-1} . Pour s'affranchir de la contribution du blanc de plomb, nous avons enregistré le spectre Raman d'une peinture préparée à partir de blanc de plomb et d'eau que nous avons ensuite soustrait au spectre de la peinture blanc de plomb-lysozyme après normalisation des 2 spectres sur la bande correspondant à l'harmonique $2\nu_2$ des ions carbonates du blanc de plomb à 1735 cm^{-1} . Ceci nous permet d'obtenir le spectre correspondant à la bande amide I du lysozyme dans la

peinture et donc de décomposer cette bande afin d'évaluer la structure secondaire du lysozyme dans la peinture (figure 2-20).

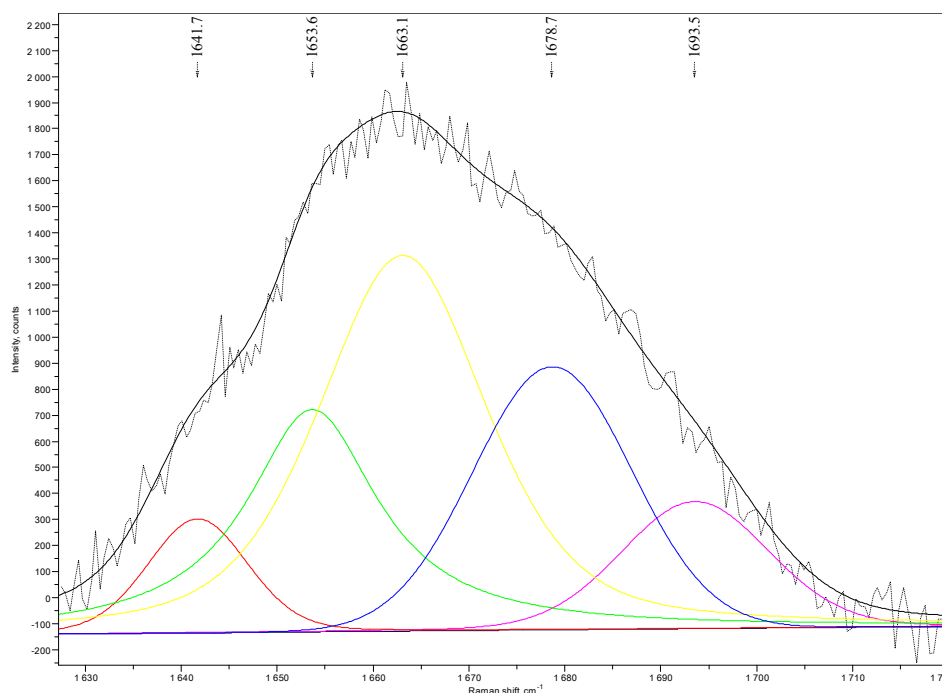


Figure 2-20: Décomposition de la bande amide I du lysozyme utilisé en liant de peinture

La proportion de chaque conformère est calculée en utilisant l'aire de la bande associée. Les résultats obtenus sont reportés dans la table 2-5.

Raman shift, cm^{-1}	Largeur à mi-hauteur, cm^{-1}	Aire	Conformation	Pourcentage de conformère
1641,67	12,32	13244,7	Brin β	6,53
1653,64	16,52	42454,4	Hélices α	20,94
1663,05	20,65	79039,6	Feuillets β	38,99
1678,66	19,47	46428,4	Coudes	22,90
1693,52	18,22	21554,6	Structure désordonnée	10,63

Table 2-5: Caractéristiques des composantes issues de la décomposition de la bande amide I du lysozyme utilisé en liant de peinture avec le blanc de plomb

Par comparaison avec les résultats obtenus pour le lysozyme natif (cf table 2-3), nous remarquons que le pourcentage de conformères en hélices α a diminué (~21% ici contre 41% dans la protéine native) ; à l'inverse, il y a plus de feuillets β (~45,5% ici contre 23% dans la protéine native). La proportion de coudes reste équivalente et il y a un peu moins de régions en pelote statistique dans la protéine.

Lors d'études précédentes réalisées sur des peintures composées de blanc de plomb et blanc d'œuf par spectroscopie FTIR, les auteurs avaient mis en évidence un déplacement du maximum d'intensité de la bande amide I lorsque le blanc d'œuf était utilisé en peinture²³. Ici, nous n'avons pas observé de déplacement de la bande amide I mais plutôt un changement de profil de cette bande et sa décomposition nous indique qu'il y a un réarrangement de la structure de la protéine après mise en contact avec le blanc de plomb.

4.1.2. Analyse protéomique: identification de modifications chimiques

L'analyse protéomique a été utilisée afin de rechercher la présence de modifications chimiques sur le lysozyme. En l'occurrence, nous voulons savoir si les autres composés présents dans la peinture induisent des modifications chimiques sur le lysozyme. La peinture modèle étant uniquement composée de blanc de plomb, d'eau et de lysozyme, nous étudions ici l'influence du blanc de plomb. Les protéines sont extraites de la peinture et digérées à la trypsine afin d'obtenir l'empreinte peptidique du lysozyme extrait de la peinture. En parallèle, un échantillon de lysozyme natif est digéré afin d'obtenir un spectre de référence dans les mêmes conditions expérimentales. Les deux empreintes peptidiques sont ensuite comparées dans le but de mettre en évidence la présence ou l'absence de peptides modifiés. En effet, l'apparition de modifications chimiques sur un peptide induit un changement de masse de ce peptide, ce qui se traduit par l'apparition de nouveaux pics sur le spectre de masse. La comparaison minutieuse des deux empreintes peptidiques (spectres MS du digest de lysozyme extrait de la peinture et du digest de lysozyme natif présentés figure 2-21) a donc été réalisée.

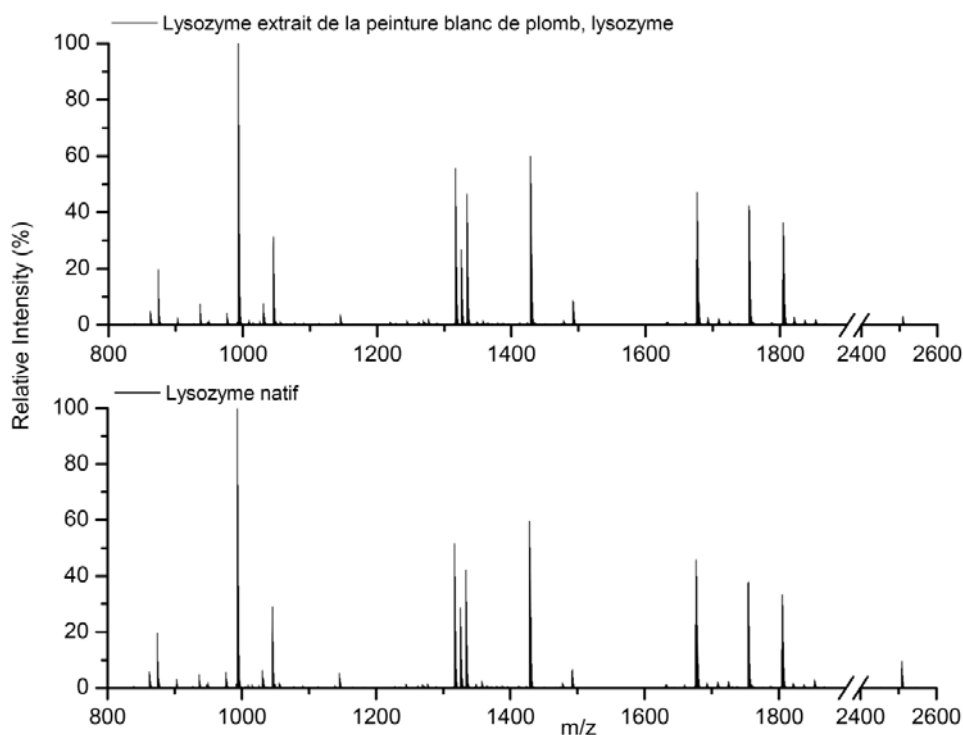


Figure 2-21: Spectres MS MALDI-TOF-TOF du digest de lysozyme extrait de la peinture blanc de plomb-lysozyme et du digest de lysozyme natif

Aucun pic supplémentaire n'a été observé dans le cas du lysozyme extrait de la peinture, cela montre que dans cet échantillon il n'y a pas de peptides modifiés. Ce résultat nous indique qu'entre la préparation de la peinture et son analyse, il n'y a pas eu de réaction chimique entre le blanc de plomb et le lysozyme induisant des modifications chimiques sur ce dernier.

4.2. Peinture modèle blanc de plomb-lysozyme-huile de lin

4.2.1. Etude structurale par micro-Raman

La peinture modèle réalisée à partir de blanc de plomb broyé dans une émulsion lysozyme-huile de lin est analysée par micro-Raman, ce qui conduit à l'obtention du spectre suivant (figure 2-22).

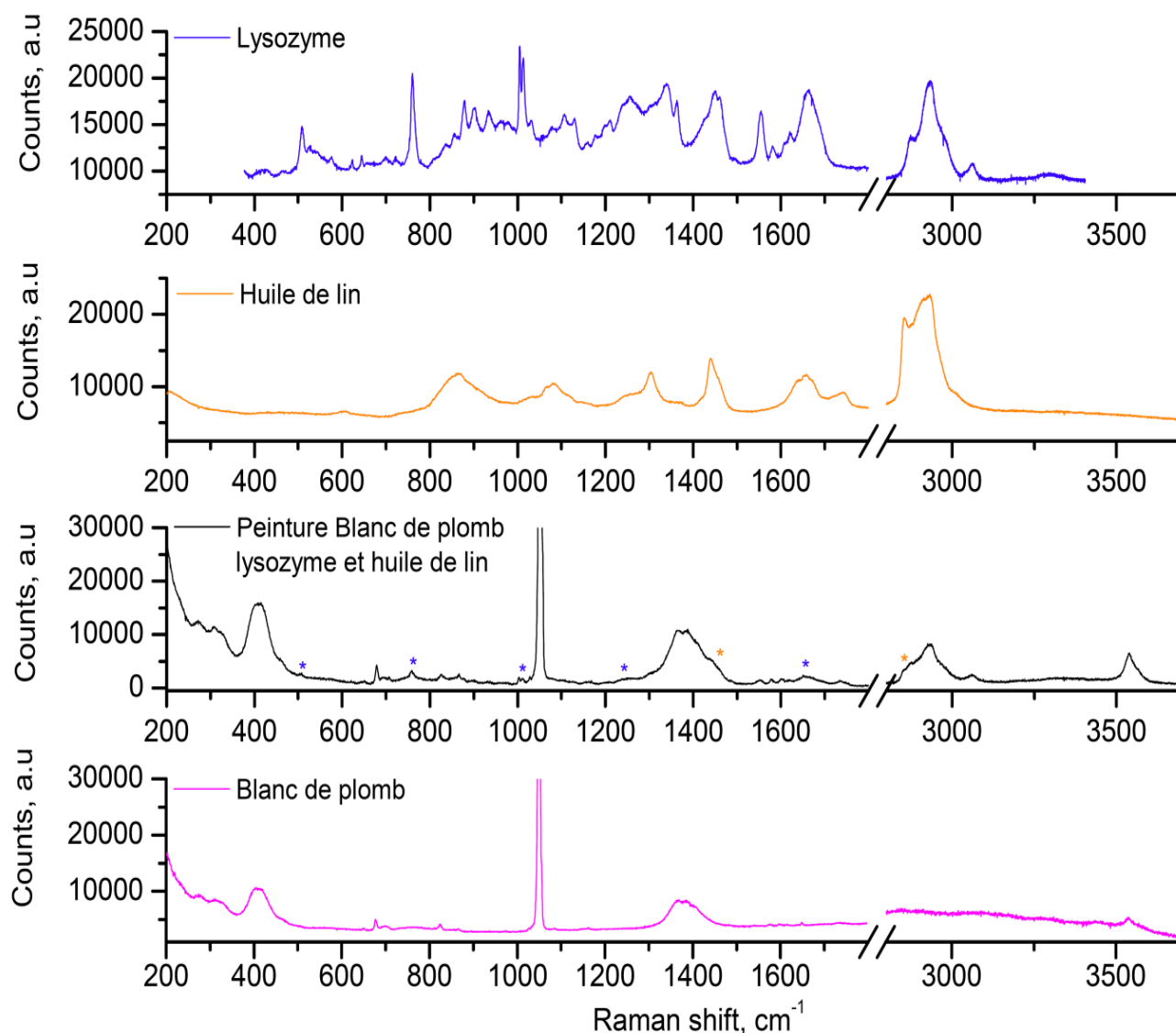


Figure 2-22: Spectres micro-Raman ($\lambda=632,8$ nm) du lysozyme, de l'huile de lin, de la peinture composée de blanc de plomb, lysozyme et huile de lin et du blanc de plomb

Le spectre obtenu pour cette peinture correspond au spectre du blanc de plomb auquel s'ajoutent quelques bandes peu intenses attribuées en majeure partie au lysozyme (*). L'ajout d'huile de lin dans la peinture (ici en faible quantité car l'huile de lin représente 1/5 du liant) entraîne un élargissement de la bande à ~ 1400 cm^{-1} (une composante à 1440 cm^{-1} est plus visible) et de la bande à ~ 2860 cm^{-1} car la contribution de l'huile de lin (montrée sur la figure 2-22 par les symboles *) s'ajoute à celle du lysozyme. Comme pour la peinture blanc de plomb-lysozyme, le spectre est 'écrasé' par la bande intense à ~ 1050 cm^{-1} (ν_1 de l'ion carbonate). Nous avons donc également pris les spectres des zones jouxtant cette bande de manière indépendante afin de repérer d'éventuels changements (voir figures 2-23 et 2-24).

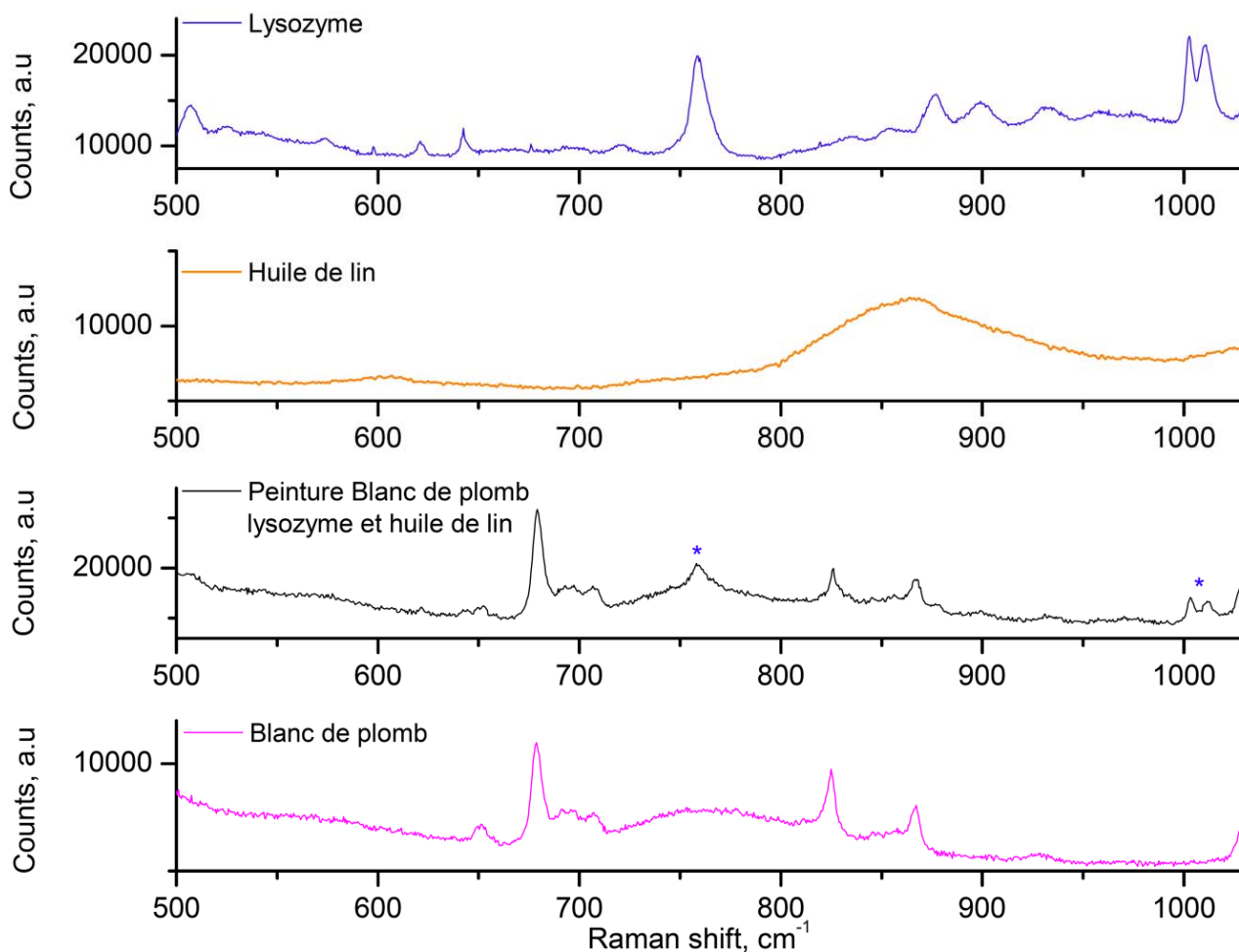


Figure 2-23: Spectres micro-Raman ($\lambda=632,8$ nm) du lysozyme, de l'huile de lin, de la peinture composée de blanc de plomb, lysozyme et huile de lin et du blanc de plomb enregistrés entre 500 et 1025 cm^{-1}

Entre 500 et 1025 cm^{-1} (figure 2-23), nous retrouvons les bandes du blanc de plomb ainsi que les bandes attribuées aux tryptophanes (760 et 1011 cm^{-1}) et à la respiration des noyaux benzéniques des acides aminés aromatiques (1003 cm^{-1}). Comme pour la peinture composée de blanc de plomb et de lysozyme, aucun changement particulier n'est observé dans cette région spectrale.

Entre 1070 et 1800 cm^{-1} (figure 2-24), on constate un élargissement de certaines bandes provoqué par la contribution de l'huile de lin mais aucun changement significatif n'est noté.

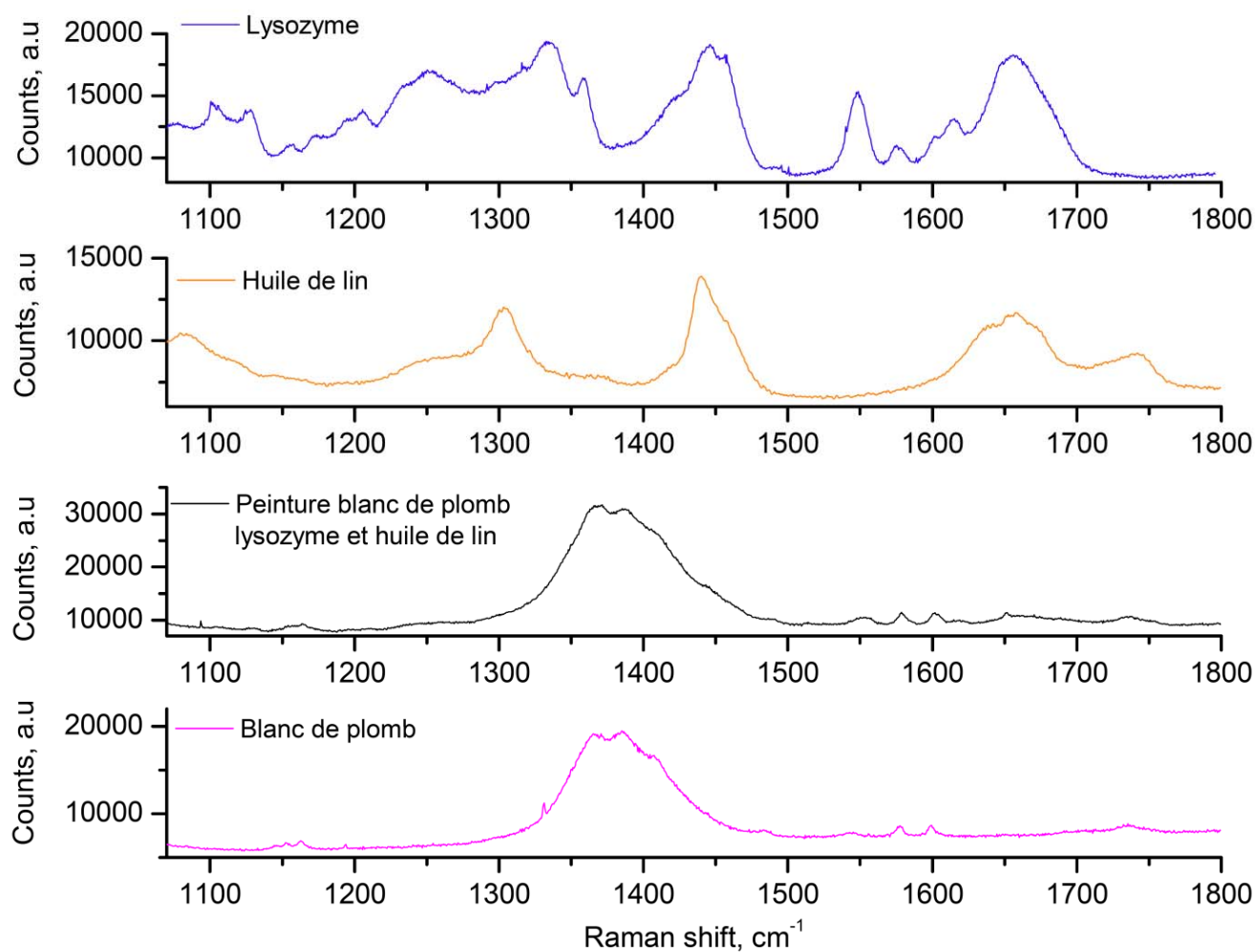


Figure 2-24: Spectres micro-Raman ($\lambda=632,8$ nm) du lysozyme, de l'huile de lin, de la peinture composée de blanc de plomb, lysozyme et huile de lin et du blanc de plomb enregistrés entre 1070 et 1800 cm^{-1}

Pour cet échantillon, nous avons également décomposé la bande amide I du lysozyme afin de déterminer la structure secondaire du lysozyme utilisé en liant de peinture contenant également de l'huile de lin.

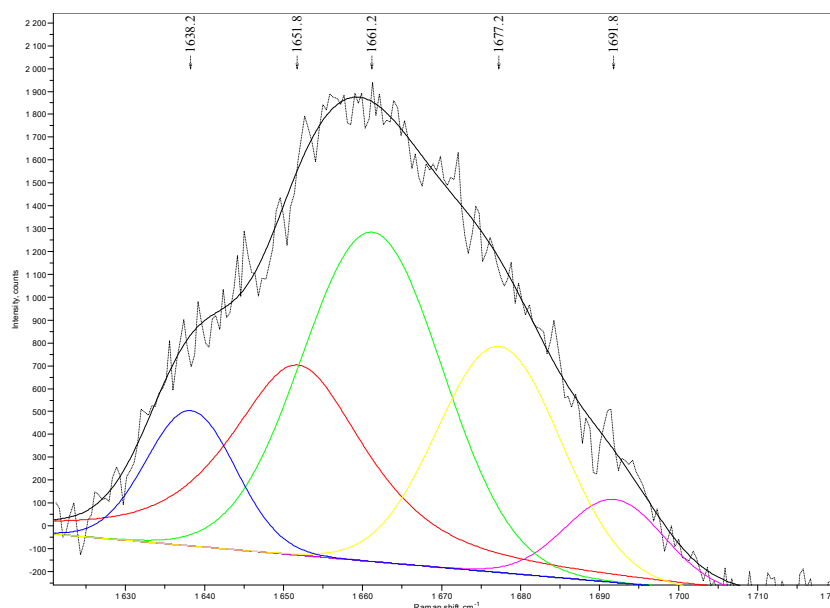


Figure 2-25: Décomposition de la bande amide I du lysozyme utilisé en liant d'une peinture composée de blanc de plomb, lysozyme et huile de lin

Raman shift, cm^{-1}	Largeur à mi-hauteur, cm^{-1}	Aire	Conformation	Pourcentage de conformères
1638,22	13,27	18528	Brin β	9,68
1651,76	19,83	46195,8	Hélices α	24,13
1661,18	20,85	70977,4	Feuillets β	37,08
1677,22	18,45	43094,6	Coudes	22,51
1691,82	14,68	12611,5	Structure désordonnée	6,59

Table 2-6: Caractéristiques des composantes issues de la décomposition de la bande amide I du lysozyme utilisé en liant d'une peinture composée de blanc de plomb, lysozyme et huile de lin

Par rapport à la protéine native, la proportion d'hélices α a diminué (24% ici contre 43% dans le lysozyme natif) et inversement la proportion de conformères de type β a augmenté (47% ici contre 23% dans le lysozyme natif) comme pour la peinture composée uniquement de blanc de plomb et de lysozyme. Cela montre que lorsque le lysozyme est utilisé en peinture (avec ou sans huile de lin), il y a un réarrangement de la structure de la protéine et que l'ajout d'huile de lin, dans les proportions utilisées pour cette étude, n'a pas d'effet appréciable sur la conformation du lysozyme. Cette protéine, majoritairement en hélice α dans sa structure native, a tendance ici à adopter une structure en feuillets β .

4.2.2. Analyse protéomique: identification de modifications chimiques

Le lysozyme a été extrait de la seconde peinture modèle composée de blanc de plomb, lysozyme et huile de lin et digéré afin d'évaluer l'effet causé par la présence de lipides sur le liant protéique en termes de modifications chimiques. L'empreinte peptidique obtenue après analyse MALDI-TOF-TOF (figure 2-26) est comparée à l'empreinte peptidique de la protéine native qui a été digérée dans les mêmes conditions.

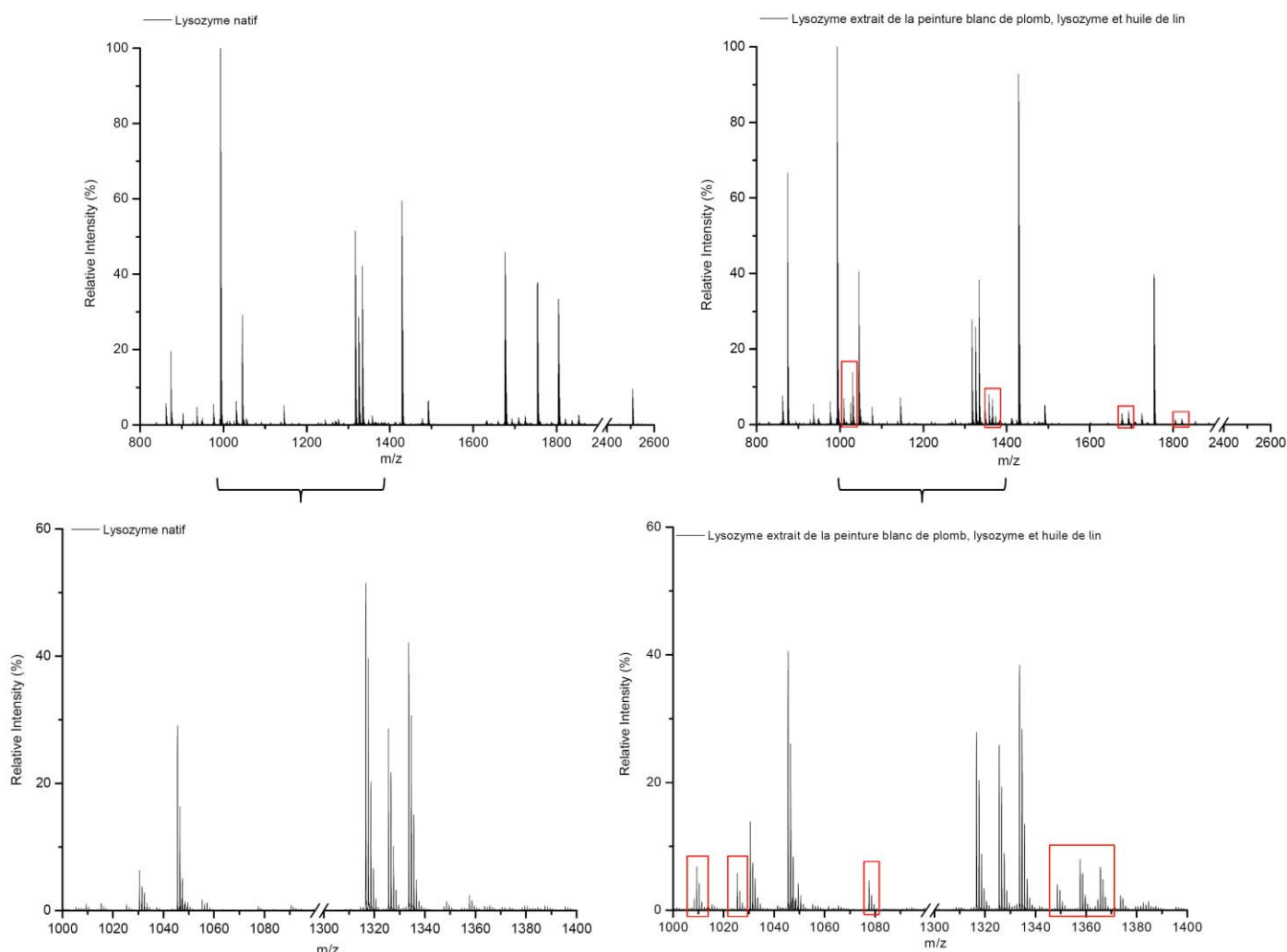


Figure 2-26: Spectres MS MALDI-TOF-TOF

Haut : digest de lysozyme natif et digest de lysozyme extrait de la peinture composée de blanc de plomb-lysozyme-huile de lin

Bas : agrandissement pour $1000 < m/z < 1400$

Nous remarquons sur le spectre MS du lysozyme extrait de la peinture l'apparition de nouveaux pics à m/z 1009,39 ; 1025,39 ; 1077,54 ; 1348,63 ; 1357,62 ; 1365,66 ; 1723,79 et une augmentation d'intensité pour le pic à m/z 1691,79. Les différences entre les spectres MS

du digest de lysozyme extrait de la peinture modèle et du digest de lysozyme natif sont signalées par des cadres rouges sur la figure 2-26.

Afin d'identifier la séquence peptidique et de façon plus intéressante la nature et le site de la modification chimique à l'origine de ces pics, les ions correspondants ont été fragmentés dans la cellule de collision du spectromètre de masse et les spectres MS/MS résultants ont été exploités manuellement.

Les spectres MS/MS des ions monochargés à m/z 1009,39 et 1025,39 ont permis d'identifier le peptide WWCNDGR en position 80-86 dans le lysozyme. Sur ces deux spectres MS/MS l'ion y_5^+ (à m/z 621) est déplacé de 57 Da par rapport à la masse théorique, ce qui indique une carbamidométhylation sur le résidu cystéine induite par réaction avec l'iodoacétamide (réaction montrée sur la figure 2-14). La masse de l'ion monochargé correspondant au peptide WWCNDGR avec une cystéine carbamidométhylée est $[MH^+]=993,39$. Ici, les masses observées sont à 1009,39 et 1025,39 il y a donc un écart de masse de 16 et 32 Da respectivement. Ces écarts de masse correspondent respectivement à l'addition d'un et de deux atomes d'oxygènes sur le peptide. Sur le spectre MS/MS de l'ion monochargé à 1009,39 (fig 2-27), le pic correspondant à l'ion b_2^+ est décalé de 16 (m/z 389) alors que les masses des fragments y (y_1^+ à y_6^+) sont inchangées. La modification est donc une oxydation localisée sur l'acide aminé en position N-terminale.

Pour le tryptophane, une oxydation peut conduire à la formation soit d'hydroxytryptophane, soit d'oxindolylalanine⁵⁹⁻⁶¹ (voir figure 2-28). Ici, nous pensons que le composé formé est de l'hydroxytryptophane car c'est un composé stable, contrairement à l'oxindolylalanine qui est une molécule intermédiaire à la formation de N-formylkynurénine.

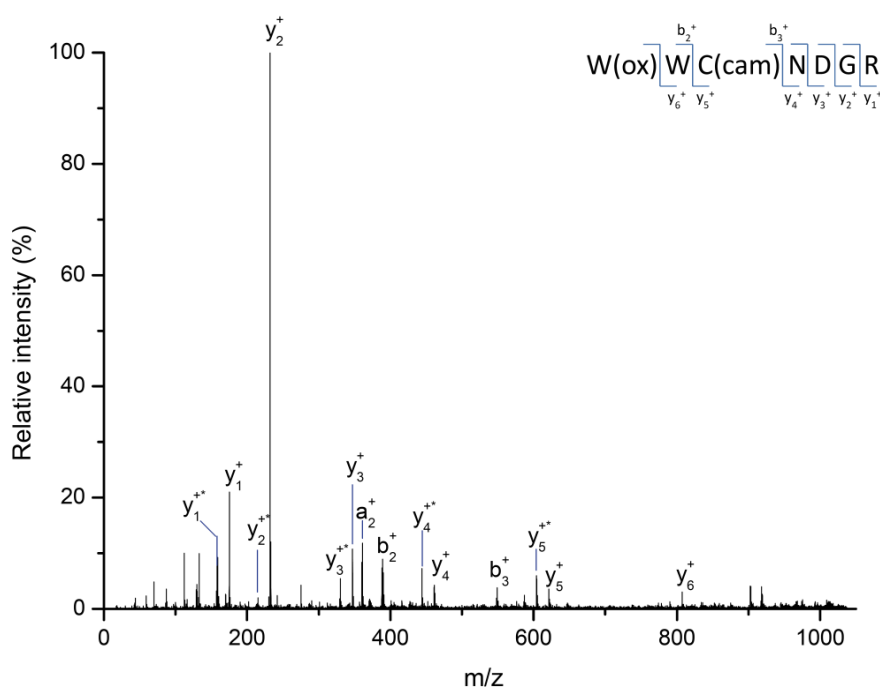


Figure 2-27: Spectre MS/MS de l'ion monochargé à m/z 1009,39 et présentant les fragments y et b de la séquence peptidique WWCNDGR avec carbamidomethylation de la cystéine et oxydation du premier tryptophane

De la même manière, sur le spectre MS/MS de l'ion monochargé à m/z 1025,39 le pic attribué au fragment b_2 (m/z 405) est décalé de 32 et les masses des ions y sont inchangées. La modification est donc une dioxydation localisée sur l'acide aminé en position N-terminale, ce qui signifie que le tryptophane en position 80 est oxydé en *N*-formylkynurénine.

Concernant l'ion monochargé à m/z 1077,54 le spectre MS/MS a conduit à l'identification du peptide GTDVQAWIR en position 135-143. La masse de l'ion monochargé pour le peptide non modifié est de 1045,54 Da. Ici, les fragments b_7 (m/z 790) et y_3 (m/z 506) sont décalés de 32 Da par rapport aux masses théoriques, ce qui indique l'addition de deux atomes d'oxygène sur le 7^{ème} résidu, soit l'oxydation du tryptophane en position 141 en *N*-formylkynurénine.

Ainsi, tous les spectres MS/MS enregistrés ont été interprétés manuellement. Les séquences peptidiques identifiées ainsi que les modifications et leur site de localisation sont résumés dans la table présentée ci-dessous (table 2-7).

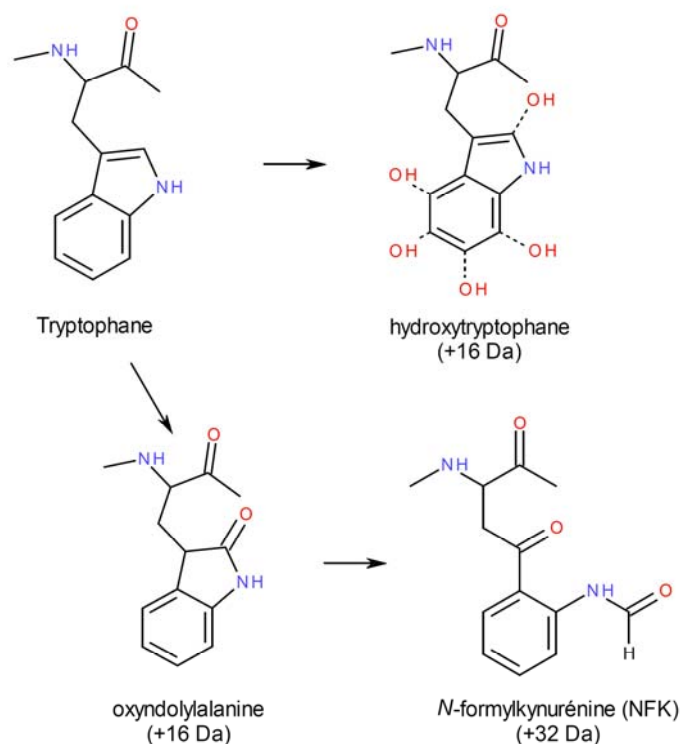


Figure 2-28: Oxydation du tryptophane en hydroxytryptophane et N-formylkynurénine

Les modifications induites par l'ajout d'huile de lin dans la peinture sont principalement des dioxydations localisées sur les acides aminés tryptophanes. Au total, il y a 6 tryptophanes dans le lysozyme du blanc d'œuf, en position 46, 80, 81, 126, 129 et 141. Si on regarde les résultats présentés dans la table 2-7, des dioxydations sont identifiées sur les tryptophanes en position 46 (peptide 40-51 GYSLGNWVCAAK), 80 (peptide 80-86 WWCNDGR), 126 (peptide 116-130 IVSDGNGMNAWVAWR) et 141 (peptide 133-143 CKGTDVQAWIR). Seuls les tryptophanes en position 81 et 129 ne sont pas oxydés en N-formylkynurénine. Cependant, ces tryptophanes font partie de peptides contenant déjà un résidu tryptophane dioxydé et il peut être supposé que l'oxydation du second résidu tryptophane requiert des conditions d'oxydation plus fortes.

Le pic à m/z 1691,79 correspondant au peptide 116-130 (IVSDGNGMNAWVAWR) avec une méthionine oxydée en méthionine sulfoxyde (+16 Da) est devenu plus intense que le pic à m/z 1675,80 correspondant au peptide non modifié qui a diminué en intensité de manière très significative. Cette forte diminution d'intensité est également observée pour le pic à m/z 1803,89 attribué au peptide 115-130 qui inclut un clivage manqué de la trypsine.

[MH ⁺] (monoisotopique)	Peptide	Position	Δm (Da)	Nature et site de localisation de la modification
1009,39	WWCNDGR	80-86	57 + 16	carbamidométhyl (C82) + oxydation (W80)
1025,39	WWCNDGR	80-86	57 + 32	carbamidométhyl (C82) + dioxydation (W80)
1077,54	GTDVQAWIR	135-143	32	dioxydation (W141)
1348,63	CKGTDVQAWIR	133-143	40 + 32	pyrocarbamidométhyl (C133) + dioxidation (W141)
1357,62	GYSLGNWVCAAK	40-51	57 + 32	carbamidométhyl (C48) + dioxidation (W46)
1365,66	CKGTDVQAWIR	133-143	57 + 32	carbamidométhyl (C133) + dioxydation (W141)
1723,78	IVSDGNGMNAWVAWR	116-130	16 + 32	oxydation (M123) + dioxydation (W126)

Table 2-7: Modifications chimiques identifiées sur le lysozyme extrait de la peinture blanc de plomb, lysozyme et huile de lin non-vieillie

5. Effet du vieillissement sur les peintures modèles

5.1. Vieillissement artificiel

Afin de reproduire des conditions de vieillissement de manière accélérée, les échantillons ont été placés dans une chambre de vieillissement artificiel dans laquelle la température est fixée à 25°C (\pm 3°C) et l'humidité à 50% (\pm 5%). Les échantillons sont soumis à des rayonnements UV (365 nm) pendant 12h puis plongés dans l'obscurité pendant 12h afin de simuler des cycles jour/nuit (plus de détails donnés dans la partie matériel et méthodes).

5.1.1. Etude par micro-Raman

Les spectres Raman des peintures modèles ont été enregistrés après 20 jours dans la chambre de vieillissement artificiel.

Dans un premier temps, nous nous intéressons à la peinture composée uniquement de blanc de plomb et de lysozyme. La première observation est l'augmentation du fond de fluorescence : la ligne de base est à 40 000 coups pour la peinture vieillie alors qu'elle était à 4 000 coups pour l'échantillon non vieilli (figure 2-29). Par ailleurs, on note un changement de couleur de la peinture visible à l'œil nu (voir photographies des peintures avant et après vieillissement artificiel montrées en annexe). La peinture vire au jaune, ce qui a été vérifié par des mesures de colorimétrie présentées en annexe.

En comparant le spectre de la peinture vieillie avec celui de la peinture fraîche (figure 2-29), nous remarquons qu'il n'y a aucun signe spectral nous montrant que le pigment est affecté par le vieillissement. Ses bandes caractéristiques ne sont pas déplacées et ne changent pas d'intensité. En revanche, nous avons noté des changements d'intensité concernant les bandes à 758, 876, 1011, 1552 et 1660 cm^{-1} qui sont des bandes du lysozyme. Les 4 premières bandes sont attribuées aux acides aminés tryptophanes^{62,63}. La diminution d'intensité de ces bandes nous indique que lors du vieillissement artificiel de la peinture cet acide aminé est affecté. La bande à 1660 cm^{-1} est la bande amide I dont la décomposition permet de définir la structure secondaire de la protéine. Ici, l'intensité de cette bande est trop faible et le rapport signal sur bruit trop mauvais pour réaliser une décomposition fiable.

Par ailleurs, les photographies des échantillons ainsi que les mesures de colorimétrie montrées en annexe montrent que la peinture a jauni suite au vieillissement artificiel. La peinture « témoin » composée de blanc de plomb et d'eau qui avait été placée dans la chambre de vieillissement artificiel, n'a pas jauni. Ce jaunissement n'est donc pas un changement de couleur du pigment mais il est provoqué par le vieillissement des protéines dans l'échantillon.

Pour la peinture composée de blanc de plomb, lysozyme et huile de lin (figure 2-30), il n'y a aucun changement relatif aux bandes du pigment ce qui montre la stabilité du blanc de plomb. Par contre, on observe également une diminution d'intensité pour les bandes relatives aux acides aminés tryptophanes. Le fond de fluorescence est aussi plus important et par conséquent le rapport signal sur bruit plus mauvais. Dans ce cas, nous ne pouvons pas évaluer l'effet du vieillissement sur la structure secondaire du lysozyme. En effet, la bande amide I étant peu intense et le signal bruité, il est impossible d'en effectuer une décomposition correcte.

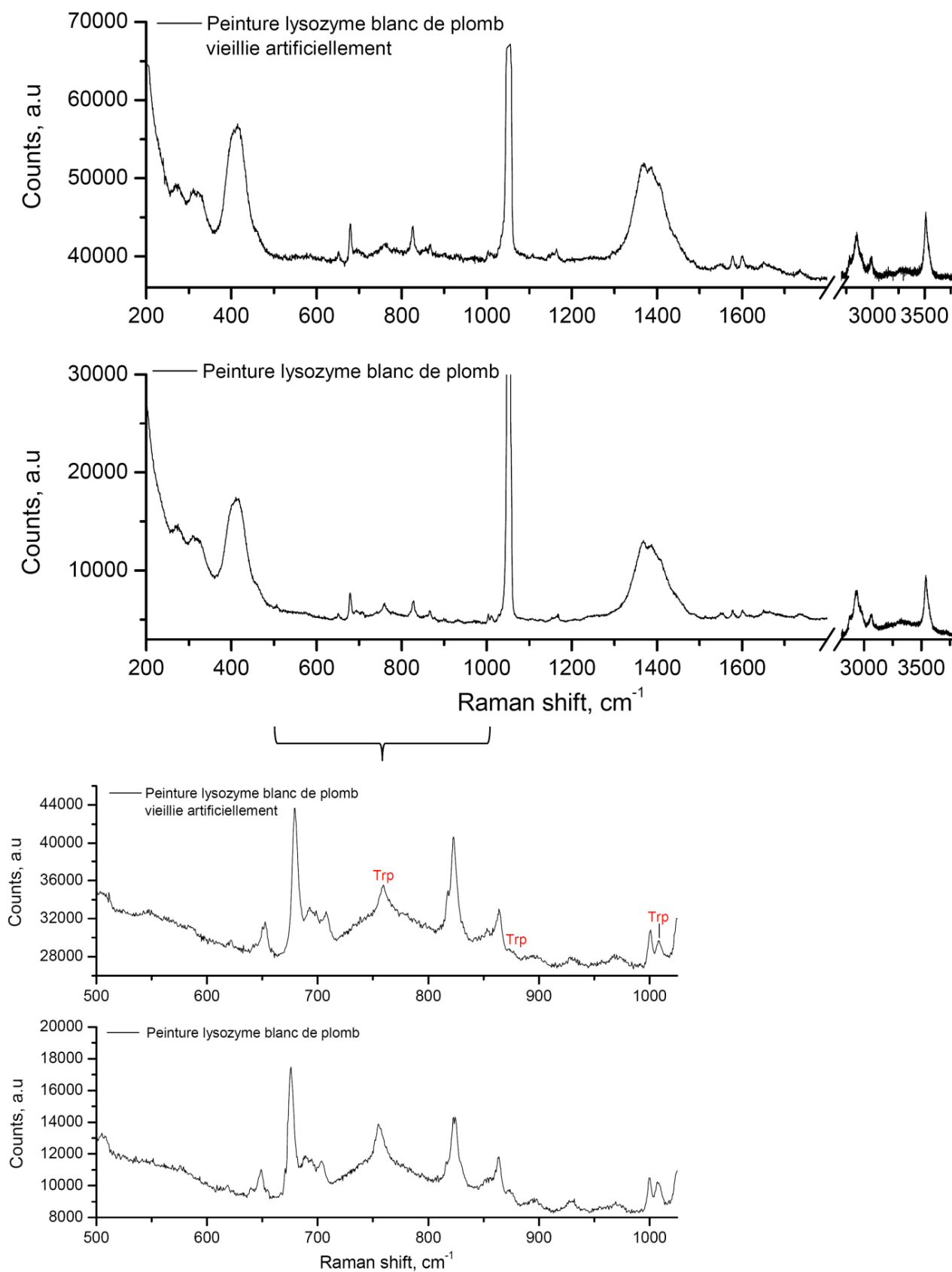


Figure 2-29: Spectre micro-Raman ($\lambda=632,8$ nm) de la peinture composée de blanc de plomb et de lysozyme après 3 semaines de vieillissement artificiel (haut) et non vieillie (bas)

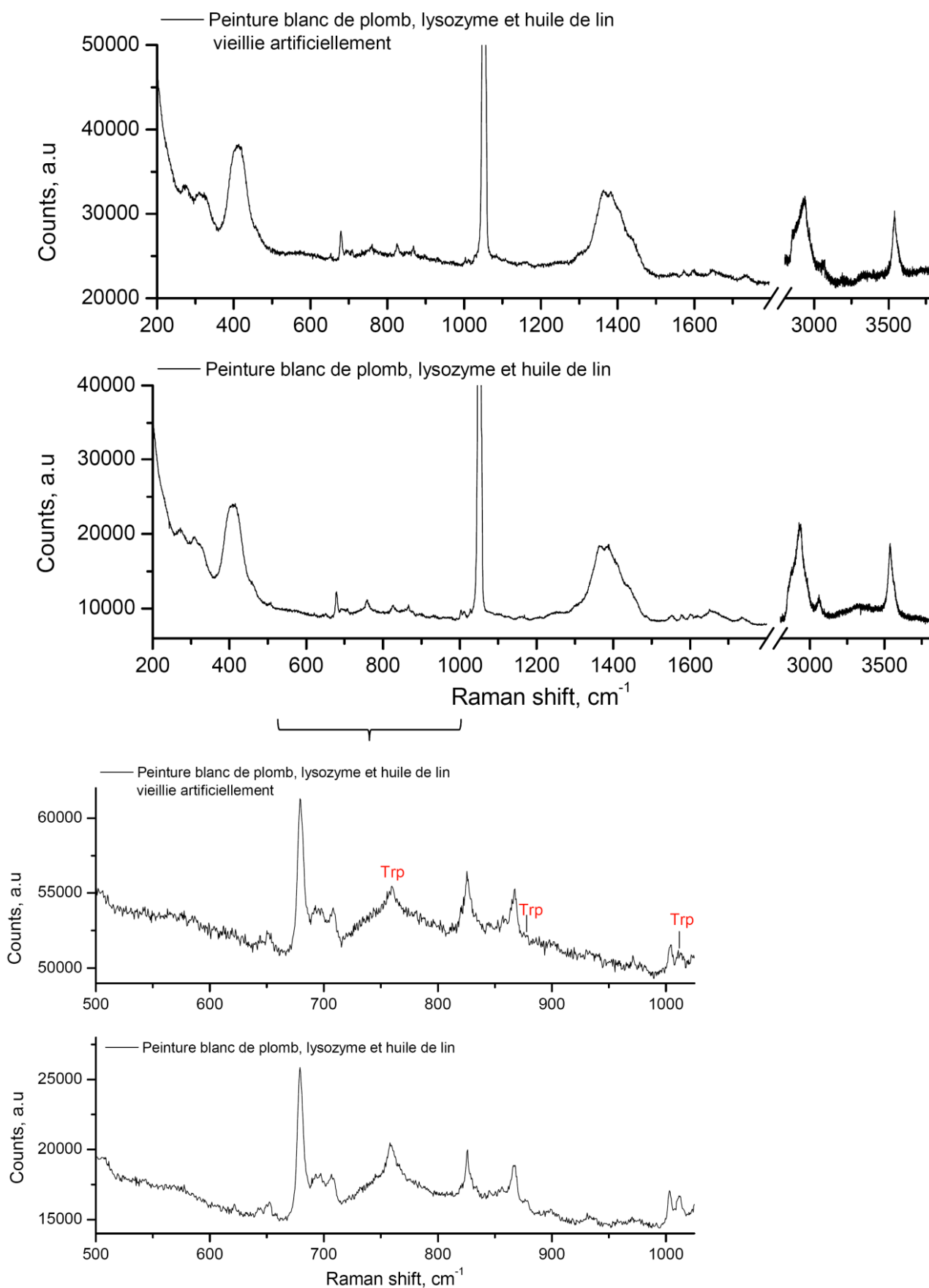


Figure 2-30: Spectres micro-Raman ($\lambda=632,8$ nm) de la peinture composée de blanc de plomb, lysozyme et huile de lin après 3 semaines de vieillissement artificiel (haut) et non vieillie (bas)

5.1.2. Analyse protéomique

Après 3 semaines de vieillissement artificiel (240h d'expositions aux rayons UV), un prélèvement a été effectué sur chaque échantillon afin d'en réaliser l'extraction protéique, l'hydrolyse enzymatique et l'analyse par spectrométrie de masse. Les spectres obtenus sont comparés avec les spectres de digests de lysozyme extrait de peintures fraîches, ce qui permet de repérer les modifications chimiques induites par le vieillissement artificiel.

Pour la peinture composée uniquement de pigment et de protéines, des changements apparaissent sur le spectre MS suite au vieillissement artificiel. Plus précisément, de nouveaux pics sont observés à m/z 1009,39 ; 1025,39 ; 1041,38 ; 1077,54 ; 1450,62 ; 1466,60.

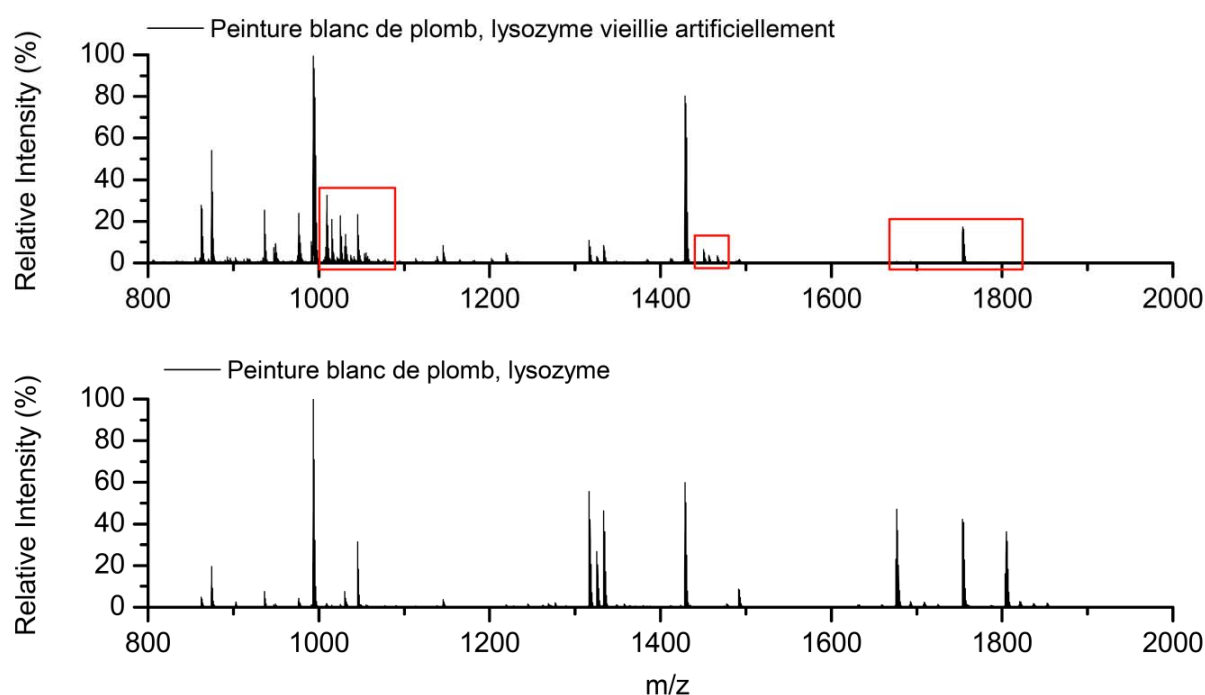


Figure 2-31: Spectres MS MALDI-TOF-TOF du digest de lysozyme extrait de la peinture blanc de plomb lysozyme après 3 semaines de vieillissement artificiel (haut) et non vieilli (bas)

Les pics à m/z 1009,39 ; 1025,39 et 1077,54 ont déjà été observés auparavant dans le cas de la peinture composée de blanc de plomb, lysozyme et huile de lin. Nous avons tout de même fragmenté ces peptides afin de vérifier si la nature et la localisation de la modification étaient identiques dans le cas présent. Les spectres MS/MS obtenus ont conduit aux mêmes identifications que celles réalisées auparavant pour ces pics. En ce qui concerne l'ion à m/z 1041,38 le spectre MS/MS a permis d'identifier le peptide WWCNDGR (position 80-86) avec la cystéine carbamidométhylée, une dioxydation sur le tryptophane en position 80 et une oxydation sur le tryptophane en position 81. Les pics à m/z 1450,62 et 1466,60 sont attribués

au peptide WWCNDGRTPGSR (80-91) qui inclue un clivage manqué de la trypsine avec respectivement une oxydation et une dioxydation sur le tryptophane en position 80. Ces modifications ont aussi été identifiées sur le peptide WWCNDGR (m/z 1009,39 et 1025,39).

A l'inverse, les deux pics à m/z 1691,79 et 1803,89 ont quasiment disparu comme pour l'échantillon de peinture fraîche composée de blanc de plomb, lysozyme et huile de lin. De plus, le pic à m/z 1753,84 (peptide NTDGSTDYGILQINSR en position 64-79) a également diminué d'intensité, ce qui est observé pour la première fois.

Pour la peinture composée de blanc de plomb, lysozyme et huile de lin, un échantillon a également été prélevé après 3 semaines de vieillissement artificiel. Après extraction et digestion du lysozyme contenu dans la peinture, le spectre de masse a été enregistré et comparé au spectre de masse du digest de lysozyme extrait de la peinture non vieillie afin de mettre en évidence les modifications provoquées par le vieillissement de la peinture (figure 2-32).

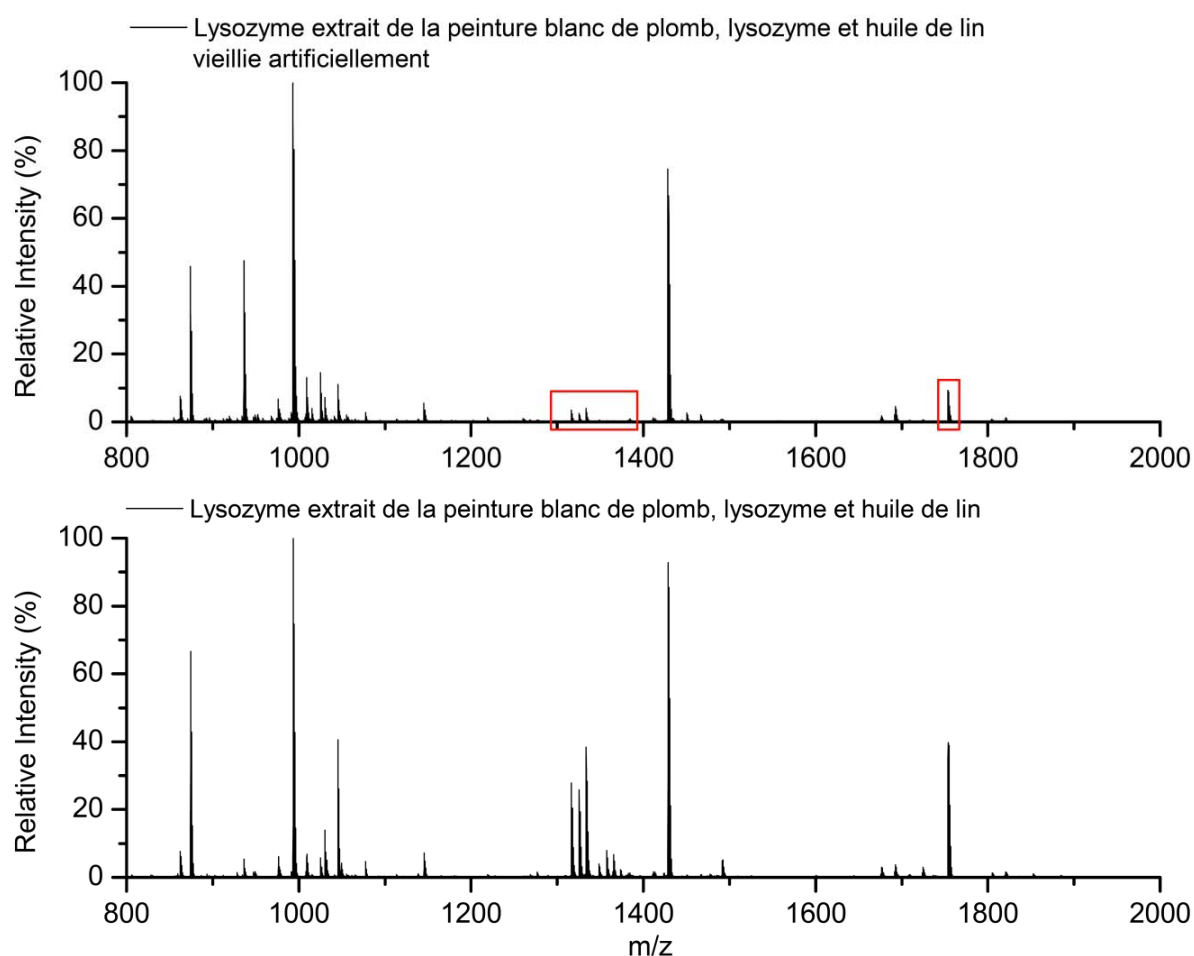


Figure 2-32: Spectres MS MALDI-TOF-TOF du digest de lysozyme extrait de la peinture blanc de plomb, lysozyme et huile de lin après 3 semaines de vieillissement artificiel (haut) et non vieillie (bas)

Certains peptides modifiés, déjà identifiés pour l'échantillon de peinture fraîche, sont identifiés après vieillissement artificiel (pics à m/z 1009,39 ; 1025,39 ; 1077,54 et 1691,79). Inversement les pics à m/z 1348,63 ; 1357,62 ; 1365,66 et 1723,79 ne sont pas présents sur le spectre.

Le pic à m/z 1041,38 attribué au peptide W(diox)W(ox)C(cam)NDGR, observé lors du vieillissement artificiel de la peinture sans huile est aussi identifié ici ainsi que la diminution d'intensité du pic à m/z 1753,84 (peptide NTDGSTDYGILQINSR en position 64-79).

5.2. Vieillissement naturel

Les peintures modèles ont été conservées dans le laboratoire à l'air libre et à température ambiante pendant 2 ans.

5.2.1. Etude par micro-Raman

En ce qui concerne la peinture composée de blanc de plomb et de lysozyme, nous observons qu'après 2 ans de vieillissement naturel les bandes attribuées au blanc de plomb restent inchangées. Les bandes du lysozyme sont les plus affectées par le vieillissement naturel. Comme on peut le voir sur la figure 2-33, les bandes attribuées aux acides aminés tryptophanes, phénylalanines et cystéines diminuent en intensité et on distingue difficilement la bande amide I. De manière générale, les bandes caractérisant le lysozyme sont d'intensité plus faible excepté les bandes reliées à la vibration des groupements CH ($2900-3100\text{ cm}^{-1}$) qui restent inchangées.

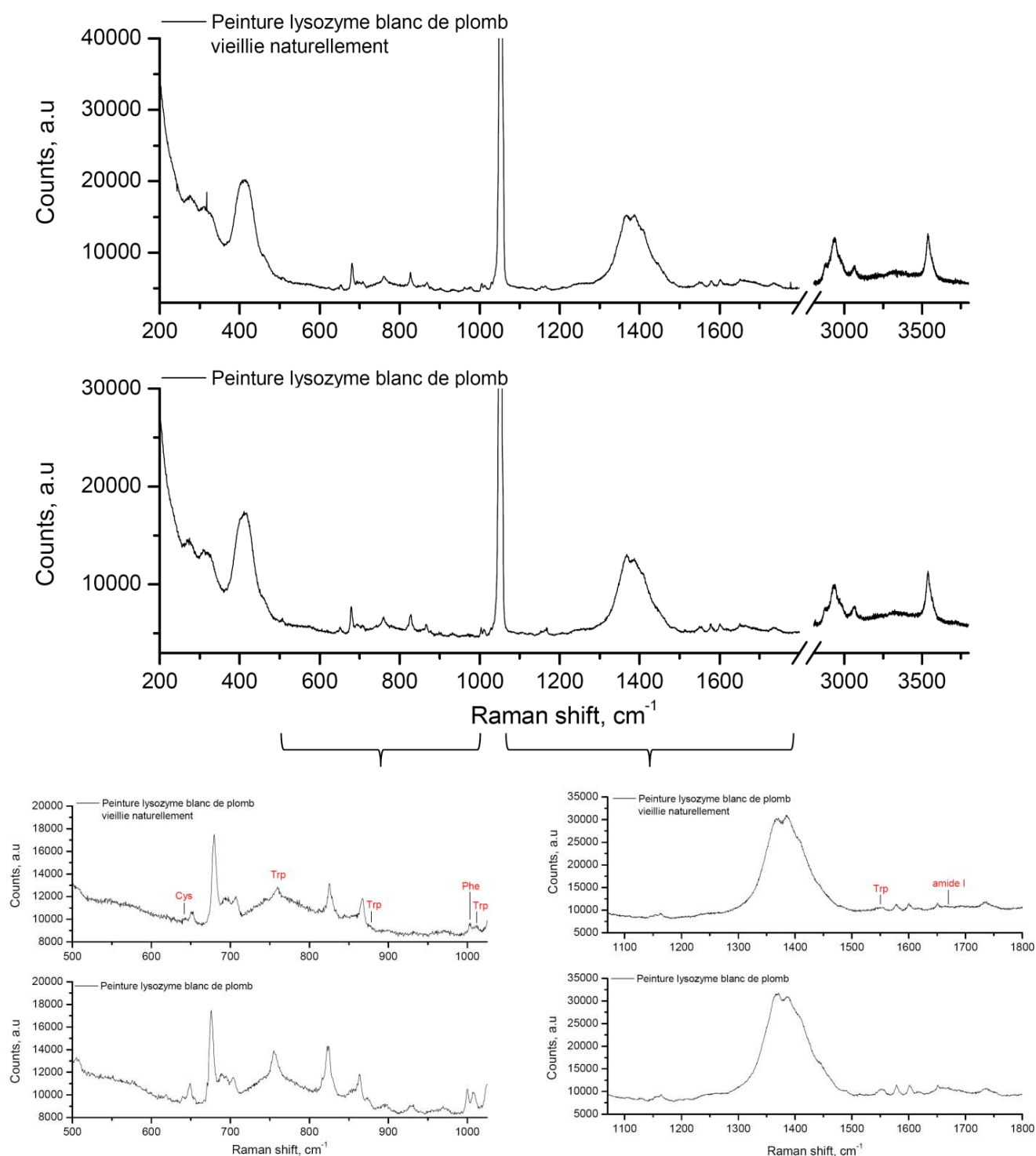


Figure 2-33: Spectres ($\lambda=632,8$ nm) micro-Raman de la peinture composée de blanc de plomb et de lysozyme après 2 ans de vieillissement naturel (haut) et non vieillie (bas)

En ce qui concerne la peinture composée de blanc de plomb, lysozyme et huile de lin, le fond de fluorescence est très important ; si l'on augmente le temps d'acquisition à plus de une minute, le détecteur est totalement saturé. Le seul spectre qui a pu être enregistré est montré sur la figure 2-34. A cause du faible temps d'acquisition disponible, de la fluorescence et donc du très mauvais rapport signal sur bruit, on voit seulement le doublet caractéristique

de la vibration ν_1 de l'ion carbonate dans l'hydrocérusite. On ne peut donc rien conclure quant à l'effet du vieillissement sur les composés de la peinture, hormis constater que le vieillissement augmente considérablement la fluorescence de l'échantillon. La fluorescence étant particulièrement intense pour cet échantillon, nous pouvons supposer qu'elle est induite par l'effet du temps sur l'huile de lin.

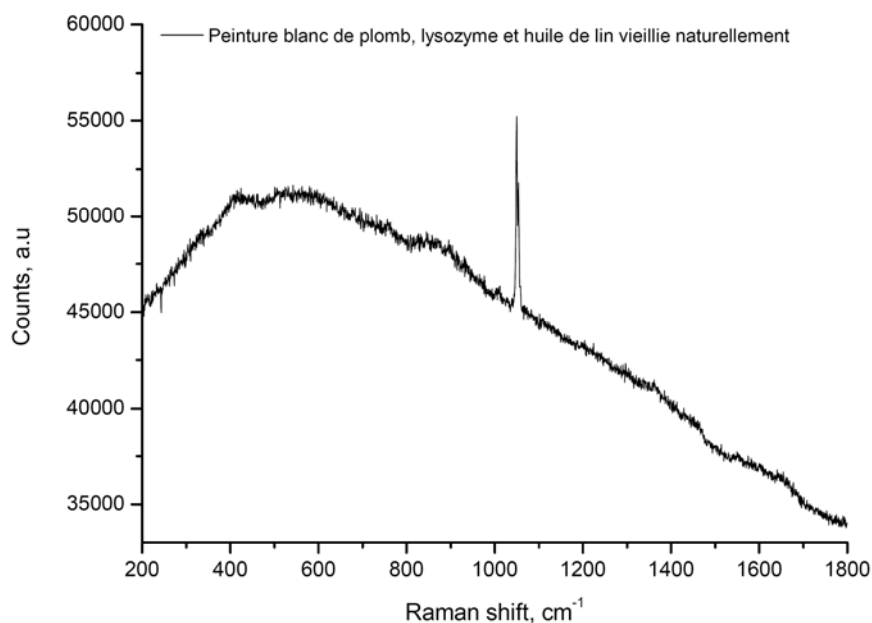


Figure 2-34: Spectre micro-Raman ($\lambda=632,8$ nm) de la peinture composée de blanc de plomb, lysozyme et huile de lin après 2 ans de vieillissement naturel

5.2.2. Analyse protéomique

Des prélèvements ont été effectués sur les peintures modèles après 2 ans de vieillissement naturel. Les protéines ont été extraites et digérées et le spectre de masse correspondant à chaque échantillon a été enregistré.

Pour la peinture composée de blanc de plomb et de lysozyme vieillie naturellement, de nouveaux pics sont observés à m/z 1009,39 ; 1025,39 ; 1041,38 ; 1077,54 ; 1348,63 ; 1357,62 ; 1365,66 ; 1450,62 et 1723,79. Le spectre MS de la peinture blanc de plomb – lysozyme vieillie naturellement ressemble au spectre MS de la peinture blanc de plomb, lysozyme et huile de lin non-vieillie. Les modifications chimiques induites par le vieillissement naturel identifiées pour cet échantillon sont : oxydation et dioxydation sur le tryptophane en position 80, oxydation sur le tryptophane en position 81, dioxydation sur le tryptophane en position 141, dioxydation sur le tryptophane en position 46, dioxydation sur le tryptophane en position 126. On observe également une augmentation d'intensité du pic à m/z 1691,79 correspondant au peptide 116-130 (IVSDGNGMNAWVAVR) avec une méthionine

oxydée en méthionine sulfoxyde (+16 Da). Par ailleurs, les pics à m/z 1675,80 et 1803,89 correspondant aux peptides 116-130 et 115-130 non modifiés diminuent en intensité de manière très significative.

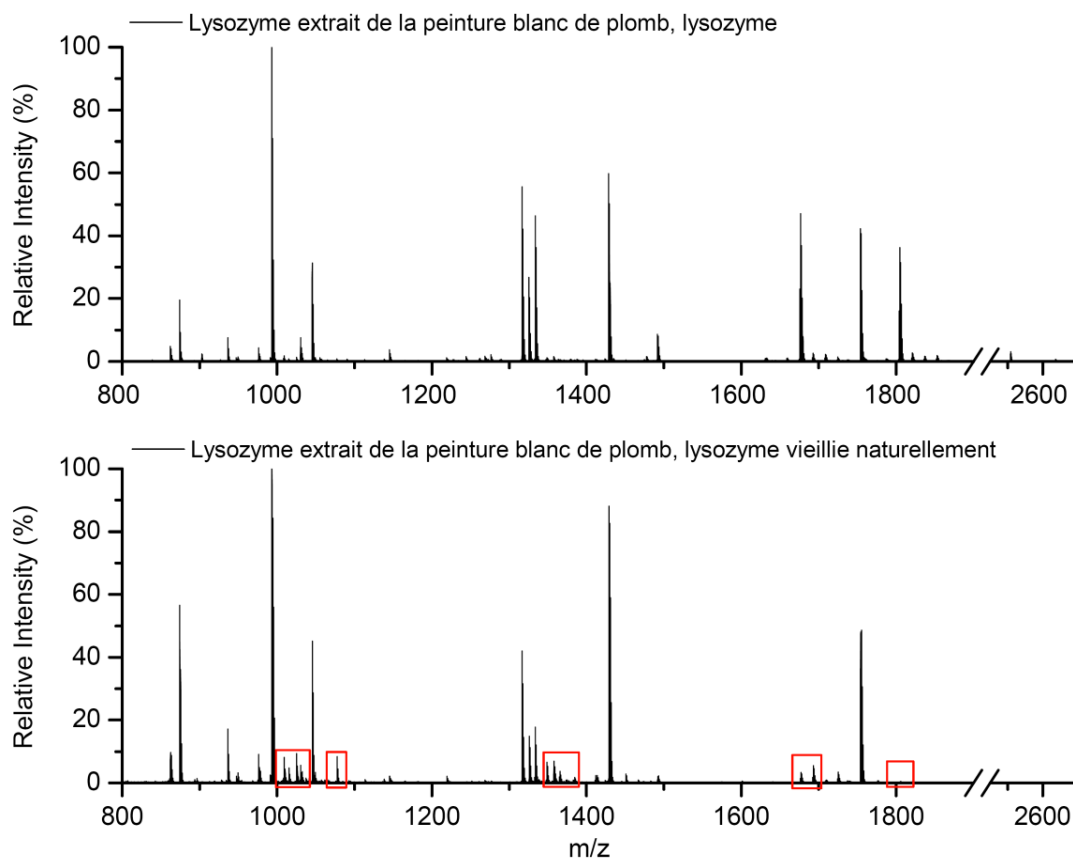


Figure 2-35: Spectres MS MALDI-TOF-TOF du digest de lysozyme extrait de la peinture blanc de plomb lysozyme après 2 ans de vieillissement naturel (haut) et non vieilli (bas)

Dans le cas de la peinture composée de blanc de plomb, lysozyme et huile de lin vieillie naturellement, une augmentation significative d'intensité est observée pour les pics à m/z 1009,39 ; 1025,39 ; 1041,38 ; 1077,54 et des nouveaux pics apparaissent à m/z 1048,48 et 1065,52. Les pics à m/z 1048,48 et 1065,52 correspondent au peptide CELAAAMKR (24-32) avec la méthionine oxydée en méthionine sulfoxyde et dans le premier cas une pyro-carbamidométhylation de la cystéine, dans le second cas une carbamidométhylation de la cystéine. Après vieillissement naturel, le pic à 1675,80 (peptide 116-130 non modifié) a encore diminué d'intensité alors que celui à 1691,79 attribué au peptide 116-130 avec la méthionine oxydée en méthionine sulfoxyde voit son intensité augmenter.

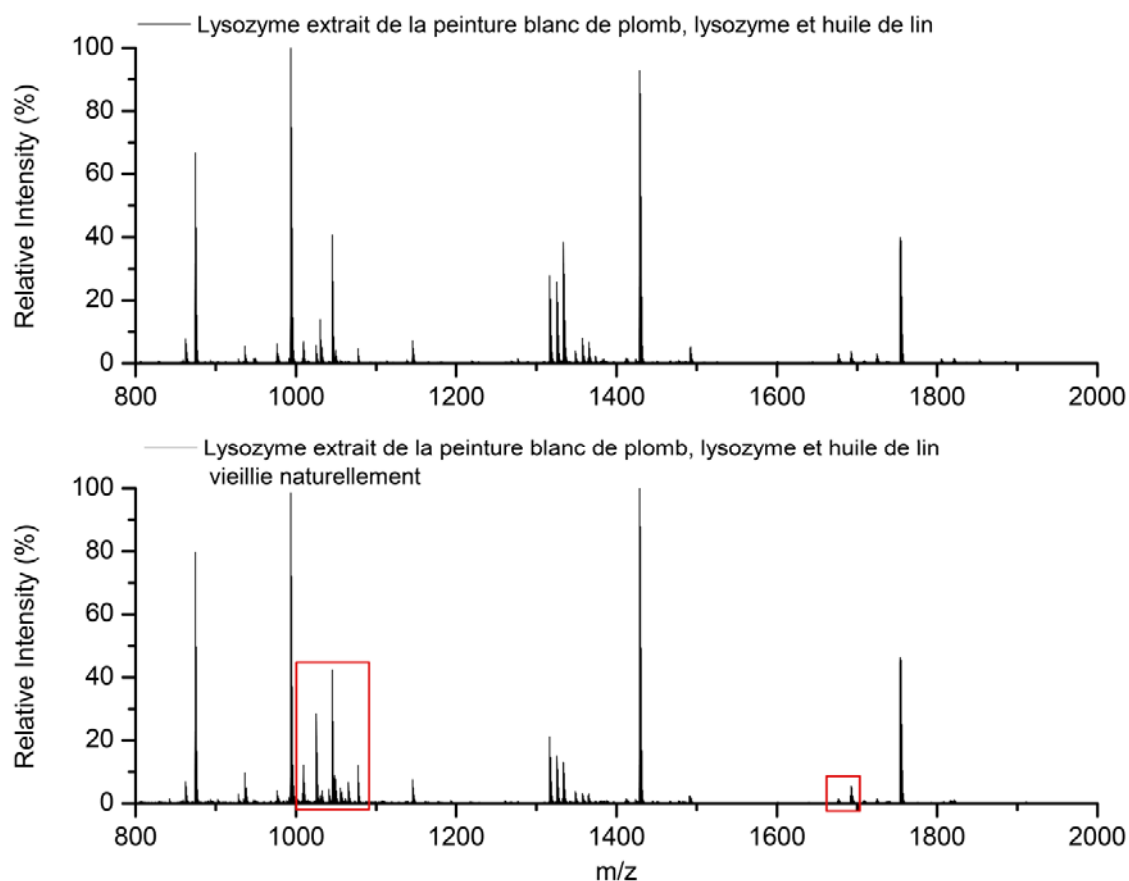


Figure 2-36: Spectre MS MALDI-TOF-TOF du digest de lysozyme extrait de la peinture blanc de plomb, lysozyme et huile de lin après 2 ans de vieillissement naturel (haut) et non vieillie (bas)

En résumé nous avons étudié deux peintures de composition différentes (avec et sans huile de lin) dans trois conditions :

- échantillons non vieillis
- échantillons vieillis artificiellement (240h d'exposition à des rayonnements UV, T=25°C, humidité 50%)
- échantillons vieillis naturellement (air libre, conditions de luminosité naturelle)

Les résultats obtenus pour chaque échantillon ainsi que les modifications chimiques identifiées pour le lysozyme sont récapitulées dans les tables 2-8 et 2-9 présentées ci-dessous (BP signifie blanc de plomb, lyso signifie lysozyme et HL huile de lin).

	Echantillons	Observations	
		Raman	Protéomique
Peintures non vieilles	BP + Lyso	- Changement de structure secondaire du lysozyme	
	BP + Lyso + HL	- Changement de structure secondaire observée dans le cas de la peinture sans huile observée également ici → ajout d'huile (dans les proportions utilisées ici) n'a pas d'effet sur la structure secondaire - Augmentation de la fluorescence de l'échantillon par rapport à la peinture sans huile	- Oxydation d'acides aminés tryptophanes en hydroxytryptophane et N-formylkynurénine - Forte diminution d'intensité du signal des peptides à m/z 1675,8 (IVSDGNGMNAWV AWR) et à m/z 1803,89 (KIVSDGNGMNAWV AWR)
Peintures vieilles artificiellement	BP + Lyso	- Diminution d'intensité des bandes du tryptophane - Diminution d'intensité de la bande amide I → pas de décomposition, pas d'information sur structure secondaire - Augmentation de la fluorescence de l'échantillon par rapport à la peinture non vieillie de même composition	- Oxydation d'acides aminés tryptophanes en hydroxytryptophane et N-formylkynurénine - Forte diminution d'intensité du signal des peptides à m/z 1675,8 (IVSDGNGMNAWV AWR) et à m/z 1803,89 (KIVSDGNGMNAWV AWR) - Diminution d'intensité du signal à m/z 1753,84 (peptide NTDGSTDYGILQINSR)
	BP + Lyso + HL	- Diminution d'intensité des bandes du tryptophane - Diminution d'intensité de la bande amide I → pas de décomposition, pas d'information sur structure secondaire - Augmentation de la fluorescence de l'échantillon par rapport à la peinture non vieillie de même composition	- Augmentation d'intensité du signal attribué aux peptides contenant des tryptophanes oxydés - Forte diminution d'intensité du signal des peptides à m/z 1675,8 (IVSDGNGMNAWV AWR) et à m/z 1803,89 (KIVSDGNGMNAWV AWR) - Diminution d'intensité du signal à m/z 1753,84 (peptide NTDGSTDYGILQINSR)
Peintures vieilles naturellement	BP + Lyso	- Diminution d'intensité des bandes attribuées aux protéines	- Oxydation d'acides aminés tryptophanes en hydroxytryptophane et N-formylkynurénine - Forte diminution d'intensité du signal des peptides à m/z 1675,8 (IVSDGNGMNAWV AWR) et à m/z 1803,89 (KIVSDGNGMNAWV AWR)
	BP + Lyso + HL	- Très forte fluorescence de l'échantillon (saturation du détecteur si temps d'acquisition > 1 minute) → fluorescence très probablement induite par les produits issus de la dégradation de l'huile	- Augmentation d'intensité du signal attribué aux peptides contenant des tryptophanes oxydés - Oxydations d'acides aminés méthionines - Forte diminution d'intensité du signal des peptides à m/z 1675,8 (IVSDGNGMNAWV AWR) et à m/z 1803,89 (KIVSDGNGMNAWV AWR)

Table 2-8: Résultats obtenus par analyses Raman et protéomique pour chaque peinture modèle

m/z	Séquence	Position	Δm (Da)	Nature et localisation de la modification	Peinture non-vieille		Peintures vieilles artificiellement		Peintures vieilles naturellement	
					BP + lyso	BP + lyso + HL	BP + lyso	BP + lyso + HL	BP + lyso	BP + lyso + HL
1009,39	WWCNDGR	80-86	57 + 16	carbamidomethyl (C) + oxydation (W80)		x	x	x	x	x
1025,39	WWCNDGR	80-86	57 + 32	carbamidomethyl (C) + dioxydation (W80)		x	x	x	x	x
1041,38	WWCNDGR	80-86	57 + 48	carbamidomethyl (C) + dioxydation (W80) + oxydation (W81)			x	x	x	x
1048,48	CELAAAMKR	24-32	40 + 16	pyrocarbamidomethyl (C) + oxydation (M)						x
1065,52	CELAAAMKR	24-32	57 + 16	carbamidomethyl (C) + oxydation (M)						x
1077,54	GTDVQAWIR	135-143	32	dioxydation (W141)		x	x	x	x	x
1348,63	CKGTDVQAWIR	133-143	40 + 32	pyrocarbamidomethyl (C) + dioxydation (W141)		x			x	x
1357,62	GYSLGNWVCAAK	40-51	57 + 32	carbamidomethyl (C) + dioxydation (W46)		x			x	x
1365,66	CKGTDVQAWIR	133-143	57 + 32	carbamidomethyl (C) + dioxydation (W141)		x			x	x
1450,62	WWCNDGRTPGSR	80-91	16	Oxydation (W80)			x		x	
1466,60	WWCNDGRTPGSR	80-91	32	Dioxydation (W80)			x			
1691,79	IVSDGNGMNAWVAWR	116-130	16	oxydation (M)		x		x	x	x
1723,79	IVSDGNGMNAWVAWR	116-130	16 + 32	oxydation (M123) + dioxydation (W126)		x			x	x

Table 2-9: Modifications chimiques identifiées sur le lysozyme extrait des différents échantillons de peinture

Les résultats obtenus par analyse spectroscopique et protéomique ayant été présentés, la partie suivante sera axée sur la discussion et l'interprétation de ces résultats.

6. Discussion

6.1. Peintures non-vieilles

Dans un premier temps, l'analyse des peintures non-vieilles a été effectuée par micro-Raman. Pour les deux types de peinture étudiées (avec et sans huile de lin), un changement relatif au liant protéique, ici modélisé par une solution de lysozyme, a été observé. La décomposition de la bande amide I nous indique qu'il y a un changement de structure secondaire du lysozyme : cette protéine majoritairement en hélice α dans l'état natif se réarrange, après mise en peinture, en conformation β .

Un tel changement de structure peut être dû à plusieurs facteurs dont la déshydratation des protéines⁶⁴. Dans le cas du lysozyme, des études réalisées par spectroscopie infrarouge montrent que la déshydratation entraîne une diminution d'intensité de la bande attribuée aux hélices α et à l'inverse une augmentation d'intensité des bandes attribuées aux conformations en feuillets β ^{65, 66}. Ce changement de structure s'explique de la manière suivante : la

déshydratation des protéines qui est une perte de molécules d'eau entraîne un manque de liaisons hydrogènes qui est compensé par la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires ce qui conduit à la formation de feuillets β ⁶⁴. Des additifs, en particulier des carbohydrates tel que le sucrose ou tréhalose, ou encore des PEG⁶⁷, sont donc utilisés lors des processus de lyophilisation afin de protéger la protéine de ce changement de structure.

Dans ce travail, la décomposition de la bande amide I du lysozyme dans la peinture montre que par rapport à la structure native, la protéine a changé de structure secondaire et la conformation en feuillets β est dominante. Nous pouvons nous interroger sur l'origine du changement de conformation dans notre cas : est-il la conséquence d'une simple déshydratation causé par une perte de molécules d'eau lors du séchage de la peinture ou le blanc de plomb joue-t-il réellement un rôle important sur ce changement de structure ? Aucun déplacement de bandes n'a été observé sur les spectres Raman, ni pour le blanc de plomb ni pour la protéine. Il n'y a donc pas d'interaction impliquant de liaisons covalentes ou liaisons hydrogènes entre ces deux composés. Il n'est pas exclu qu'une faible interaction puisse exister entre le pigment et la protéine. Cependant, les techniques utilisées dans cette étude ne nous permettent pas de le montrer.

L'analyse protéomique, dont le but est d'identifier les modifications chimiques causées par les autres composés de la peinture sur les protéines du liant, nous montre que dans le cas de la peinture pigment – protéine non vieillie, le lysozyme ne présente pas de modifications chimiques.

En revanche, dans toutes les autres conditions d'analyse, c'est-à-dire peinture non vieillie avec huile de lin, peintures vieillies artificiellement (avec et sans huile) et peintures vieillies naturellement (avec et sans huile), des modifications ont été identifiées.

6.2. Modifications chimiques induites par la présence d'huile de lin dans la peinture non-vieillie

L'analyse protéomique montre que des modifications chimiques sont induites sur le lysozyme par ajout d'huile de lin dans la peinture composé. En effet, l'interprétation des spectres MS/MS a montré que sur les 6 acides aminés tryptophanes présents dans le lysozyme, 4 étaient oxydés. Deux composés différents ont été identifiés pour le tryptophane

en position 80: l'hydroxytryptophane et la *N*-formylkynurénine, alors que les tryptophanes en position 46, 126 et 141 sont oxydés en *N*-formylkynurénine.

De manière générale les acides aminés aromatiques sont facilement oxydés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ^{60, 68, 69}. Plus particulièrement, il a été montré que les résidus tryptophanes étaient couramment oxydés par le peroxyde d'hydrogène ⁷⁰⁻⁷², l'ozone ⁷³, les produits d'oxydation des lipides ^{74, 75} ou encore la photo-oxydation ⁷⁶ et la formation de la *N*-formylkynurénine est connue depuis plus de 35 ans ⁷⁷.

Dans le cas présent, la peinture contient de l'huile de lin. Le séchage de l'huile est en réalité un phénomène d'oxydation : l'huile polymérise et durcit ce qui engendre la formation d'un film à la surface de la peinture et « emprisonne » les pigments. De plus, le blanc de plomb est un agent siccatif c'est-à-dire qu'il accélère ce processus de polymérisation ⁷⁸.

L'analyse protéomique nous indique que la présence d'huile de lin dans la peinture induit des oxydations et/ou dioxydations sur les acides aminés tryptophanes du lysozyme. Ces oxydations sont probablement causées par les radicaux libres issus de l'oxydation des lipides ⁷⁹⁻⁸¹. Par ailleurs, il est mentionné dans la littérature que les protéines réagissent également avec les produits non radicalaires résultant de l'oxydation des lipides (aldéhydes, cétones ...) ^{82, 83} pour générer des dérivés carbonylés et conduit en particulier à la formation d'adduits de base de Schiff sur les lysines ^{84, 85} ; cependant ce type de modification n'a pas été identifié dans cette étude. La littérature montre que l'oxydation du tryptophane se traduit sur les spectres Raman par l'apparition de bandes caractéristiques, en particulier, une bande à $\sim 1050 \text{ cm}^{-1}$ ^{86, 87} indique la présence de *N*-formylkynurénine. Dans notre cas, malheureusement, la bande la plus intense du blanc de plomb, correspondant au mode de vibration ν_1 des ions carbonates, est un doublet dont les maxima se trouvent à 1048 et 1052 cm^{-1} . Cette bande couvre donc toute autre bande possible dans cette région.

Sur le spectre MS du lysozyme extrait de la peinture blanc de plomb, lysozyme et huile de lin, deux pics présentent une diminution significative d'intensité : les pics à m/z 1675,80 et 1803,89 qui correspondent aux peptides 116-130 (IVSDGNGMNAWVAWR) et 115-130 (KIVSDGNGMNAWVAWR). Dans les banques de données protéomiques (<http://www.uniprot.org/>) et la littérature, l'acide aspartique en position 119 (D119) est référencé comme étant un site de liaison. En particulier, différents travaux publiés dans la littérature ont montré que dans certaines conditions de température et de pH cet acide aminé était capable de se lier au *N*-acetyl-Glucosamine (GlcNAc) ⁸⁸⁻⁹¹. De plus, Yamada *et al.* ont remarqué que lorsque le lysozyme était modifié par le 1-Ethyl-(3-

diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC), les pics attribués aux peptides 115-130 et 116-130 disparaissaient du chromatogramme, alors que de nouveaux pics attribués aux peptides 115-119 (KIVSD), 116-119 (IVSD) et 120-130 (GNGMNAWVAWR) apparaissaient⁹². Par ailleurs, il a également été reporté que cet acide aminé pouvait se lier à des ions métalliques⁹³,⁹⁴. Dans notre cas, les pics relatifs aux peptides contenant l'acide aspartique en position 119 diminuent d'intensité. Toutefois, les pics correspondants aux peptides qui pourraient être obtenus par hydrolyse de la liaison entre D119 et G120 n'ont pas été identifiés sur le spectre. De la même façon, nous avons pensé à une éventuelle liaison avec le plomb mais aucun pic permettant de confirmer cette hypothèse n'a pu être observé sur les spectres.

6.3. Effet du vieillissement artificiel

Lorsque les échantillons sont vieillis artificiellement c'est-à-dire exposés aux radiations UV pendant 240 h, les spectres Raman présentent un fond de fluorescence plus important. Le blanc de plomb n'est pas affecté et de manière générale les bandes du lysozyme sont moins intenses que lorsque la peinture n'est pas vieillie. Plus particulièrement les bandes attribuées aux acides aminés tryptophanes présentent une diminution d'intensité plus accentuée. Cela se remarque notamment en comparant les intensités relatives des bandes à 1003 et 1011 cm^{-1} attribuées respectivement aux phénylalanines et tryptophanes sur la figure 2-30.

Lors d'expériences de vieillissement de films de protéines, Nevin *et al.* ont montré par fluorescence et spectroscopie Raman que l'exposition à la lumière était responsable d'une oxydation partielle des tryptophanes du blanc d'œuf. En particulier, le signal Raman des tryptophanes à 758 cm^{-1} avait complètement disparu après un temps d'exposition à la lumière correspondant à 100 ans d'exposition dans un musée alors que les mesures de fluorescence ont révélé l'apparition d'un signal d'émission centré sur 435 nm attribué aux produits de dégradation des protéines du blanc d'œuf (produits issus de la réaction de Maillard et issus de la photo-oxydation du tryptophane)^{28,29}.

Afin de savoir si ce sont les rayons UV qui sont responsables de la dégradation des tryptophanes de la protéine, nous avons analysé une peinture qui a été conservée dans les mêmes conditions de température et d'humidité mais qui est restée dans le noir (figure 2-38).

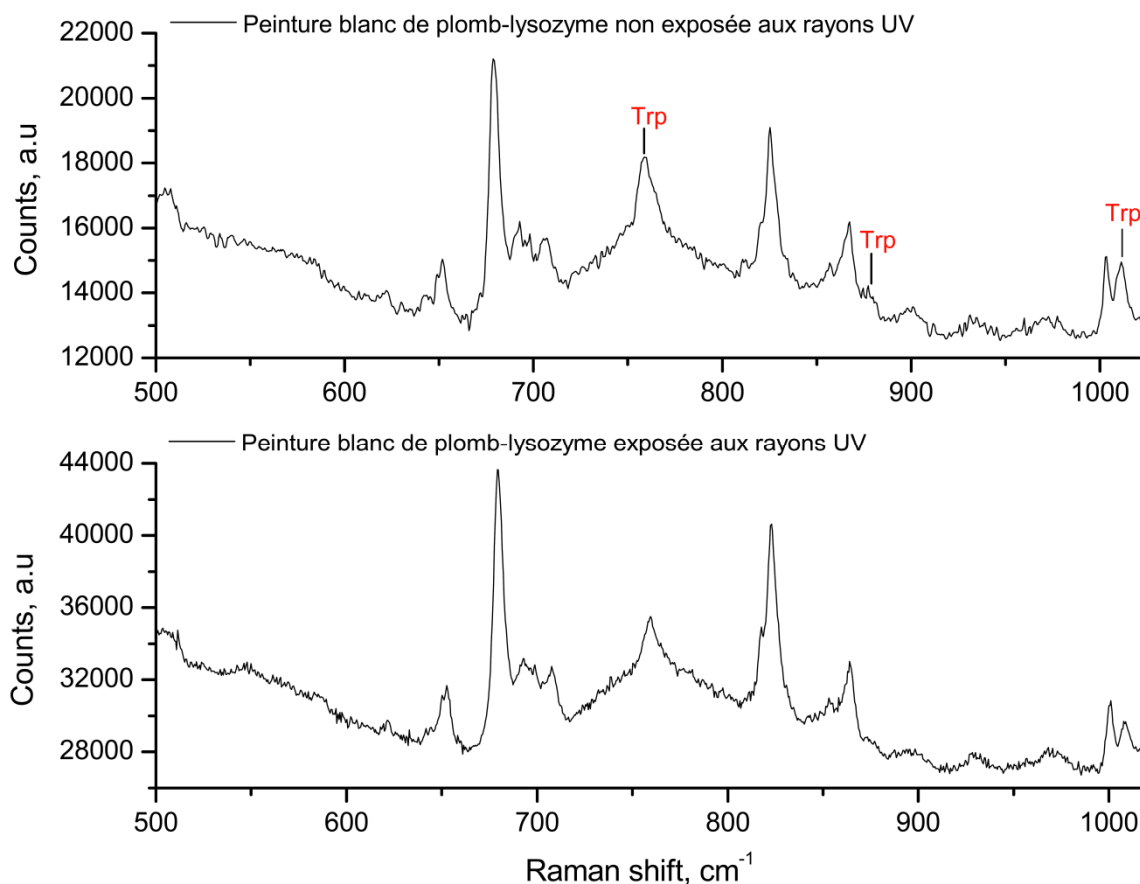


Figure 2-37: Spectres micro-Raman ($\lambda=632,8$ nm) enregistré entre 500 et 1025 cm^{-1} de la peinture blanc de plomb-lysozyme
Haut : non exposée aux rayons UV. Bas : exposée aux rayons UV.

Quand la peinture est soumise aux mêmes conditions de température et d'humidité mais sans exposition aux rayons UV, les bandes attribuées au tryptophane ne sont pas affectées et les intensités relatives des deux bandes à 1003 et 1011 cm^{-1} caractéristiques des acides aminés phénylalanines et tryptophanes sont respectées.

De plus, contrairement à l'échantillon exposé aux UV, la peinture conservée dans les mêmes conditions de température et d'humidité mais restée dans le noir n'a pas jauni (voir photographies en annexe). Par ailleurs, un échantillon de peinture composée de blanc de plomb et d'eau (sans protéines) a été soumis aux mêmes conditions de vieillissement artificiel. Cet échantillon témoin n'a pas jauni non plus. Ainsi, le jaunissement de l'échantillon est dû aux rayons UV et il n'est observé qu'en présence de protéines. Ces observations nous laissent penser que ce jaunissement de la peinture est dû à la photo-oxydation des tryptophanes.

Les analyses Raman effectuées dans ces travaux sont en accord avec les résultats qu'avaient obtenus Nevin *et al.* lors des études réalisées sur les films de protéines^{28, 29}. En

effet, nous montrons également que le vieillissement accéléré sous rayonnement UV affecte principalement les tryptophanes du liant protéique.

Il faut noter que les conclusions tirées des spectres Raman sont cohérentes avec l'analyse protéomique qui nous confirme que l'exposition aux rayons UV est responsable de l'oxydation des tryptophanes du lysozyme^{95,96}. Dans le cas de la peinture ne contenant pas d'huile, aucune modification n'avait été identifiée sur l'échantillon non vieilli suite à l'analyse protéomique. Après 240h d'irradiation UV le tryptophane en position 80 est oxydé et dioxydé, et le tryptophane en position 141 est dioxydé. De plus, le pic à 1691,79 correspondant au peptide 116-130 (IVSDGNGMNAWVAWR) avec le résidu méthionine oxydé augmente d'intensité et un nouveau pic à m/z 1041,38 correspondant au peptide 80-86 (WWCNDGR) avec dioxydation du tryptophane 80 et oxydation du tryptophane 81 est observé. A l'opposé, les pics attribués aux peptides 115-130 (KIVSDGNGMNAWVAWR) et 116-130 (IVSDGNGMNAWVAWR) diminuent fortement d'intensité. Ici, un troisième pic diminue significativement d'intensité : le pic à m/z 1753,84 attribué au peptide NTDGSTDYGILQINSR en position 64-79. Les banques de données protéomiques et la littérature réfèrent l'acide aspartique en position 70 comme étant un site actif capable de se lier à différents ions métalliques tels que le cuivre, le mercure, le plomb, le nickel, le cobalt etc...⁹⁷⁻¹⁰¹.

L'effet du vieillissement artificiel sur la peinture contenant de l'huile de lin se traduit principalement par la présence de certains pics attribués à des peptides contenant des acides aminés oxydés (W80, W81 et W141). Dans cet échantillon, la diminution d'intensité du pic à m/z 1753,84 (NTDGSTDYGILQINSR) est également notée. Contrairement à l'échantillon non vieilli, les pics attribués aux peptides avec les tryptophanes en position 46 et 126 dioxydés ne sont pas identifiés. Ceci peut être dû au fait que les molécules de *N*-formylkynurénine sont des meilleurs photo-sensibilisateurs que les acides aminés tryptophanes^{102,103}. Pendant une exposition continue à la lumière ces composés favorisent la formation d'oxygène singulet 1O_2 ce qui résulte en une augmentation de la dégradation de la protéine^{76,104}.

En prenant en considération les résultats de l'analyse protéomique, nous remarquons que la diminution d'intensité des bandes Raman attribuées aux acides aminés tryptophanes peut donc bien être caractéristique de l'oxydation de ces composés.

6.4. Effet du vieillissement naturel

Lorsque les échantillons sont vieillis de manière naturelle (exposition à la lumière naturelle à température ambiante), nous observons une diminution d'intensité de toutes les bandes Raman du lysozyme. Si on se focalise sur les bandes à 1003 et 1011 cm^{-1} montrées figure 2-33, nous remarquons qu'elles diminuent toutes les deux en intensité, ce qui montre que le tryptophane n'est pas dégradé préférentiellement par rapport à la phénylalanine. Contrairement au vieillissement sous UV, le vieillissement naturel entraîne une dégradation complète de la protéine et ne cible pas un type d'acide aminé en particulier.

Dans le cas de la peinture contenant de l'huile, le vieillissement naturel a induit une telle fluorescence qu'il n'a pas été possible d'enregistrer de spectre Raman correct de l'échantillon. Cette fluorescence est probablement causée par les nombreux produits d'oxydation des lipides ¹⁰⁵ accumulés au sein de l'échantillon au cours de ce temps d'exposition prolongé à la lumière naturelle auxquels il faut ajouter les produits de dégradation des protéines.

Dans les deux échantillons (peinture avec et sans huile), le peptide en position 80-86 (WWCNDGR) qui contient deux tryptophanes à la suite (en position 80 et 81) est identifié sous différentes formes : avec W80 simplement oxydé, avec W80 dioxydé et enfin avec W80 dioxydé et W81 simplement oxydé ce qui montre que les oxydations se localisent préférentiellement sur le résidu en position 80 avant d'attaquer le tryptophane en position 81. Cette localisation préférentielle a déjà été reportée dans différentes études consacrées aux modifications du lysozyme. Okajima *et al.* ont montré que le tryptophane en position 80 était spécifiquement oxydé en *N*-formylkynurénine par réaction avec l'ozone ⁷³ alors que Maleknia *et al.* ont observé la même chose lors d'expériences d'oxydation avec des radicaux hydroxyles ¹⁰⁶. Le tryptophane en position 80 étant plus accessible que le tryptophane en position 81, il est plus sujet aux modifications ¹⁰⁶.

Les pics relatifs aux peptides 115-130 (KIVSDGNGMNAWVAWR) et 116-130 (IVSDGNGMNAWVAWR) diminuent d'intensité de manière significative ici aussi. En revanche, le peptide 64-79 (NTDGSTDYGILQINSR), dont l'intensité avait fortement diminué suite à l'exposition aux rayons UV, n'est pas affecté lors du vieillissement naturel. Cela montre que la longueur d'onde de la lumière utilisée pour le vieillissement artificiel (365 nm) a un effet plus « destructeur » pour les protéines.

Pour l'échantillon de peinture contenant de l'huile, en plus des modifications déjà identifiées sur l'échantillon non vieilli, des pics attribués au peptide 24-32 (CELAAAMKR) avec le résidu méthionine oxydé sont identifiés. Le vieillissement naturel est responsable de l'oxydation des résidus tryptophanes et, dans le cas de la peinture contenant de l'huile de lin, des résidus méthionine également. Dans les systèmes biologiques, l'oxydation des méthionines est couramment reportée comme étant une conséquence du vieillissement des cellules¹⁰⁷.

7. Conclusion

Ces études spectroscopiques et protéomiques visaient à comprendre le devenir des protéines utilisées en liant de peinture.

D'une part, l'analyse micro-Raman montre que, lorsque la protéine est utilisée comme liant de peinture avec le blanc de plomb, la décomposition de la bande amide I du lysozyme révèle un changement de structure secondaire du lysozyme après mise en contact avec le pigment. Le lysozyme, majoritairement en hélices α dans sa structure native, se réarrange ici pour former des conformères de type β . D'autre part, aucune modification chimique n'a été identifiée sur le lysozyme extrait de cette peinture non vieillie.

Lorsque de l'huile de lin est ajoutée à la peinture, le changement de structure secondaire déjà observé dans le cas de la peinture blanc de plomb-lysozyme est de nouveau identifié. L'analyse micro-Raman nous montre donc que dans les proportions utilisées ici l'ajout d'huile de lin dans la peinture n'induit pas de changement structural sur le lysozyme. L'analyse protéomique permet d'identifier de nombreuses oxydations localisées principalement sur les acides aminés tryptophanes. Ces modifications résultent probablement de réactions avec les radicaux libres qui sont produits lors de l'oxydation des lipides contenus dans l'huile de lin.

Lorsque les peintures sont vieilles, naturellement ou de manière artificielle, des oxydations sont identifiées pour la peinture composée de protéines et de pigment. Des oxydations supplémentaires, notamment sur les résidus méthionines, sont identifiées lorsqu'il y a de l'huile de lin dans la peinture. Les spectres Raman montrent que le vieillissement dégrade le liant protéique. Les rayons UV provoquent principalement l'oxydation des acides aminés tryptophanes alors que le vieillissement en conditions naturelles dégrade les protéines

de manière générale. Par ailleurs, nous avons aussi mis en évidence que l'exposition à la lumière UV entraînait un jaunissement de la peinture, lié à la présence de produits d'oxydations du tryptophane.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Vitruvius *De Architectura* A cura di S. Ferri ed.: Roma, 1960.
- (2) Pline l'Ancien *Naturalis historia*, C. L. F. Panckoucke ed., 1829.
- (3) Dodwell, C. R. *De diversis artibus; The various arts*; T. Nelson, 1961.
- (4) Cennini, C.; Thompson, D. V. *The craftsman's handbook: the Italian "Il libro dell'arte"*; Dover Publications, 1954.
- (5) Plesters, J. *Studies in Conservation* **1956**, 2, 110-157.
- (6) Martin, E. *Stud Conserv* **1977**, 22, 63-67.
- (7) Kockaert, L., Gausset, P., Dubi-Rucquoy, M. *Stud Conserv* **1989**, 34, 183-188.
- (8) Chiavari, G.; Ferretti, S.; Galletti, G. C.; Mazzeo, R. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **1991**, 20, 253-261.
- (9) Kenndler, E.; Schmidt-Beiwl, K.; Mairinger, F.; Pöhm, M. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **1992**, 342, 135-141.
- (10) Chiavari, G.; Galletti, G. C.; Lanterna, G.; Mazzeo, R. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **1993**, 24, 227-242.
- (11) Casoli, A.; Mirti, P.; Palla, G. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **1995**, 352, 372-379.
- (12) Andreotti, A.; Bonaduce, I.; Colombini, M.; Gautier, G.; Modugno, F.; Ribechini, E. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 4490-4500.
- (13) Singer, B.; McGuigan, R. *Annali di Chimica* **2007**, 97, 405-417.
- (14) Colombini, M. P.; Andreotti, A.; Bonaduce, I.; Modugno, F.; Ribechini, E. *Accounts of Chemical Research* **2010**, 43, 715-727.
- (15) Cohen, N. S.; Odlyha, M.; Campana, R.; Foster, G. M. *Thermochimica Acta* **2000**, 365, 45-52.
- (16) Colombini, M. P.; Modugno, F.; Menicagli, E.; Fuoco, R.; Giacomelli, A. *Microchemical Journal* **2000**, 67, 291-300.
- (17) van den Brink, O. F.; Eijkel, G. B.; Boon, J. J. *Thermochimica Acta* **2000**, 365, 1-23.
- (18) Colombini, M. P.; Modugno, F.; Fuoco, R.; Tognazzi, A. *Microchemical Journal* **2002**, 73, 175-185.
- (19) van den Brink, O. F.; Boon, J. J.; O'Connor, P. B.; Duursma, M. C.; Heeren, R. M. A. *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, 36, 479-492.

- (20) van den Brink, O. F.; Ferreira, E. S. B.; van der Horst, J.; Boon, J. J. *International Journal of Mass Spectrometry* **2009**, *284*, 12-21.
- (21) van den Berg, J. D. J.; van den Berg, K. J.; Boon, J. J. *Journal of Chromatography A* **2002**, *950*, 195-211.
- (22) Calvano, C.; van der Werf, I.; Palmisano, F.; Sabbatini, L. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *400*, 2229-2240.
- (23) Centeno, S. A.; Guzman, M. I.; Yamazakikleps, A.; Della Vedova, C. O. *Journal of the American Institute for Conservation* **2004**, *43*, 139-150.
- (24) Nevin, A.; Comelli, D.; Valentini, G.; Anglos, D.; Burnstock, A.; Cather, S.; Cubeddu, R. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *388*, 1897-1905.
- (25) Nevin, A.; Cather, S.; Burnstock, A.; Anglos, D. *Appl. Spectrosc.* **2008**, *62*, 481-489.
- (26) Nevin, A.; Osticioli, I.; Anglos, D.; Burnstock, A.; Cather, S.; Castellucci, E. *Anal Chem* **2007**, *79*, 6143-6151.
- (27) Nevin, A.; Anglos, D.; Cather, S.; Burnstock, A. *Appl. Phys. A* **2008**, *92*, 69-76.
- (28) Nevin, A.; Osticioli, I.; Anglos, D.; Burnstock, A.; Cather, S.; Castellucci, E. *Journal of Raman Spectroscopy* **2008**, *39*, 993-1000.
- (29) Osticioli, I.; Nevin, A.; Anglos, D.; Burnstock, A.; Cather, S.; Becucci, M.; Fotakis, C.; Castellucci, E. *Journal of Raman Spectroscopy* **2008**, *39*, 307-313.
- (30) Manzano, E.; Navas, N.; Checa-Moreno, R.; Simón, L. R.; Capitán-Vallvey, L. F. *Talanta* **2009**, *77*, 1724-1731.
- (31) Gettens, R. J.; Stout, G. L. *Painting materials: a short encyclopedia*; Courier Dover Publications: New York, 1966.
- (32) Painter, P. C.; Koenig, J. L. *Biopolymers* **1976**, *15*, 2155-2166.
- (33) Canfield, R. E. *Journal of Biological Chemistry* **1963**, *238*, 2698-2707.
- (34) Jollès, J.; Jauregui-Adell, J.; Bernier, I.; Jollès, P. *Biochimica et Biophysica Acta* **1963**, *78*, 668-689.
- (35) Blake, C. C. F.; Koenig, D. F.; Mair, G. A.; North, A. C. T.; Phillips, D. C.; Sarma, V. R. *Nature* **1965**, *206*, 757-761.
- (36) Canfield, R. E.; Liu, A. K. *Journal of Biological Chemistry* **1965**, *240*, 1997-2002.
- (37) Welcomme, E.; Walter, P.; Bleuet, P.; Hodeau, J.-L.; Dooryhee, E.; Martinetto, P.; Menu, M. *Appl. Phys. A* **2007**, *89*, 825-832.
- (38) Burgio L; Clark RJ; Firth S *Analyst* **2001**, *126*, 222-227.
- (39) Martinetto, P.; Anne, M.; Dooryhee, E.; Walter, P.; Tsoucaris, G. *Acta Crystallographica Section C* **2002**, *58*, i82-i84.

- (40) Martens, W. N.; Rintoul, L.; Kloprogge, J. T.; Frost, R. L. *American Mineralogist* **2004**, *89*, 352-358.
- (41) Brooker, M. H.; Sunder, S.; Taylor, P.; Lopata, V. J. *Canadian Journal of Chemistry* **1983**, *61*, 494-502.
- (42) Maroni, V. A.; Spiro, T. G. *Inorganic Chemistry* **1968**, *7*, 188-192.
- (43) Ramamurthy, P.; Secco, E. A.; Badri, M. *Canadian Journal of Chemistry* **1970**, *48*, 2617-2622.
- (44) Tsai, P.; Cooney, R. P. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1976**, 1631-1634.
- (45) Wu, L.-Z.; Sheng, Y.-B.; Xie, J.-B.; Wang, W. *Journal of Molecular Structure* **2008**, *882*, 101-106.
- (46) Lippert, J. L.; Tyminski, D.; Desmeules, P. J. *Journal of the American Chemical Society* **1976**, *98*, 7075-7080.
- (47) Williams, R. W.; Dunker, A. K. *Journal of Molecular Biology* **1981**, *152*, 783-813.
- (48) Williams, R. W. *Journal of Molecular Biology* **1983**, *166*, 581-603.
- (49) Marx, J.; Jacquot, J.; Berjot, M.; Puchelle, E.; Alix, A. J. P. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1986**, *870*, 488-494.
- (50) Williams, R. W.; Hirs, C. H. W.; Timasheff, S. N. In *Methods in Enzymology*; Academic Press, 1986; Vol. Volume 130, pp 311-331.
- (51) Berjot, M.; Marx, J.; Alix, A. J. P. *Journal of Raman Spectroscopy* **1987**, *18*, 289-300.
- (52) Alix, A. J. P.; Pedanou, G.; Berjot, M. *Journal of Molecular Structure* **1988**, *174*, 159-164.
- (53) Sane, S. U.; Cramer, S. M.; Przybycien, T. M. *Analytical Biochemistry* **1999**, *269*, 255-272.
- (54) Pelton, J. T.; McLean, L. R. *Analytical Biochemistry* **2000**, *277*, 167-176.
- (55) Vass, E.; Hollosi, M.; Besson, F.; Buchet, R. *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 1917-1954.
- (56) Susi, H.; Byler, D. M. *Appl. Spectrosc.* **1988**, *42*, 819-826.
- (57) Schönemann, A.; Edwards, H. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *400*, 1173-1180.
- (58) Vandenberghe, P.; Wehling, B.; Moens, L.; Edwards, H.; De Reu, M.; Van Hooydonk, G. *Analytica Chimica Acta* **2000**, *407*, 261-274.
- (59) Fedorova, M.; Todorovsky, T.; Kuleva, N.; Hoffmann, R. *PROTEOMICS* **2010**, *10*, 2692-2700.

- (60) Stadtman, E. R.; Levine, R. L. *Amino Acids* **2003**, 25, 207-218.
- (61) Taylor, S. W.; Fahy, E.; Murray, J.; Capaldi, R. A.; Ghosh, S. S. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, 19587-19590.
- (62) Hernandez, B.; Pfluger, F.; Adenier, A.; Kruglik, S. G.; Ghomi, M. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, 114, 15319-15330.
- (63) Takeuchi, H. *Biopolymers* **2003**, 72, 305-317.
- (64) Prestrelski, S. J.; Tedeschi, N.; Arakawa, T.; Carpenter, J. F. *Biophysical Journal* **1993**, 65, 661-671.
- (65) Allison, S. D.; Randolph, T. W.; Manning, M. C.; Middleton, K.; Davis, A.; Carpenter, J. F. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1998**, 358, 171-181.
- (66) Griebenow, K.; Klibanov, A. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, 92, 10969-10976.
- (67) Crowe, J. H.; Carpenter, J. F.; Crowe, L. M. *Annual Review of Physiology* **1998**, 60, 73-103.
- (68) Stadtman, E. R.; Berlett, B. S. *Free Radical Toxicol.* **1997**, 71-87.
- (69) Schöneich, C.; Sharov, V. S. *Free Radical Biology and Medicine* **2006**, 41, 1507-1520.
- (70) De Weck, D.; Nielsen, H. K.; Finot, P.-A. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1987**, 41, 179-185.
- (71) Kell, G.; Steinhart, H. *Journal of Food Science* **1990**, 55, 1120-1123.
- (72) Simat, T. J.; Steinhart, H. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, 46, 490-498.
- (73) Okajima, T.; Kawata, Y.; Hamaguchi, K. *Biochemistry* **1990**, 29, 9168-9175.
- (74) Matoba, T.; Yonezawa, D.; Nair, B. M.; Kito, M. *Journal of Food Science* **1984**, 49, 1082-1084.
- (75) Nielsen, H. K.; Lölliger, J.; Hurrell, R. F. *British Journal of Nutrition* **1985**, 53, 61-73.
- (76) Davies, M. J.; Truscott, R. J. W. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2001**, 63, 114-125.
- (77) Previero, A.; Coletti-Previero, M. A.; Jollès, P. *Journal of Molecular Biology* **1967**, 24, 261-268.
- (78) Ioakimoglou, E.; Boyatzis, S.; Argitis, P.; Fostiridou, A.; Papapanagiotou, K.; Yannovits, N. *Chemistry of Materials* **1999**, 11, 2013-2022.
- (79) Porter, N. A.; Weber, B. A.; Weenen, H.; Khan, J. A. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, 102, 5597-5601.

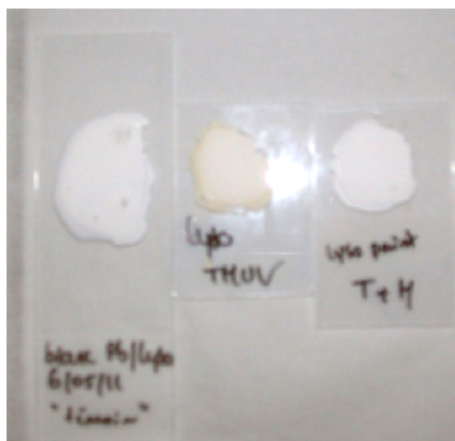
- (80) Haslbeck, F.; Grosch, W.; Firl, J. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1983**, *750*, 185-193.
- (81) Yin, H.; Porter, N. A. *Antioxidants & Redox Signaling* **2004**, *7*, 170-184.
- (82) Esterbauer, H.; Cheeseman, K. H.; Lester Packer, A. N. G. In *Methods in Enzymology*; Academic Press, 1990; Vol. Volume 186, pp 407-421.
- (83) Shibamoto, T. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, *41*, 12-25.
- (84) Pedersen, W. A.; Fu, W.; Keller, J. N.; Markesbery, W. R.; Appel, S.; Smith, R. G.; Kasarskis, E.; Mattson, M. P. *Annals of Neurology* **1998**, *44*, 819-824.
- (85) Refsgaard, H. H. F.; Tsai, L.; Stadtman, E. R. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 611-616.
- (86) Bieker, L.; Schmidt, H. *FEBS Letters* **1979**, *106*, 268-270.
- (87) Rokos, H.; Wood, J. M.; Hasse, S.; Schallreuter, K. U. *Journal of Raman Spectroscopy* **2008**, *39*, 1214-1218.
- (88) Banerjee, S. K.; Rupley, J. A. *Journal of Biological Chemistry* **1973**, *248*, 2117-2124.
- (89) Kuramitsu, S.; Ikeda, K.; Hamaguchi, K. *Journal of Biochemistry* **1975**, *77*, 291-301.
- (90) Fukamizo, T.; Ikeda, Y.; Ohkawa, T.; Goto, S. *European Journal of Biochemistry* **1992**, *210*, 351-357.
- (91) Maenaka, K.; Matsushima, M.; Kawai, G.; Kidera, A.; Watanabe, K.; Kuroki, R.; Kumagai, I. *Biochem J.* **1998**, *333*, 71-76.
- (92) Yamada, H.; Imoto, T.; Fujita, K.; Okazaki, K.; Motomura, M. *Biochemistry* **1981**, *20*, 4836-4842.
- (93) Girard, E.; Chantalat, L.; Vicat, J.; Kahn, R. *Acta Crystallographica Section A* **2000**, *56*, s437.
- (94) Ueno, T.; Abe, S.; Koshiyama, T.; Ohki, T.; Hikage, T.; Watanabe, Y. *Chemistry – A European Journal* **2010**, *16*, 2730-2740.
- (95) Wright, A.; Hawkins, C. L.; Davies, M. J. *Free Radical Biology and Medicine* **2003**, *34*, 637-647.
- (96) Pattison, D.; Davies, M. In *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*; Birkhäuser Basel, 2006; Vol. 96, pp 131-157.
- (97) Teichberg, V. I.; Sharon, N.; Moul, J.; Smilansky, A.; Yonath, A. *Journal of Molecular Biology* **1974**, *87*, 357-368.
- (98) Pesek, J. J.; Schneider, J. F. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1988**, *32*, 233-238.
- (99) Nagem, R. A. P.; Dauter, Z.; Polikarpov, I. *Acta Crystallographica Section D* **2001**, *57*, 996-1002.

- (100) Li, S. J.; Nakagawa, A.; Tsukihara, T. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, *324*, 529-533.
- (101) Li, S. J. *Biopolymers* **2006**, *81*, 74-80.
- (102) Walrant, P.; Santus, R. *Photochemistry and Photobiology* **1974**, *19*, 411-417.
- (103) Pileni, M.-P.; Santus, R.; Land, E. J. *Photochemistry and Photobiology* **1978**, *28*, 525-529.
- (104) Davies, M. J. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *305*, 761-770.
- (105) Scrimgeour, C. In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*; John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- (106) Maleknia, S. D.; Downard, K. M. *Mass Spectrometry Reviews* **2001**, *20*, 388-401.
- (107) Stadtman, E. R.; Van Remmen, H.; Richardson, A.; Wehr, N. B.; Levine, R. L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **2005**, *1703*, 135-140.

ANNEXES

1. Photographies des échantillons de peinture

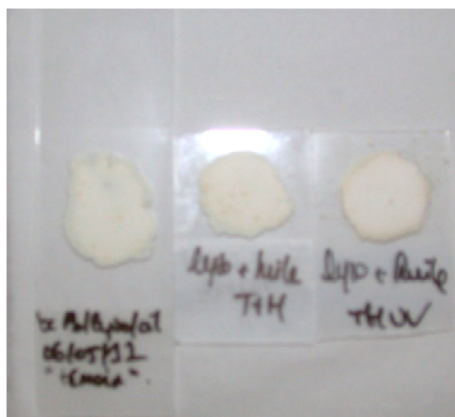
1.1. Avant et après vieillissement artificiel



A gauche : peinture blanc de plomb-lysozyme non vieillie

Au centre : peinture blanc de plomb-lysozyme vieillie artificiellement pendant 3 semaines

A droite : peinture blanc de plomb-lysozyme soumise aux mêmes conditions de température et d'humidité que la peinture vieillie artificiellement mais non exposée aux UV (conservée à l'abri de la lumière)

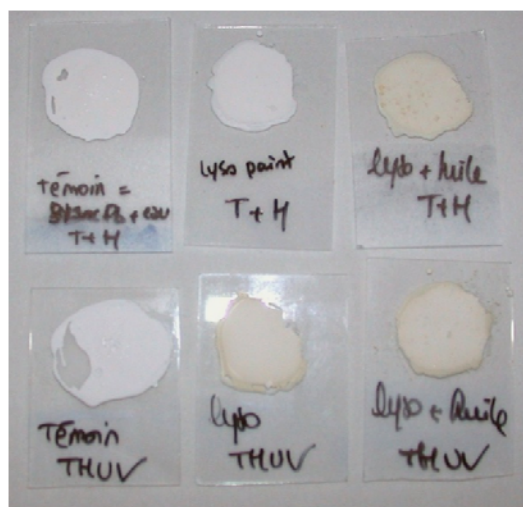


A gauche : peinture blanc de plomb-lysozyme-huile de lin non vieillie

Au centre : peinture blanc de plomb-lysozyme-huile de lin vieillie artificiellement pendant 3 semaines

A droite : peinture blanc de plomb-lysozyme-huile de lin soumise aux mêmes conditions de température et d'humidité que la peinture vieillie artificiellement mais non exposée aux UV (conservée à l'abri de la lumière)

1.2. Peintures de composition différentes après le vieillissement artificiel



En haut : peintures soumises aux mêmes conditions de température et d'humidité que la peinture vieillie artificiellement mais non exposée aux UV (conservée à l'abri de la lumière)

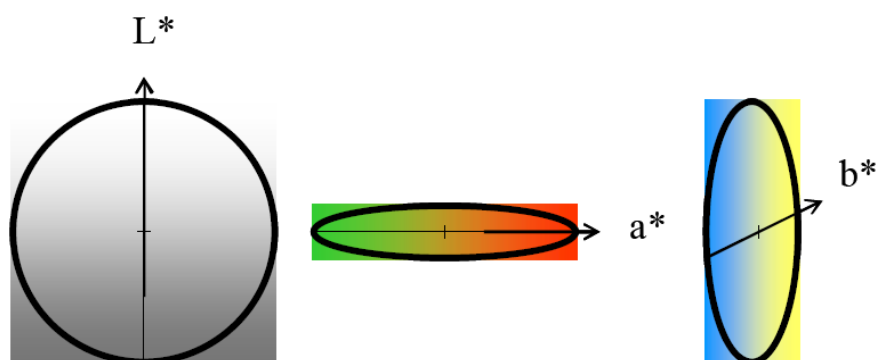
En bas peintures vieillies artificiellement pendant 3 semaines

A gauche : peinture blanc de plomb-eau ; au centre : peinture blanc de plomb-lysozyme

A droite : peinture blanc de plomb-lysozyme et huile de lin

2. Analyse par colorimétrie CIE-L*a*b* de la peinture blanc de plomb-lysozyme après 3 semaines de vieillissement artificiel

La Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) a défini et normalisé un certain nombre d'espaces tridimensionnels de représentation des couleurs. Pour comparer deux couleurs perçues, il est nécessaire de déterminer un espace dans lequel la distance géométrique soit uniformément proportionnelle à la différence visuelle entre les couleurs correspondantes. L'espace CIE-L*a*b* est un espace uniforme permettant ce type de calcul d'écart colorimétrique. C'est l'espace choisi dans nos travaux pour travailler avec les mesures colorimétriques obtenues à l'aide du Colorimètre Minolta CR300. L'espace CIE-L*a*b* permet de décrire une couleur par un ensemble de trois coordonnées dans le repère orthonormé (L^* , a^* , b^*) : L^* est l'axe de la luminosité, l'axe a^* décrit l'évolution du vert au rouge et l'axe b^* du bleu au jaune tel que le montre la figure présentée ci dessous.



Espace CIE-L*a*b*

L'écart colorimétrique entre deux couleurs est calculé comme la distance euclidienne entre les points les représentant dans le repère, par la formule suivante : $\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$ avec ΔE l'écart colorimétrique correspondant à la norme du vecteur reliant les deux points considérés, ΔL^* la différence de clarté, Δa^* la différence dans les teintes vert /rouge et Δb^* la différence dans les teintes bleu /jaune. Ainsi ce calcul revient à déterminer la différence de positions entre la couleur de l'échantillon et celle de la référence dans le repère du système.

Les mesures effectuées pour la peinture composée de blanc de plomb et lysozyme sont présentées dans la table ci-dessous. Ici, la référence est l'échantillon avant vieillissement.

		L^*	a^*	b^*	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE
Peinture blanc de plomb-lysozyme	avant vieillissement	98,84	0,17	2,82				
	après vieillissement artificiel sous UV	94,07	1,08	11,09	4,77	-0,91	-8,27	9,59

Après 3 semaines de vieillissement artificiel en présence de rayons UV, c'est la valeur de b^* qui varie le plus et traduit un jaunissement de la peinture.

Chapitre 3: Identification de l'espèce d'origine des colles animales par protéomique

CHAPITRE 3: IDENTIFICATION DE L'ESPECE D'ORIGINE DES COLLES ANIMALES PAR PROTEOMIQUE

1. INTRODUCTION	- 141 -
1.1. LES DIFFÉRENTES COLLES ANIMALES ET LEUR UTILISATION	- 141 -
1.2. L'ANALYSE DES COLLES ANIMALES DANS LES ÉCHANTILLONS DU PATRIMOINE CULTUREL	- 142 -
1.2.1. <i>Les techniques de détection in situ</i>	- 142 -
1.2.2. <i>Les techniques chromatographiques</i>	- 143 -
1.3. APPORT DE L'ANALYSE PROTÉOMIQUE	- 144 -
2. DÉVELOPPEMENT MÉTHODOLOGIQUE SUR DES ÉCHANTILLONS DE RÉFÉRENCE...	- 145 -
2.1. PRÉSENTATION DES ÉCHANTILLONS	- 145 -
2.2. ANALYSE PAR MALDI-TOF-TOF	- 146 -
2.3. ANALYSE PAR NANOLC-NANOESI-QH-FT-ICR	- 148 -
2.3.1. <i>Echantillons d'origine bovine</i>	- 148 -
2.3.2. <i>Echantillon de colle de peau de lapin</i>	- 152 -
2.3.3. <i>Echantillon de colle de poisson</i>	- 153 -
3. AUTHENTIFICATION D'ÉCHANTILLONS DE COLLE ANIMALE PROVENANT DE DIVERS FOURNISSEURS	- 154 -
3.1. PRÉSENTATION DES ÉCHANTILLONS	- 154 -
3.2. MARQUEURS PEPTIDIQUES IDENTIFIÉS.....	- 155 -
4. ANALYSE DE PEINTURES MODÈLES	- 159 -
4.1. STRATÉGIE ANALYTIQUE	- 159 -
4.2. RÉSULTATS	- 160 -
4.2.1. <i>Peintures modèles avec de la colle d'origine bovine</i>	- 160 -
4.2.2. <i>Peinture modèle avec de la colle de peau de lapin</i>	- 161 -
4.2.3. <i>Peinture modèle avec de la colle de poisson</i>	- 161 -
5. ANALYSE D'UNE DORURE DU XVIII ^{ÈME} SIÈCLE	- 162 -
5.1. TECHNIQUES DE LA DORURE.....	- 162 -
5.2. DESCRIPTION DE L'ÉCHANTILLON.....	- 163 -
5.3. ANALYSE SPECTROSCOPIQUE	- 164 -

5.4. ANALYSE PROTÉOMIQUE..... - 166 -
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES- 172 -
ANNEXES- 175 -

LISTE DES TABLES ET FIGURES

TABLE 3-1 : INFORMATIONS FOURNIES PAR LE REVENDEUR CONCERNANT LES COLLES ANIMALES UTILISÉES COMME ÉCHANTILLONS DE RÉFÉRENCE	- 146 -
TABLE 3-2 : MARQUEURS PEPTIDIQUES IDENTIFIÉS POUR LES ÉCHANTILLONS DE COLLE ANIMALE D'ORIGINE BOVINE	- 152 -
TABLE 3-3 : MARQUEURS PEPTIDIQUES IDENTIFIÉS POUR L'ÉCHANTILLON DE COLLE DE PEAU DE LAPIN	- 153 -
TABLE 3-4 : MARQUEURS PEPTIDIQUES IDENTIFIÉS POUR L'ÉCHANTILLON D'ICHTYOCOLLE PAR HOMOLOGIE DE SÉQUENCE AVEC L'ESPÈCE DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL.....	- 153 -
TABLE 3-5 : INFORMATIONS CONCERNANT LES DIVERS ÉCHANTILLONS DE COLLE DE PEAU DE LAPIN ANALYSÉS	- 155 -
TABLE 3-6 : MARQUEURS PEPTIDIQUES DU COLLAGÈNE DE LAPIN IDENTIFIÉS POUR LES ÉCHANTILLONS PROVENANT DE DIVERS FOURNISSEURS	- 156 -
TABLE 3-7 : MARQUEURS PEPTIDIQUES DU COLLAGÈNE BOVIN IDENTIFIÉS DANS DEUX ÉCHANTILLONS REVENDUS AVEC LA DÉNOMINATION DE COLLE DE PEAU DE LAPIN	- 158 -
TABLE 3-8 : MARQUEURS PEPTIDIQUES IDENTIFIÉS POUR LES PEINTURES MODÈLES RÉALISÉES AVEC DE LA COLLE D'ORIGINE BOVINE	- 160 -
TABLE 3-9 : PEPTIDES SPÉCIFIQUES AUX COLLAGÈNES BOVINS IDENTIFIÉS POUR L'ÉCHANTILLON DE DORURE	- 169 -
FIGURE 3-1 : FORMULES SEMI-DÉVELOPPÉES DE LA 5-HYDROXYLYSINE ET DE LA 4-HYDROXYPROLINE	- 144 -
FIGURE 3-2 : SPECTRE MS MALDI-TOF-TOF DU DIGEST DE COLLE DE PEAU	- 147 -
FIGURE 3-3 : RÉSULTAT DE L'INTERROGATION MASCOT EFFECTUÉE POUR L'ÉCHANTILLON DE COLLE DE PEAU	- 149 -
FIGURE 3-4 : RÉSULTAT DE BLAST OBTENU POUR LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE GSTGEIGPAGPPGPPGLR.....	- 150 -
FIGURE 3-5 : SPECTRE MS/MS DE L'ION DOUBLEMENT CHARGÉ À M/Z = 853.430 ($\Delta m = 1$ PPM) PROVENANT DE L'HYDROLYSAT DE COLLE DE PEAU DE BŒUF ET PRÉSENTANT LES FRAGMENTS Y ET B DE LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE GSTGEIGPAGPPGPPGLR SPÉCIFIQUE DU COLLAGÈNE A2 TYPE I DE L'ESPÈCE BOVINE (<i>BOS TAURUS</i>)	- 151 -
FIGURE 3-6 : SPECTRE MS/MS DE L'ION DOUBLEMENT CHARGÉ À M/Z = 600.797 ($\Delta m = 1$ PPM) PROVENANT DE L'HYDROLYSAT D'ICHTYOCOLLE SALIANSKI ET PRÉSENTANT LES FRAGMENTS Y ET B DE LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE GQPGNIGFPGPK SPÉCIFIQUE DU COLLAGÈNE A2 TYPE I DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL (<i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i>).....	- 154 -
FIGURE 3-7 : CARTES POSTALES D'ÉPOQUE TÉMOIGNANT DE L'IMPORTANCE DES ÉTABLISSEMENTS TOTIN FRÈRES..	- 156 -
FIGURE 3-8 : SPECTRE MS/MS DE L'ION TRIPLEMENT CHARGÉ À M/Z = 710.376 ($\Delta m = 1$ PPM) PROVENANT DE L'HYDROLYSAT DE L'ÉCHANTILLON TOTIN ET PRÉSENTANT LES FRAGMENTS Y ET B DE LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE GLPGVAGALGEPGLGIAGPPGAR SPÉCIFIQUE DU COLLAGÈNE TYPE I A2 DU LAPIN (<i>ORYCTOLAGUS CUNICULUS</i>).....	- 157 -
FIGURE 3-9 : SPECTRE MS/MS DE L'ION TRIPLEMENT CHARGÉ À M/Z = 694.707 ($\Delta m = - 1$ PPM) PROVENANT DE L'HYDROLYSAT DE L'ÉCHANTILLON PN05 ET PRÉSENTANT LES FRAGMENTS Y ET B DE LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE GAPGPQGGAPGLGIAGLTGAR SPÉCIFIQUE DU COLLAGÈNE TYPE III A1 DE L'ESPÈCE BOVINE (<i>BOS TAURUS</i>)	- 159 -
FIGURE 3-10 : SPECTRE MS/MS DE L'ION DOUBLEMENT CHARGÉ À M/Z = 781.8934 ($\Delta m = 1$ PPM) PROVENANT DE L'HYDROLYSAT DES PROTÉINES EXTRAITES DE LA PEINTURE MODÈLE FAITE AVEC DE LA COLLE DE PEAU DE LAPIN ET	

PRÉSENTANT LES FRAGMENTS Y DE LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE GEPGPAGSIGPVGAAGPR SPÉCIFIQUE DU COLLAGÈNE TYPE I A2 DU LAPIN (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) - 161 -

FIGURE 3-11 : PHOTOGRAPHIES A) DU MASCARON ORNANT L'ARC-DOUBLEAU SUR LEQUEL L'ÉCHANTILLON A ÉTÉ PRÉLEVÉ - 163 -

FIGURE 3-12 : A) ÉCHANTILLON ANALYSÉ B) OBSERVATION SOUS MICROSCOPE DE L'ÉCHANTILLON ANALYSÉ PERMETTANT DE DISTINGUER LES FEUILLES D'OR APPLIQUÉES SUR L'ASSIETTE À DORER (COUCHE ROUGE) RECOUVRANT LE SUPPORT EN PLÂTRE - 163 -

FIGURE 3-13 : SPECTRE RAMAN DU SUPPORT EN PLÂTRE DE LA DORURE - 164 -

FIGURE 3-14 : SPECTRE RAMAN DE L'ASSIETTE À DORER - 165 -

FIGURE 3-15 : TIC RÉSULTANTS DE L'ANALYSE NANO LC-NANOESI-QH-FT-ICR DE L'ÉCHANTILLON DE DORURE .. - 166 -

FIGURE 3-16 : RÉSULTATS DE L'INTERROGATION MASCOT EFFECTUÉE POUR L'ÉCHANTILLON DE DORURE ANALYSÉ EN TOTALITÉ - 167 -

FIGURE 3-17 : SPECTRE MS/MS DE L'ION TRIPLEMENT CHARGÉ À $m/z = 718.336$ ($\Delta m = - 1$ PPM) PROVENANT DE L'HYDROLYSAT DES PROTÉINES EXTRAITES DE L'ÉCHANTILLON DE DORURE ET PRÉSENTANT LES FRAGMENTS Y DE LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE GEPGPAGLPGPPGER SPÉCIFIQUE DU COLLAGÈNE TYPE I A1 DE L'ESPÈCE BOVINE (*BOS TAURUS*)..... - 168 -

FIGURE 3-18 : PHOTOGRAPHIES PRISES SOUS MICROSCOPE MONTRANT A) L'ÉCHANTILLON AVANT QUE L'ASSIETTE À DORER NE SOIT GRATTEE DU SUPPORT, B) L'ÉCHANTILLON AU COURS DE L'OPÉRATION, C) UN FRAGMENT DU SUPPORT OBTENU APRÈS ENLÈVEMENT DE L'ASSIETTE À DORER..... - 169 -

FIGURE 3-19 : SPECTRE MS/MS DE L'ION DOUBLEMENT CHARGÉ À $m/z = 604.841$ ($\Delta m = 1$ PPM) PROVENANT DE L'HYDROLYSAT DES PROTÉINES EXTRAITES DE L'ASSIETTE À DORER ET PRÉSENTANT LES FRAGMENTS Y DU PEPTIDE IGQPGAVGPGIR SPÉCIFIQUE DU COLLAGÈNE TYPE I A2 DE L'ESPÈCE BOVINE (*BOS TAURUS*) - 170 -

Chapitre 3: Identification de l'espèce d'origine des colles animales par protéomique

1. Introduction

1.1. Les différentes colles animales et leur utilisation

Les colles animales font partie des substances organiques naturelles les plus utilisées dans le domaine artistique et leur utilisation date de plusieurs siècles avant J.C. Par exemple, en Egypte durant l'ancien Empire, elles servaient, associées à d'autres liants, à l'exécution des peintures sur enduits secs ¹.

Ces colles sont préparées à partir d'os, de tendons, de nerfs, de peau ou de toute autre partie cartilagineuse que l'on fait bouillir dans le but d'obtenir un liquide visqueux possédant de bonnes propriétés adhésives. Elles sont principalement composées de collagène. Cette protéine structurale représente 30 à 35% du total des protéines chez les mammifères, tous les organes en contiennent mais ce sont la peau, les tendons et les os qui en sont les plus riches. Il existe différents types de colles animales dont la qualité dépend du tissu à partir duquel elles sont fabriquées.

Les colles de peaux sont reconnues pour leur souplesse et la colle de peau de lapin en particulier a toujours eu une grande importance en décoration et en peinture. Elles étaient notamment utilisées pour l'encollage puis l'enduisage de panneaux, toiles, cadres, avant peinture ou dorure, mais également en tant que liant pour les peintures et badigeons ainsi que pour la création de meubles peints. La colle d'os est principalement employée pour la restauration de meubles anciens, le placage, la marqueterie mais également pour la réfection d'objets de lutherie. Cette colle possède la propriété d'être « réversible » c'est-à-dire qu'il est possible de la rendre liquide par un moyen quelconque tel que la chaleur ou l'eau. Toutefois, elle est très cassante et on y incorpore souvent de la colle de nerfs pour apporter de la souplesse et obtenir un mélange d'une très bonne résistance. Enfin, la colle de poisson est fabriquée à partir des peaux, des têtes, des vessies natatoires, des arêtes de poissons tels la morue, l'esturgeon et quelques autres. On y ajoute un bactéricide pour la rendre résistante aux

moisissures et aux champignons et également un parfum pour que son utilisation soit plus agréable. Cette colle souple est excellente pour les assemblages complexes et convient bien aux collages délicats tels que la marqueterie. La colle animale est donc une substance protéique entrant dans la composition de divers objets de notre patrimoine culturel et son utilisation est fréquente dans de nombreux domaines : peinture ², dorure ^{3, 4}, ébénisterie ⁵, marqueterie...

1.2. L'analyse des colles animales dans les échantillons du patrimoine culturel

Même si les colles animales ont été utilisées dans des domaines artistiques différents (peinture, dorure, lutherie...), les techniques permettant leur identification ont été développées principalement sur des échantillons de peinture. Dans ce type d'objets, les colles animales jouent le rôle de liant c'est-à-dire le milieu dans lequel les pigments sont dispersés. La colle animale est, avec l'œuf et la caséine, un des liants associés à la technique de la détrempe. Différentes méthodes d'identification des colles animales dans les peintures ont été proposées au cours des dernières décennies.

1.2.1. Les techniques de détection *in situ*

Les premières méthodes proposées visaient principalement à localiser les protéines dans des coupes stratigraphiques d'échantillons de peinture. Il s'agit de techniques de détection des protéines *in situ* par coloration ou immunofluorescence. La première méthode de coloration des protéines dans une coupe de peinture fût introduite par Plesters en 1956 qui suggéra l'utilisation de la fuchsine acide ⁶.

Toutefois, c'est dans les années 1970 que des recherches plus approfondies concernant les mécanismes de coloration des protéines des liants de peinture ont été entreprises. Le colorant rouge ponceau, permettant de colorer les protéines du jaune d'œuf en rouge-orangé et les protéines des colles animales en rose, a été suggéré mais il nécessite une solubilisation dans une solution acide ce qui peut entraîner la désintégration de l'échantillon ⁷. Quelques années plus tard le principe de coloration est amélioré grâce à l'utilisation du noir amide 10B qui permet de révéler avec précision les liants protéiques et de mettre en évidence des émulsions de protéine dans l'huile ⁸. Plus récemment, ce colorant a fait l'objet de nouvelles investigations, il a été montré qu'il possède la propriété de réagir spécifiquement selon le pH

^{9, 10}. A pH 3,6 le noir amide colore toutes les protéines alors qu'à pH 2 seules les protéines de l'œuf sont colorées et à pH 7 seule la gélatine est colorée.

L'immunofluorescence a été également proposée comme méthode de détection *in situ* ^{11, 12}. Cette méthode repose sur la spécificité anticorps-antigène, la protéine étant l'antigène. Un anticorps secondaire marqué par une molécule fluorescente vient se fixer sur le complexe protéine-anticorps, ce qui permet sa détection sous lumière UV. Toutefois, afin d'utiliser l'anticorps spécifique à la protéine présente dans l'échantillon, l'identité de cette dernière doit être présumée, ce qui rend l'utilisation de cette méthode assez délicate. De plus, les derniers développements concernant cette technique ciblent principalement les échantillons contenant de la caséine et/ou de l'ovalbumine ¹²⁻¹⁴.

Ces méthodes de détection peuvent donc fournir une cartographie des protéines dans l'échantillon. Néanmoins, les méthodes de coloration ne permettent en aucun cas une identification précise du type de colle animale employée et en ce qui concerne la détection par immunofluorescence, seuls les liants à base d'œuf ou de caséine peuvent être détectés actuellement.

1.2.2. Les techniques chromatographiques

L'identification de la matière organique dans les échantillons du Patrimoine Culturel est, de nos jours, principalement réalisée par des techniques chromatographiques ¹⁵, en l'occurrence par GC-MS ¹⁶⁻²⁵. La procédure habituelle consiste en l'hydrolyse totale des protéines en acides aminés suivie d'une étape de dérivation et de l'emploi de la GC-MS pour la séparation et la détection des acides aminés générés. L'identification des protéines est ensuite basée sur la comparaison du profil d'acides aminés obtenu avec des profils d'acides aminés de protéines stockés dans des banques de données.

Les colles animales sont aisément distinguées des autres liants protéiques car elles sont majoritairement composées de collagène. Cette protéine constituée d'un tiers de résidus glycine et de 10% de résidus proline se caractérise par la présence de deux acides aminés peu courants la 4-hydroxyproline et la 5-hydroxylysine (dont les formules semi-développées sont montrées sur la figure 3-1), ce qui lui confère un profil d'acides aminés particulier facilement reconnaissable.

Concernant la séparation et la détection des acides aminés, l'emploi de la chromatographie liquide haute performance couplée à la détection par fluorescence a également été envisagée ^{26, 27}. L'inconvénient majeur de ces techniques réside en l'étape d'hydrolyse totale des protéines en acides aminés. Cette étape hautement destructive empêche l'obtention

d'informations liées à l'origine de la protéine. En effet, c'est l'ordre dans lequel les acides aminés s'enchainent qui est caractéristique d'une protéine donnée d'une espèce donnée. Ainsi, même si l'analyse par chromatographie permet d'identifier le collagène dans les liants de peinture, cette technique ne fournit aucune information sur l'espèce d'origine du collagène c'est-à-dire sur l'espèce d'origine de la colle animale.

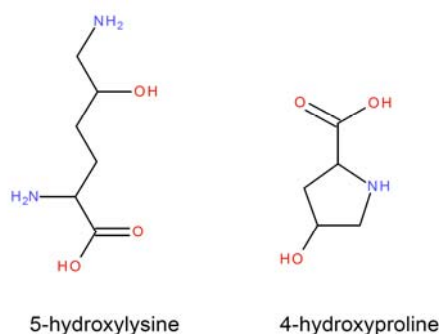


Figure 3-1: Formules semi-développées de la 5-hydroxylysine et de la 4-hydroxyproline

1.3. Apport de l'analyse protéomique

Comme nous l'avons expliqué précédemment, les méthodes conventionnelles d'identification des liants protéiques ne permettent pas de différencier les colles animales de différentes origines. Or, l'identification de l'espèce d'origine des colles animales dans les échantillons du patrimoine culturel s'avère nécessaire pour plusieurs raisons. Tout d'abord, l'identification précise du type de colle animale permettrait de restaurer l'objet d'étude avec les matériaux identiques aux matériaux d'origine, ce qui est primordial pour garder l'œuvre intacte. En effet, des travaux de restauration avec des produits non adaptés pourraient occasionner des dégâts irréversibles sur l'œuvre. Ensuite, l'identification de l'espèce d'origine de la colle animale est indispensable si l'on veut établir une corrélation entre un type de colle animale en particulier (colle de peau de lapin, colle de poisson, colle de nerfs...) et son utilisation. A l'heure actuelle, une méthode basée sur l'analyse ADN a été proposée pour identifier l'espèce d'origine des colles animales utilisées en liant de peinture²⁸. Cependant, cette technique repose sur différentes étapes (extraction de l'ADN, amplification, séparation sur gel d'électrophorèse) nécessitant l'utilisation de produits assez coûteux.

Dernièrement, une étude utilisant l'analyse protéomique et proposant une méthodologie permettant d'identifier précisément l'origine de la gélatine (bovine ou porcine) utilisée dans le domaine de l'agro-alimentaire a été publiée²⁹. Les échantillons de gélatine ont été hydrolysés de manière enzymatique en utilisant la trypsine puis le mélange peptidique obtenu a été

analysé par HPLC-MS/MS. Malgré la forte homologie de séquence entre les collagènes de différentes espèces, il existe quelques différences dans leur séquence d'acides aminés permettant de les différencier. Ainsi, certains peptides sont exclusivement présents dans le collagène bovin et peuvent être considérés comme des marqueurs de cette protéine. Il en est de même pour le collagène porcine. En définitive, l'origine de la gélatine est retrouvée par l'identification de ces marqueurs peptidiques. Ce premier travail mettant en évidence une méthode permettant d'identifier précisément l'espèce animale utilisée pour la fabrication de la gélatine a inspiré d'autres groupes de chercheurs spécialisés en particulier dans l'analyse de matériaux archéologiques. Cette méthodologie, basée sur le concept de marqueurs peptidiques, a été appliquée sur des os^{30, 31} et des dents³¹ de mammifères. L'objectif était d'identifier les espèces animales à partir du collagène présent dans les ossements retrouvés. Cette méthode a aussi été appliquée sur des fragments osseux de poissons connus afin d'augmenter le nombre d'espèces identifiables³² par la seule analyse de leurs os.

Dans ce travail, nous proposons donc d'identifier l'espèce d'origine des colles animales utilisées dans les matériaux du patrimoine en utilisant une méthodologie basée sur le concept de marqueurs peptidiques. Notre méthodologie a d'abord été développée sur des échantillons de référence achetés dans le commerce : colles d'origine bovine (colle d'os, colle de peau et colle de relieur), colle de peau de lapin et colle de poisson dite ichtyocolle Salianski (colle obtenue à partir des vessies natatoires d'esturgeon de qualité supérieure). Cela nous a permis de mettre en avant un certain nombre de peptides spécifiques pour chaque type de colle et donc de construire une banque de données de marqueurs peptidiques de chaque espèce. Ensuite, des peintures modèles composées de blanc de plomb, huile de lin et colle animale ont été analysées afin d'évaluer la méthode sur des échantillons complexes contenant de faibles quantités de protéines. Finalement, la méthodologie a été appliquée sur un échantillon de dorure datée du XVIII^{ème} siècle afin d'identifier l'espèce d'origine de la colle animale utilisée pour la réalisation de cette dorure.

2. Développement méthodologique sur des échantillons de référence

2.1. Présentation des échantillons

Les échantillons utilisés comme échantillons de référence proviennent de chez Kremer Pigmente (Allemagne). Les informations relatives à ces échantillons fournies par le revendeur

sont résumées dans la table 3-1 présentée ci-dessous. L'analyse sur les échantillons de référence a pour but de montrer les protéines qui sont identifiées avec cette méthodologie et plus particulièrement de mettre en évidence les marqueurs peptidiques des différentes espèces. Pour cela, les protéines contenues dans l'échantillon sont hydrolysées de manière enzymatique en utilisant la trypsine et le digest obtenu est analysé par spectrométrie de masse.


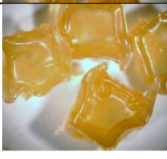


Nom de l'échantillon	Référence	Pays d'origine	Partie animale à partir de laquelle l'échantillon est fabriqué	Photo
Colle d'os	63000	Chine	Os de bovin	
Colle de peau	63020	Allemagne	Peaux de bovin	
Colle de peau de lapin	63028	Espagne	Peaux de lapin	
Colle de relieur	63060	Allemagne	Peaux de bovin	
Ichtyocolle Salianski	63110	Russie	Vessies natatoires d'esturgeon	

Table 3-1: Informations fournies par le revendeur concernant les colles animales utilisées comme échantillons de référence

2.2. Analyse par MALDI-TOF-TOF

Dans un premier temps, les digests obtenus pour les échantillons standards sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF-TOF. L'analyse sur cet appareil est rapide et requiert très peu d'échantillon (0.5 μ L). Par exemple, le spectre obtenu pour l'échantillon de colle de peau est montré figure 3-2.

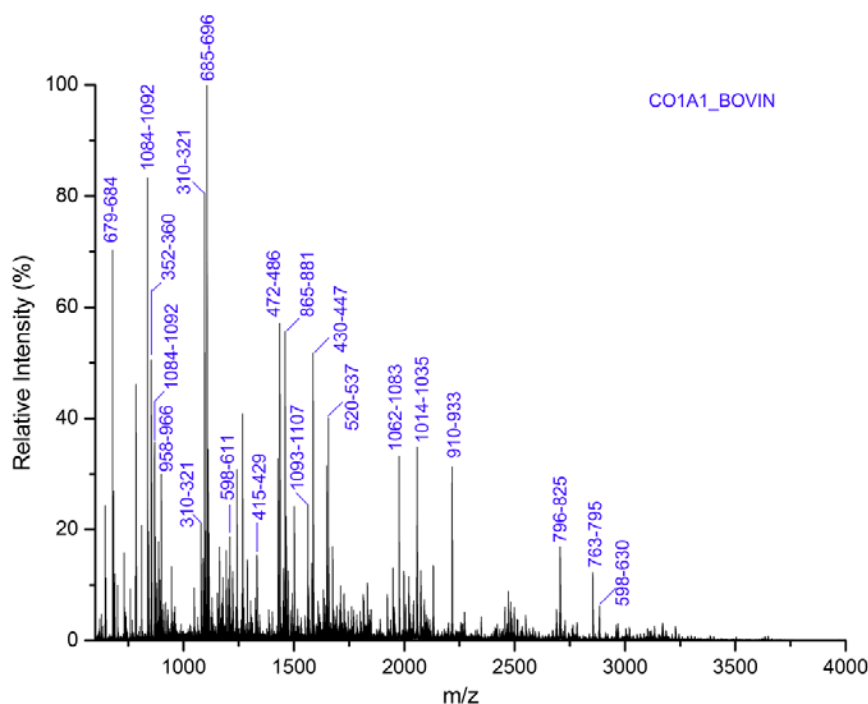


Figure 3-2: Spectre MS MALDI-TOF-TOF du digest de colle de peau

L'interrogation mascot conduit à l'identification de collagène $\alpha 1$ type I de l'espèce bovine (CO1A1_BOVIN) pour cet échantillon. Toutefois, tous les pics présents sur le spectre ne sont pas attribués et l'identification n'est donc pas complète. En effet, le collagène est une protéine de haut poids moléculaire dont la digestion génère un grand nombre de peptides. De plus, une des particularités du collagène est l'ordre d'enchaînement des acides aminés: un tiers des acides aminés sont des glycines qui se retrouvent régulièrement tous les trois résidus. La structure de la séquence des acides aminés du collagène est donc $(\text{Gly} - \text{X}_n - \text{Y}_n)_n$. Par ailleurs, la séquence comporte assez souvent des triplets Glycine - Proline - Hydroxyproline. En conséquence, l'homologie de séquence entre les différentes protéines de collagène est très grande et seuls quelques peptides permettent de différencier deux collagènes d'origine différente. La connaissance de la séquence exacte des peptides par MS/MS et la précision en masse sont donc indispensables dans la recherche de marqueurs peptidiques du collagène. L'analyse MALDI-TOF-TOF est donc un bon outil qui permet de vérifier de façon très rapide l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique. Néanmoins, l'utilisation d'un spectromètre de masse couplée à une nano chromatographie liquide en amont est plus appropriée ici. Le spectromètre de masse choisi est pourvu d'un analyseur FT-ICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance). Cet analyseur a l'une des meilleures résolutions qui soient et fournit une excellente précision sur la mesure de masse ce qui maximise la quantité d'informations

obtenues notamment lors de l'analyse de mélanges complexes et en fait un appareil de choix pour notre étude.

2.3. Analyse par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR

Les digests obtenus sont analysés avec le spectromètre de masse FT-ICR équipé d'une source d'ionisation nano-electrospray. Les peptides sont séparés en amont par l'utilisation d'une chaîne de nano-chromatographie liquide. Les spectres résultant de l'analyse MS/MS conduisent à la séquence précise de chaque peptide, ce qui permet d'identifier les protéines présentes dans le mélange par interrogation des banques de données protéomiques.

2.3.1. Echantillons d'origine bovine

L'interrogation de la banque de données Swiss-Prot a conduit à l'identification de protéines de collagène de différentes espèces pour les échantillons de colle de peau, colle d'os et colle de relieur. Plus particulièrement, pour les échantillons de colle de peau et colle de relieur, 4 protéines différentes de collagène ont été identifiées : les collagènes type I $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (CO1A1 et CO1A2), le collagène type II $\alpha 1$ (CO2A1) et le collagène type III $\alpha 1$ (CO3A1). Cette dernière protéine n'a pas été identifiée pour l'échantillon de colle d'os. Le collagène est formé de 3 chaînes polypeptidiques hélicoïdales gauches torsadées l'une autour de l'autre en une superhélice de pas droit. En particulier, dans le collagène de type I qui est le collagène le plus abondant chez les vertébrés, les sous-unités se décomposent en deux chaînes de type $\alpha 1$ et une chaîne de type $\alpha 2$. On le trouve dans les tendons, la peau, la cornée mais également dans les os et les dents. Le collagène de type III se trouve principalement dans les muscles squelettiques et dans la paroi des vaisseaux sanguins, ce qui peut expliquer pourquoi on ne l'identifie pas dans la colle d'os. Par exemple, le résultat d'interrogation Mascot obtenu pour la colle de peau est présenté sur la figure 3-3.

{MATRIX} SCIENCE Mascot Search Results	
User	: SD
Email	:
Search title	: SD ech colle SProt 2011
MS data file	: G:\SD binders ZT_july10\mgf cal\K 63020 B AE_cal.mgf
Database	: Sprot 0411 (525207 sequences; 185522689 residues)
	: Error tolerant search of all significant protein hits
Timestamp	: 28 Mar 2011 at 15:42:57 GMT
Protein hits	: CO1A1_BOVIN Collagen alpha-1(I) chain OS=Bos taurus GN=COL1A1 PE=1 SV=3
	: CO1A1_CANFA Collagen alpha-1(I) chain OS=Canis familiaris GN=COL1A1 PE=1 SV=1
	: CO1A1_HUMAN Collagen alpha-1(I) chain OS=Homo sapiens GN=COL1A1 PE=1 SV=5
	: CO1A2_BOVIN Collagen alpha-2(I) chain OS=Bos taurus GN=COL1A2 PE=1 SV=2
	: CO1A1_RAT Collagen alpha-1(I) chain OS=Rattus norvegicus GN=Colla1 PE=1 SV=5
	: CO1A1_CHICK Collagen alpha-1(I) chain OS=Gallus gallus GN=COL1A1 PE=1 SV=3
	: CO1A1_MOUSE Collagen alpha-1(I) chain OS=Mus musculus GN=Colla1 PE=1 SV=4
	: CO1A2_CANFA Collagen alpha-2(I) chain OS=Canis familiaris GN=COL1A2 PE=2 SV=2
	: CO1A2_HUMAN Collagen alpha-2(I) chain OS=Homo sapiens GN=COL1A2 PE=1 SV=7
	: CO2A1_RAT Collagen alpha-1(II) chain OS=Rattus norvegicus GN=Col2a1 PE=2 SV=2
	: CO2A1_MOUSE Collagen alpha-1(II) chain OS=Mus musculus GN=Col2a1 PE=1 SV=2
	: CO2A1_BOVIN Collagen alpha-1(II) chain OS=Bos taurus GN=COL2A1 PE=1 SV=4
	: CO1A2_RAT Collagen alpha-2(I) chain OS=Rattus norvegicus GN=Colla2 PE=1 SV=3
	: CO3A1_BOVIN Collagen alpha-1(III) chain OS=Bos taurus GN=COL3A1 PE=1 SV=1
	: CO1A2_MAMAE Collagen alpha-2(I) chain (Fragments) OS=Mammot americanum PE=1 SV=2
	: CO3A1_HUMAN Collagen alpha-1(III) chain OS=Homo sapiens GN=COL3A1 PE=1 SV=4
	: CO1A1_CYNPY Collagen alpha-1(I) chain OS=Cynops pyrrhogaster GN=COL1A1 PE=2 SV=1
	: CO1A2_CHICK Collagen alpha-2(I) chain (Fragments) OS=Gallus gallus GN=COL1A2 PE=1 SV=2
	: TRYP_PIG Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1

Figure 3-3: Résultat de l'interrogation mascot effectuée pour l'échantillon de colle de peau

Les protéines identifiées sont classées par score décroissant, du score le plus élevé au score le plus faible. La protéine identifiée avec le score le plus fort est le collagène type I $\alpha 1$ de l'espèce bovine (*Bos taurus*) puis le collagène type I $\alpha 1$ du chien (*Canis familiaris*) et de l'humain (*Homo sapiens*) sont identifiés. Cela signifie que des peptides communs au collagène type I $\alpha 1$ de ces 3 espèces ont été identifiés dans notre échantillon, ce qui est dû à l'homologie de séquence entre les protéines d'espèces différentes. En effet, il y a 97% d'homologie de séquence entre le collagène type I $\alpha 1$ du bovin et le collagène type I $\alpha 1$ de l'humain et du chien.

Ainsi, seuls quelques acides aminés diffèrent entre ces trois protéines. Ceci implique que seuls quelques peptides sont spécifiques de chaque protéine et par conséquent de chaque espèce. C'est donc grâce à l'identification de ces peptides spécifiques, également appelés marqueurs peptidiques, que l'espèce d'origine des colles animales va être déterminée. Nous avons donc recherché pour chaque protéine identifiée par Mascot la spécificité des peptides identifiés. Ainsi, nous avons effectué un blast pour chaque séquence peptidique en utilisant l'outil Protein Blast disponible sur le site du centre national d'information sur les progrès scientifiques en biotechnologie (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Cet outil permet d'identifier pour une séquence peptidique donnée les protéines dans lesquelles cette séquence se trouve. De cette manière, les protéines identifiées uniquement avec des peptides communs

à plusieurs espèces peuvent être éliminées et l'espèce d'origine de notre échantillon peut être déterminée.

```

>ref|NP_776945.1| collagen alpha-2(I) chain precursor [Bos taurus]
sp|P02465.2|COL1A2_BOVIN RecName: Full=Collagen alpha-2(I) chain; AltName:
Full=Alpha-2
type I collagen; Flags: Precursor
dbj|BAA25171.1| alpha2(I) collagen [Bos taurus]
gb|AAI49096.1| Collagen, type I, alpha 2 [Bos taurus]
gb|DAA30781.1| collagen alpha-2(I) chain precursor [Bos taurus]
Length=1364

GENE ID: 282188 COL1A2 | collagen, type I, alpha 2 [Bos taurus]
(10 or fewer PubMed links)

this subject sequence by:                               Sort alignments for
                                                         E value  Score
Percent identity                                       Query start position
Subject start position
Score = 56.6 bits (126), Expect = 3e-09
Identities = 18/18 (100%), Positives = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)

Query  1  GSTGEIGPAGPPGPPGLR  18
          GSTGEIGPAGPPGPPGLR
Sbjct  380 GSTGEIGPAGPPGPPGLR  397

Score = 32.5 bits (69), Expect = 1.1
Identities = 10/11 (91%), Positives = 10/11 (91%), Gaps = 0/11 (0%)

Query  7  GPAGPPGPPGL  17
          GP GPPGPPGL
Sbjct  63  GPPGPPGPPGL  73

```

Figure 3-4: Résultat de Blast obtenu pour la séquence peptidique GSTGEIGPAGPPGPPGLR

Par exemple, pour la séquence peptidique GSTGEIGPAGPPGPPGLR identifiée dans le collagène type I $\alpha 2$ du bovin, le résultat du Blast est montré figure 3-4. Cette séquence est identifiée avec 100% d'identité dans le collagène type I $\alpha 2$ de l'espèce *Bos taurus* en position 380-397. C'est la seule protéine pour laquelle la séquence peptidique est identifiée dans sa totalité. Ainsi, le peptide GSTGEIGPAGPPGPPGLR est spécifique au collagène type I $\alpha 2$ de l'espèce *Bos taurus*. Cette séquence est donc un marqueur peptidique du collagène type I $\alpha 2$ bovin.

Parmi toutes les protéines identifiées pour les échantillons de colle de peau et colle de relieur, des peptides spécifiques ont été identifiés uniquement pour les protéines de collagène de l'espèce bovine et en particulier pour les collagènes type I $\alpha 2$ et type III $\alpha 1$. Plus précisément, 8, 7 et 3 marqueurs peptidiques du collagène type I $\alpha 2$ de l'espèce bovine ont été identifiés pour les échantillons de colle de peau, colle de relieur et colle d'os respectivement. Par exemple, la figure 3-5 montre le spectre MS/MS enregistré pour la colle de peau et ayant

conduit à l'identification de la séquence GSTGEIGPAGPPGPPGLR en position 380-397 dans collagène type I $\alpha 2$ bovin.

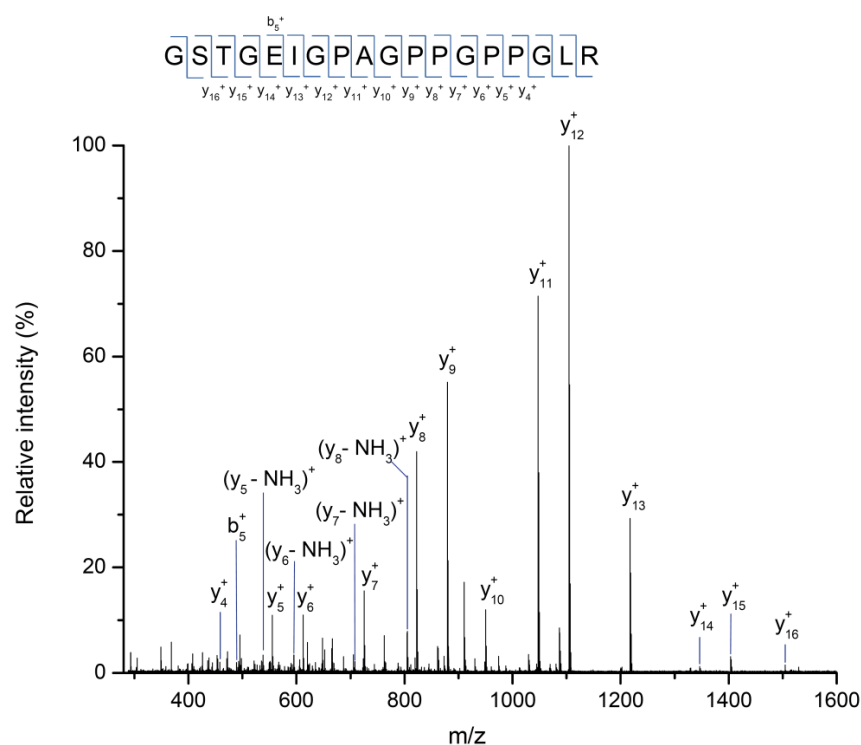


Figure 3-5: Spectre MS/MS de l'ion doublement chargé à $m/z = 853,430$ ($\Delta m = 1$ ppm) provenant de l'hydrolysate de colle de peau de bœuf et présentant les fragments y et b de la séquence peptidique GSTGEIGPAGPPGPPGLR spécifique du collagène $\alpha 2$ type I de l'espèce bovine (*Bos taurus*)

Les protéines de collagène type I $\alpha 2$ et type III $\alpha 1$ provenant d'autres espèces (chien, humain...) ont été identifiées avec un set de peptides communs à l'espèce bovine, ce qui nous permet d'affirmer que seule l'espèce bovine est présente dans l'échantillon. En ce qui concerne le collagène de type I $\alpha 1$ (CO1A1), 18, 22 et 21 peptides ont été identifiés au total pour les échantillons de colle d'os, colle de peau et colle de relieur respectivement. Malgré cela, tous les peptides identifiés sont communs aux espèces du bovin, du chien, et de l'humain, ce qui montre que le nombre de marqueurs peptidiques identifiés dépend exclusivement de l'homologie de séquence existant entre les protéines. Le collagène type I $\alpha 1$ présente 97% d'homologie de séquence avec les collagènes type I $\alpha 1$ humain et du chien alors que le collagène type I $\alpha 2$ présente 94% d'homologie de séquence avec le collagène type I $\alpha 2$ du chien et 92% avec le collagène type I $\alpha 2$ humain. Ainsi, plus l'homologie de séquence entre les espèces est importante, moins il y a de marqueurs peptidiques potentiels. Par conséquent, aucun marqueur peptidique de l'espèce bovine n'est identifié pour le collagène

type I $\alpha 1$. Il en est de même pour le collagène $\alpha 1$ de type II (CO2A1) bovin. Les marqueurs peptidiques du collagène bovin identifiés pour ces échantillons sont récapitulés dans la table 3-2. Pour le collagène type III $\alpha 1$ (CO3A1) identifié dans la colle de peau et la colle de relieur, deux peptides spécifiques ont été trouvés.

Au total 9 marqueurs peptidiques de l'espèce bovine ont été identifiés pour la colle de relieur, 10 pour la colle de peau et 3 pour la colle d'os (voir table 3-2). Les analyses confirment donc que ces colles sont préparées à partir d'organes de bovins comme cela est indiqué par le revendeur.

Protéine	Taxonomie	Masse moléculaire (Da)	Numéro d'accèsion de la protéine	Marqueurs peptidiques	Position	Colle de relieur	Colle de peau	Colle d'os
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	128985	P02465 (CO1A2_BOVIN)	GSTGEIGPAGPPGPPGLR	380-397	x	x	x
				GPAGPPGPPGLR	386-397	x	x	
				GEQGPAGPPGFQGLPGPAGTAGEAGKPGER	542-571		x	
				GIPGEFGLPGPAGAR	572-586	x	x	x
				GPSGPPGPDGNGKGEPPVVGAPGTAGPSGSPGLPGER	608-643	x	x	x
				GYPGNAGPVGAAGAPGPPQGPVGPVVK	947-972	x	x	
				GEPGPAGAVGPAGAVGPR	977-994	x	x	
				IGQPGAVGPAGIR	1066-1078	x	x	
Collagen alpha-1(III) chain	Bos taurus (Bovine)	93594	P04258 (CO3A1_BOVIN)	GAPGEKGEPPGAAGPAGGSPAGPPGPPQGVK	672-704	x	x	
				GAPGPQPPGAPGLGIAGLTGAR	777-800	x	x	

Table 3-2: Marqueurs peptidiques identifiés pour les échantillons de colle animale d'origine bovine

2.3.2. Echantillon de colle de peau de lapin

Concernant l'échantillon de colle de peau de lapin, seul un fragment de protéine a été identifié : il s'agit d'un fragment du collagène type I $\alpha 2$ (CO1A2). En effet, pour l'espèce lapin (*Oryctolagus cuniculus*) il y a peu de protéines de collagène séquencées dans la banque de données Swiss-Prot. A l'heure actuelle seuls deux fragments de collagène type I du lapin ont été séquencés : un fragment de 526 acides aminés pour le collagène type I $\alpha 2$ et un fragment de 53 acides aminés pour le collagène type I $\alpha 1$. D'autres fragments de collagène ont été séquencés, en particulier de collagène type IV, VIII et XII. Cependant, ces types de collagène ne sont pas des composants majoritaires de la peau. Malgré le faible nombre de protéines séquencées pour le lapin, deux marqueurs peptidiques du collagène $\alpha 2$ de type I de l'espèce du lapin, dont la séquence est détaillée dans la table 3-3, ont été identifiés ce qui suffit à prouver l'origine de cette colle animale.

Protéine	Taxonomie	Masse moléculaire (Da)	Numéro d'accèsion de la protéine	Marqueurs peptidiques	Position
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Oryctolagus cuniculus (Rabbit)	53096	Q28668 (CO1A2_RABIT)	GLPGVAGALGEPGPLGIAGPPGAR	43-66
				GEPGPAGSIGPVGAAGPR	139-156

Table 3-3: Marqueurs peptidiques identifiés pour l'échantillon de colle de peau de lapin

2.3.3. Echantillon de colle de poisson

L'ichtyocolle Salianski est préparée à partir des vessies natatoires d'esturgeon. Si on recherche les protéines relatives à cette espèce de poisson dans la banque de données Swiss-Prot on s'aperçoit que 20 protéines sont séquencées actuellement pour l'esturgeon mais parmi elles il n'y a aucune protéine de collagène. L'identification des peptides spécifiques dans cet échantillon est donc réalisée par homologie de séquence avec d'autres espèces de poisson. Dans le cas présent, trois marqueurs peptidiques du collagène type I $\alpha 2$, dont les séquences sont détaillées dans la table 3-4, sont identifiés par homologie de séquence avec l'espèce de la truite arc-en-ciel.

Protéine	Taxonomie	Masse moléculaire (Da)	Numéro d'accèsion de la protéine	Marqueurs peptidiques	Position
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Oncorhynchus mykiss (Rainbow trout) (Salmo gairdneri)	126908	O93484 (CO1A2_ONCMY)	GQPGNIGFPGPK	481-492
				GEQGPAGAPGFQGLPGPAGPAGEAGK	538-563
				GPSGERGEGGPAGLPGFAGPPGSDGQSGPR	703-732

Table 3-4: Marqueurs peptidiques identifiés pour l'échantillon d'ichtyocolle par homologie de séquence avec l'espèce de la truite arc-en-ciel

Le spectre MS/MS ayant permis l'identification du peptide GQPGNIGFPGPK, spécifique du collagène de la truite arc-en-ciel, est présenté sur la figure 3-6. L'espèce exacte de poisson qui a été utilisée pour la fabrication de l'ichtyocolle ne peut pas être déterminée. Néanmoins, l'identification de marqueurs peptidiques communs avec l'espèce de la truite arc-en-ciel suffit à différencier l'ichtyocolle de la colle d'origine bovine et de la colle de peau de lapin.

Pour chaque échantillon de colle animale, des marqueurs peptidiques spécifiques de l'espèce ont été identifiés. Pour les colles fabriquées à partir de lapin et de poisson, nous sommes limités par les informations disponibles dans les banques de données protéomiques (nombre de protéines et espèces séquencées). Toutefois, même si le nombre de marqueurs

peptidiques identifiés pour ces espèces est moins important que pour l'espèce bovine, il est néanmoins suffisant pour permettre une distinction entre bovin, lapin et poisson.

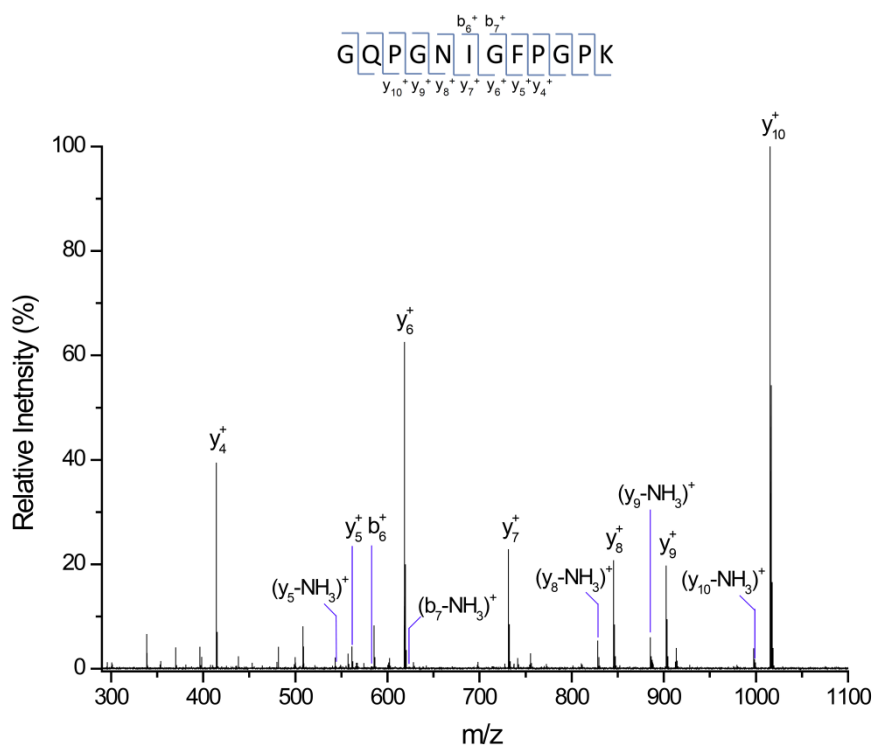


Figure 3-6: Spectre MS/MS de l'ion doublement chargé à $m/z = 600,797$ ($\Delta m = 1$ ppm) provenant de l'hydrolysate d'ichtyocolle Salianski et présentant les fragments y et b de la séquence peptidique GQPGNIGFPGPK spécifique du collagène $\alpha 2$ type I de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

3. Authentification d'échantillons de colle animale provenant de divers fournisseurs

3.1. Présentation des échantillons

Plusieurs échantillons de colle de peau de lapin provenant de différents fournisseurs nous ont été gracieusement fournis par Mme Marie Dubost dirigeante de la société *L'atelier de la feuille d'or* située 173 rue du faubourg St Antoine à Paris, spécialisée en restauration de bois doré et peint.






Echantillon	Nature	Commentaire	Provenance	Photo
PN03	Colle de peau de lapin	Colle moderne commerciale	Non communiquée	
PN04	Colle de peau de lapin	Colle moderne commerciale	Non communiquée	
PN05	Colle de peau de lapin	Colle moderne commerciale	Freba®	
PN06	Colle de peau de lapin	Colle achetée il y a 50 ans devenue translucide	Non communiquée	
Totin	Colle de peau de lapin	Colle achetée il y a 50 ans partiellement translucide	Totin Frères	

Table 3-5: Informations concernant les divers échantillons de colle de peau de lapin analysés

3.2. Marqueurs peptidiques identifiés

Ces échantillons de colle ont été analysés en utilisant la méthodologie précédente afin de vérifier l'origine indiquée par le revendeur. L'analyse par FT-ICR MS/MS du digest protéique obtenu pour chaque échantillon a fourni les résultats suivants : trois marqueurs peptidiques du collagène type I $\alpha 2$ de lapin ont été identifiés dans les échantillons PN03 et PN04. Nous remarquons d'ailleurs que le peptide GYPGNAGPVGAAGAPGPQGSVGPTGK (position 109-134) n'avait pas été identifié lors de l'analyse des échantillons de référence. Concernant l'échantillon appelé Totin, il provient de chez Totin Frères. Cet établissement se situait à Montreuil-sous-Bois et était très réputé pour la qualité de sa colle de peau de lapin. Les frères Totin ont d'ailleurs déposé un brevet en 1868 concernant la fabrication de leur colle sèche dite « colle à doreurs »³³. Des publicités d'époque, montrées figure 3-7, témoignent de l'importance et de la notoriété de cette industrie fermée depuis les années 1940.

Protéine	Taxonomie	Masse moléculaire (Da)	Numéro d'accèsion de la protéine	Marqueurs peptidiques	Position	PN03	PN04	Totin
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Oryctolagus cuniculus (Rabbit)	53096	Q28668 (CO1A2_RABIT)	GLPGVAGALGEPGPLGIAGPPGAR	43-66	x	x	x
				GYPGNAGPVGAAGAPGPQGSVGTGK	109-134	x	x	
				GEPGPAGSIGPVGAAGPR	139-156	x	x	x

Table 3-6: Marqueurs peptidiques du collagène de lapin identifiés pour les échantillons provenant de divers fournisseurs

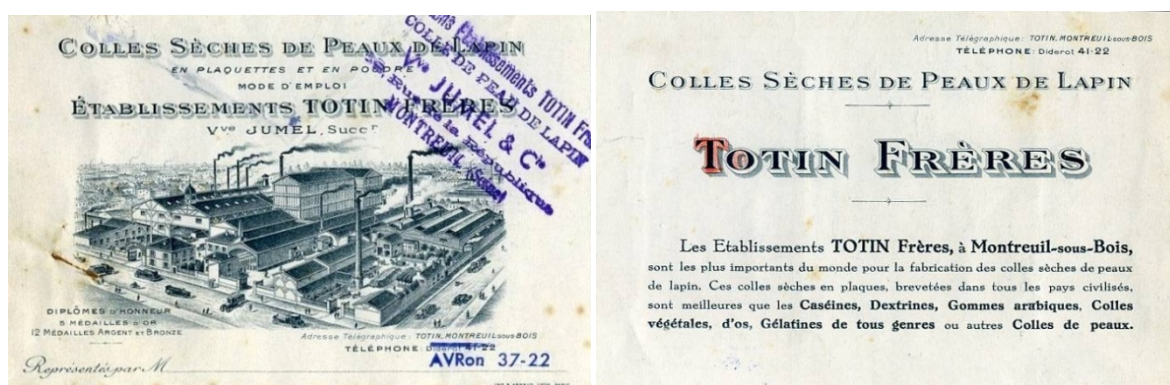


Figure 3-7: Cartes postales d'époque témoignant de l'importance des établissements Totin Frères

L'analyse protéomique de cet échantillon, conservé sous forme solide pendant plusieurs décennies, a permis d'identifier deux marqueurs peptidiques du collagène de lapin : les séquences GLPGVAGALGEPGPLGIAGPPGAR et GEPGPAGSIGPVGAAGPR respectivement en position 43-66 et 139-156 dans le collagène type I $\alpha 2$ du lapin. Le spectre montré figure 3-8 a permis l'identification du peptide en position 43-66. Malgré l'âge de l'échantillon, nous avons réussi à identifier les ions y_4^+ à y_{10}^+ , y_{13}^+ et y_{13}^{2+} et les ions b_5^+ , b_9^+ à b_{11}^+ , b_{14}^+ et b_{16}^+ avec un bon rapport signal sur bruit. Ce résultat montre que la méthodologie développée est adaptée à des échantillons anciens qui ont été conservés sans précautions particulières.

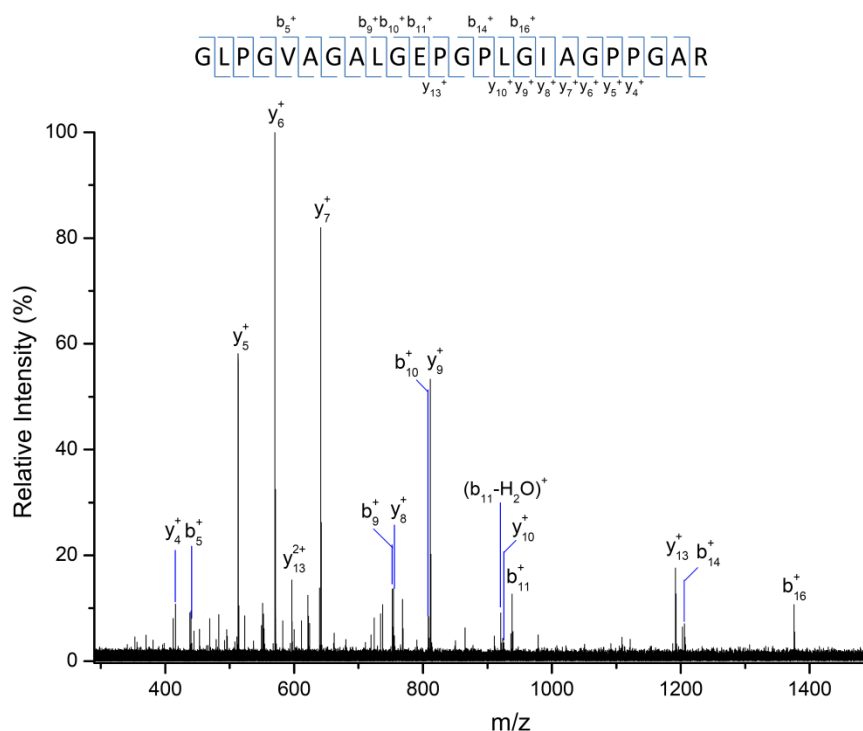


Figure 3-8: Spectre MS/MS de l'ion triplement chargé à $m/z = 710,376$ ($\Delta m = 1$ ppm) provenant de l'hydrolysate de l'échantillon Totin et présentant les fragments y et b de la séquence peptidique GLPGVAGALGEPGLGIAGPPGAR spécifique du collagène type I $\alpha 2$ du lapin (*Oryctolagus cuniculus*)

Pour les échantillons notés PN05 et PN06, le collagène de lapin n'a pas été identifié mais des peptides spécifiques ont été trouvés pour trois protéines de collagène bovin (voir table 3-7). Concernant l'échantillon PN05, au total, 15 marqueurs peptidiques de l'espèce bovine ont été identifiés : 10 pour le collagène type I $\alpha 2$ et 5 pour le collagène type III $\alpha 1$. Le spectre MS/MS ayant conduit à l'identification du peptide GAPGPQGPPGAPGPLGIAGLTGAR, spécifique du collagène type III $\alpha 1$ bovin est montré sur la figure 3-9. Pour l'échantillon PN06, 9 et 2 marqueurs peptidiques du collagène type I et type III respectivement ont été mis en évidence. Les séquences de ces marqueurs peptidiques sont détaillées dans le tableau-ci-dessous.

Protéine	Taxonomie	Masse moléculaire (Da)	Numéro d'accèsion de la protéine	Marqueurs peptidiques	Position	PN05	PN06
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	128985	P02465 (CO1A2_BOVIN)	GSTGEIGPAGPPGPPGLR	380-397	x	x
				GPAGPPGPPGLR	386-397		x
				GEQGPAGPPGFQGLPGPAGTAGEAGKPGER	542-571	x	x
				GIPGEFLPGPAGAR	572-586	x	x
				GPSGPPGPDGNKGEPGVVVGAPGTAGPSGSPGLPGER	608-643	x	x
				GAPGAIGAPGAPAGANGDRGEAGPAGPAGPAGPR	674-706	x	
				GPSGEPGTAGPPGTPGPQGLLGAPGFLGLPGR	845-877	x	x
				GYPGNAGPVGAAAGAPGPQGPVGPVVK	947-972	x	x
				AGPVGAAAGAPGPQGPVGPVVK	952-972	x	
				GEPGPAGAVGPAGAVGPR	977-994	x	x
IGQPGAVGPAGIR	1066-1078	x	x				
Collagen alpha-1(III) chain	Bos taurus (Bovine)	93594	P04258 (CO3A1_BOVIN)	GEPGPQGHAGAPGPPGPPGSDGSPGGK GEMGPAGIPGAPGLIGAR	213-257	x	
				GPTGPIGPPGAPGQPGDKGESGAPGVPIAGPR	606-638	x	
				GAPGEKGEKGGPPGAAGPAGGSGPAGPPGPQGVK	672-704	x	
				GAPGEKGEKGGPPGAAGPAGGSGPAGPPGPQGVKGER	672-707	x	x
				GAPGPQGGPAGPGLGIAGLTGAR	777-800	x	x

Table 3-7: Marqueurs peptidiques du collagène bovin identifiés dans deux échantillons revendus avec la dénomination de colle de peau de lapin

Ces résultats montrent que l'espèce utilisée pour la fabrication de ces colles animales n'est pas du lapin mais du bœuf et que les indications fournies par les fabricants sont erronées.

Sur les 5 échantillons analysés, des marqueurs peptidiques du collagène de lapin ont été identifiés dans trois d'entre eux dont l'échantillon provenant du célèbre fabricant Totin-Frères. Cela prouve qu'ils ont été effectivement fabriqués à partir de lapin. Pour les deux échantillons restants, l'un de provenance inconnu (PN06) et l'autre vendu par la société Freba® (PN05), le collagène de lapin n'a pas été identifié mais un nombre important de marqueurs peptidiques du collagène bovin ont été mis en évidence. Ces échantillons, supposés être de la colle de peau de lapin, s'avèrent être de la colle fabriquée à partir d'organes de bœuf. Ces résultats montrent que la méthodologie mise en place peut être utilisée afin de contrôler l'espèce d'origine des colles animales.

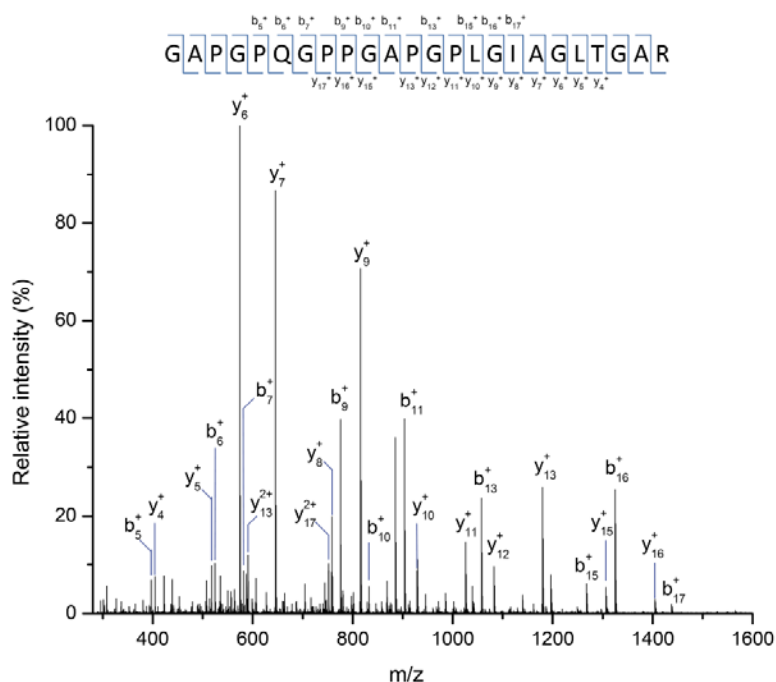


Figure 3-9: Spectre MS/MS de l'ion triplement chargé à $m/z = 694,707$ ($\Delta m = -1$ ppm) provenant de l'hydrolysat de l'échantillon PN05 et présentant les fragments y et b de la séquence peptidique GAPGPGPPGAPGPLGIAGLTGAR spécifique du collagène type III $\alpha 1$ de l'espèce bovine (*Bos taurus*)

4. Analyse de peintures modèles

Les colles animales ont été très utilisées pour jouer le rôle de liant dans le domaine de la peinture. Ainsi, nous avons réalisé des peintures modèles composées de blanc de plomb, de colle animale et d'huile de lin afin d'évaluer l'efficacité de la méthode développée sur des échantillons de composition plus complexe.

4.1. Stratégie analytique

Des peintures modèles composées de blanc de plomb, huile de lin et colle animale ont été réalisées et conservées plusieurs semaines au laboratoire sans précautions particulières. Des colles animales de différentes origines (bœuf, lapin et poisson), préalablement solubilisées afin d'être utilisées comme liant, ont été utilisées. Pour l'analyse, un micro-prélèvement (200 μg) de peinture a été broyé dans un mélange composé de résine commerciale et d'eau acidifiée (1% TFA), afin d'en extraire le matériel protéique³⁴. Le surnageant, contenant les protéines, a ensuite été dessalé par dialyse puis concentré dans 5 μL d'eau ultrapure avant de procéder à l'hydrolyse enzymatique des protéines. Finalement, le mélange peptidique obtenu est dessalé sur colonne C18 (zip tip) puis analysé par spectrométrie de masse FT-ICR (plus de

détails concernant le protocole expérimental sont donnés dans la partie matériels et méthodes).

4.2. Résultats

4.2.1. Peintures modèles avec de la colle d'origine bovine

Trois colles animales d'origine bovine commercialisées par Kremer et dont l'analyse a été réalisée auparavant ont été employées : la colle d'os, la colle de peau et la colle de relieur. Les deux protéines de collagène type I ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) ont été identifiées pour les trois peintures alors que le collagène type III n'a pas été identifié pour la peinture faite avec de la colle d'os. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus sur les échantillons de référence puisque lors de l'analyse de la colle d'os cette protéine n'avait pas été trouvée non plus. Les séquences des marqueurs peptidiques identifiés pour chaque échantillon sont détaillées dans la table 3-8 présentée ci-dessous.

Protéine	Taxonomie	Masse moléculaire (Da)	Numéro d'accèsion de la protéine	Marqueurs peptidiques	Position	Liant Colle de relieur	Liant Colle de peau	Liant Colle d'os
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	128985	P02465 (CO1A2_BOVIN)	RGSTGEIGPAGPPPPGLR	379-397	x	x	
				GSTGEIGPAGPPPPGLR	380-397	x	x	
				GPAGPPGPPGLR	386-397	x	x	
				GFPGPSGNIGPAGK	449-462			x
				GIPGEFGLPGPAGAR	572-586	x	x	x
				PGTAGPSGSPGLPGER	628-643		x	
				GEPGPAGAVGPAGAVGPR	977-994	x		
				PGPAGAVGPAGAVGPR	979-994			x
Collagen alpha-1(III) chain	Bos taurus (Bovine)	93594	P04258 (CO3A1_BOVIN)	GESGAPGVPGIAGPR	624-638		x	
				GAPGPQPPGAPGLGIAGLTGAR	777-800		x	

Table 3-8: Marqueurs peptidiques identifiés pour les peintures modèles réalisées avec de la colle d'origine bovine

Pour la colle de relieur utilisée en liant, deux marqueurs peptidiques du collagène type I $\alpha 2$, ne sont pas retrouvés dans la peinture. Il s'agit des peptides en position 608-643 et 947-972 (GPSGPPGPDGNKGEPGVVGAPGTAGPSGSPGLPGER et GYPGNAGPVGAAGAPGPQGPVGPVVGK). Ces deux marqueurs peptidiques ne sont pas retrouvés non plus dans la peinture faite avec de la colle de peau. Dans le cas de la colle d'os utilisée en liant, seuls des marqueurs peptidiques du collagène type I sont identifiés. Parmi les 3 marqueurs, deux sont communs avec l'analyse de la colle d'os seule : les peptides

GFPGSPGNIGPAGK et GIPGEFGLPGPAGAR respectivement en position 449-462 et 572-586.

4.2.2. Peinture modèle liée avec de la colle de peau de lapin

La colle de peau de lapin utilisée ici pour lier la peinture est la colle appelée PN04, dont l'analyse avait conduit à l'identification de 3 marqueurs peptidiques du collagène type I $\alpha 2$ de lapin. Parmi ces 3 marqueurs, deux sont retrouvés lors de l'analyse de la peinture : les séquences GLPGVAGALGEPGPLGIAGPPGAR (en position 43-66) et GEPGPAGSIGPVGAAGPR (en position 139-156), ce qui est suffisant pour identifier l'espèce animale d'origine du liant.

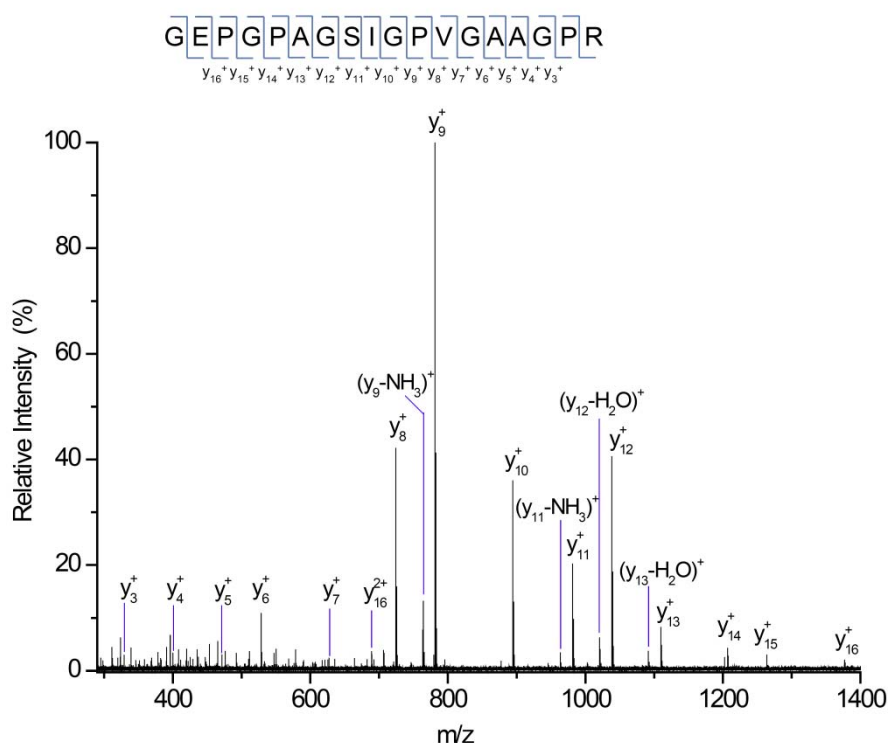


Figure 3-10: Spectre MS/MS de l'ion doublement chargé à $m/z = 781,8934$ ($\Delta m = 1$ ppm) provenant de l'hydrolysate des protéines extraites de la peinture modèle faite avec de la colle de peau de lapin et présentant les fragments y de la séquence peptidique GEPGPAGSIGPVGAAGPR spécifique du collagène type I $\alpha 2$ du lapin (*Oryctolagus cuniculus*)

4.2.3. Peinture modèle liée avec de la colle de poisson

L'ichtyocolle « Salianski » a été utilisée en liant de peinture. Dans ce cas, 4 marqueurs peptidiques du collagène de poisson sont identifiés par homologie de séquence avec le collagène type I $\alpha 2$ de la truite arc-en-ciel. Parmi ces 4 peptides, les deux séquences GFPGTPGLPGMK et GAAGLPGVAGAPGFPGR, respectivement en position 160-171 et 304-321 n'avaient pas été identifiés précédemment.

Les résultats obtenus montrent que la méthodologie employée s'applique également à l'analyse des colles animales utilisées en liant de peinture. En effet, la peinture représentant un environnement complexe (protéines piégées dans une matrice inorganique contenant aussi des lipides), notre méthode permet d'extraire les collagènes qui sont des protéines de haut poids moléculaire contenant un grand nombre de prolines et lysines oxydées. De plus, l'hydrolyse des protéines par la trypsine conduit à l'identification de marqueurs peptidiques permettant de déterminer précisément l'espèce d'origine du liant à base de colle animale.

5. Analyse d'une dorure du XVIII^{ème} siècle

5.1. Techniques de la dorure

Il existe deux techniques principales de pose de la feuille d'or: la dorure à la mixtion et la dorure à l'assiette (ou dorure à l'eau). La dorure à la mixtion requiert l'emploi d'une mixtion à dorer (liquide siccatif à base d'huile de lin) afin de coller les feuilles d'or. Cette technique permet de dorer différents supports mais ne permet pas le brunissage, la dorure restera donc mate et sans éclat. La dorure à l'assiette est une technique plus élaborée nécessitant plus de préparation. Le support à dorer est d'abord préparé à l'aide d'une couche d'apprêt, généralement composée de blanc de Meudon et de colle, afin d'obtenir une surface lisse et sans défauts. Une fois bien sèche, cette surface peut accueillir l'assiette. L'assiette à dorer est une argile finement broyée qui est mélangée à de la colle, elle sert à obstruer les fonds poreux et facilite le brunissage de l'or. Légèrement humidifiée, l'assiette attire la feuille d'or. Il existe différentes couleurs d'assiette à dorer: jaune, rouge et noire. Le choix de la couleur de l'assiette à dorer dépend de l'effet souhaité. Le fond jaune est indiqué pour les parties les plus creuses, ce fond se confondant avec la couleur de l'or, cela rendra les éventuels manques de feuilles pratiquement invisibles. Le fond rouge, le plus couramment utilisé, est également appelée bol d'Arménie, il confère un ton très chaud à la feuille d'or alors que le fond noir permet d'obtenir une finition d'aspect patiné. L'assiette à dorer est souvent déposée en plusieurs couches, elle est ensuite polie afin d'éliminer les petits grains restants qui pourraient rayer la feuille d'or, cette étape s'appelle le chiennage. Finalement, les feuilles d'or sont déposées sur l'assiette préalablement humidifiée puis, on procède au brunissage de l'or à l'aide d'une pierre en agate ce qui donne un effet brillant à la dorure.

5.2. Description de l'échantillon

Un échantillon de dorure prélevé sur un mascarón (figure 3-11) ornant un des arcs-doubleaux de la voûte du cœur de l'église Saint-Maximin de Thionville nous a été gracieusement fourni par Mme Reille-Taillefert, dirigeante de l'atelier de restauration Taillefert (A.R.T SA, 37, rue de Gruenewald, R.C.S. Luxembourg B 82.343). Cette église, datée de la seconde moitié du XVIII^{ème} siècle est classée monument historique depuis 1984. Dans le cas présent, la dorure a été appliquée sur un décor en stuc, un enduit à base de chaux, ce qui est caractéristique des mouvements artistiques baroque et rococo.

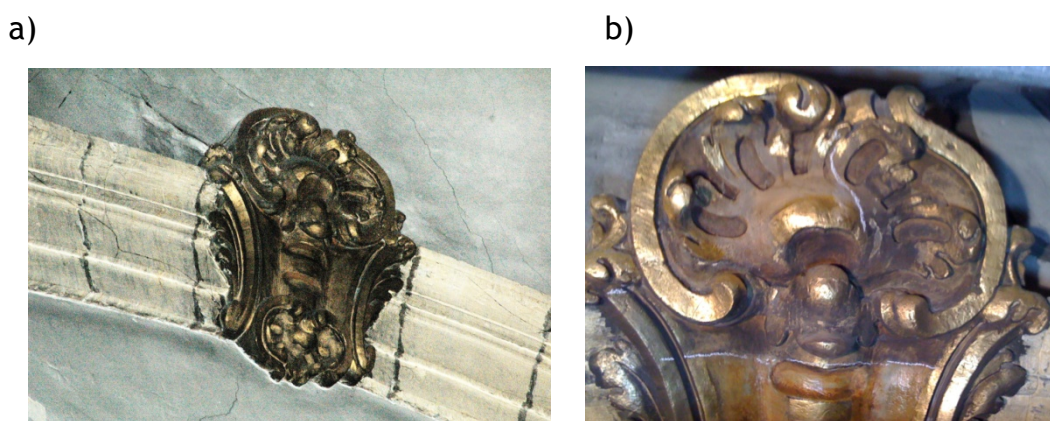


Figure 3-11: Photographies a) du mascarón ornant l'arc-doubleau sur lequel l'échantillon a été prélevé b) agrandissement de la partie supérieure du mascarón

Une observation sous microscope de l'échantillon (figure 3-12) nous montre que les feuilles d'or ont été appliquées sur une couche de couleur rougeâtre recouvrant le support en plâtre. La présence de cette couche de couleur rouge nous indique que la dorure a été exécutée selon la technique de dorure à l'assiette.

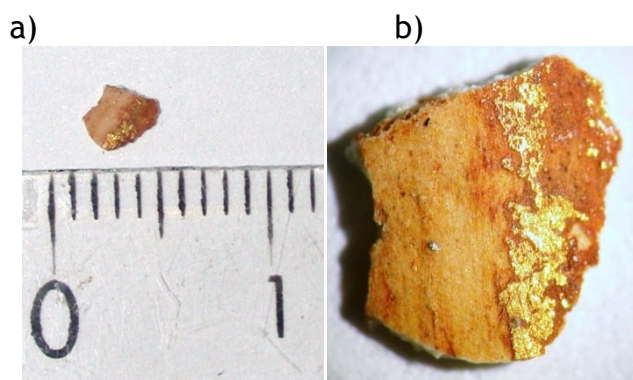


Figure 3-12: a) échantillon analysé (poids estimé à 100 µg) b) observation sous microscope de l'échantillon analysé permettant de distinguer les feuilles d'or appliquées sur l'assiette à dorer (couche rouge) recouvrant le support en plâtre

L'objectif de l'analyse est, dans le cas présent, d'utiliser des techniques complémentaires afin de caractériser l'échantillon dans sa totalité. Ainsi, des techniques d'analyse spectroscopique et protéomique ont été employées afin de caractériser les matériaux inorganiques et organiques (colle) composant l'échantillon.

5.3. Analyse spectroscopique

Une première analyse par micro-Raman a été effectuée sur l'échantillon afin d'identifier les matériaux inorganiques composant le support en plâtre et l'assiette à dorer.

Concernant le support en plâtre, des analyses ont été effectuées en différents points de l'échantillon conduisant toutes au spectre Raman montré sur la figure 3-13. Les bandes à 280, 712 et 1086 cm^{-1} correspondant à la calcite (CaCO_3)³⁵, les bandes à 450, 465, 620, 633, 647, 993, 1102, 1132 et 1153 cm^{-1} nous permettent d'identifier la thénardite (Na_2SO_4)³⁶ alors que la bande à 1008 cm^{-1} , attribuée à la vibration ν_1 des ions sulfates, est caractéristique du gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)³⁷. Ainsi, l'analyse Raman nous montre que pour cet échantillon de dorure, trois composés différents ont été utilisés pour la préparation de la couche d'apprêt. Les intensités relatives des bandes laissent supposer que cette couche d'apprêt est majoritairement composée de sulfate de sodium. A l'inverse, la faible intensité de la bande à 1008 cm^{-1} indique que le gypse est présent à l'état de traces dans l'échantillon.

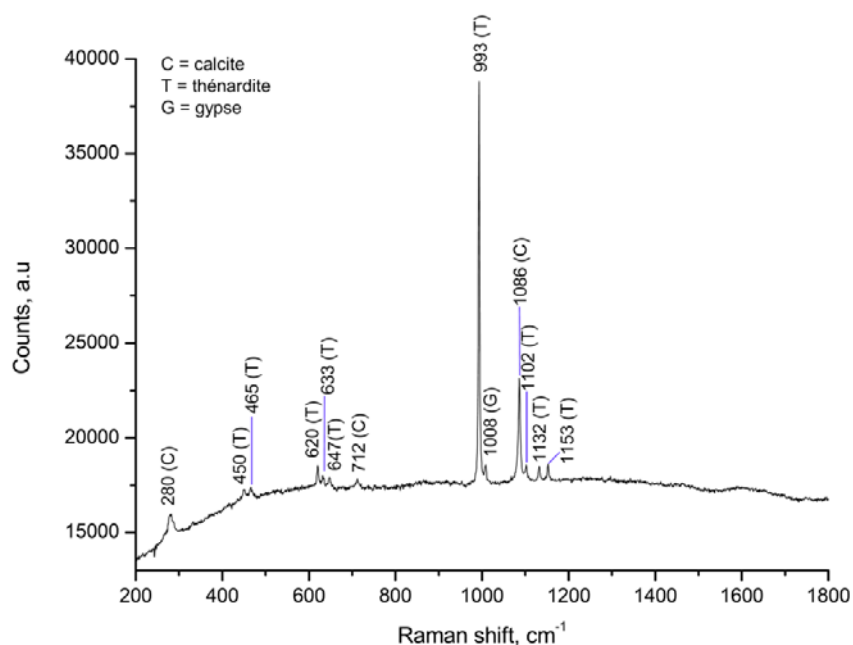


Figure 3-13: Spectre Raman du support en plâtre de la dorure

Concernant l'assiette à dorer (couche rouge), le spectre Raman, montré sur la figure 3-14, présente des bandes à 224, 246, 294, 407, 491, 608, et 1311 cm^{-1} qui nous ont permis d'identifier l'hématite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). En cristallographie, cet oxyde de fer appartient au groupe d'espace D_{3d}^6 et 7 bandes sont attendus sur le spectre Raman : 2 pour les modes A_{1g} (225 and 498 cm^{-1}) et 5 pour les modes E_g (247, 293, 299, 412 and 613 cm^{-1}). Ici, la composante à 299 cm^{-1} n'est pas observée mais il est mentionné qu'à température ambiante, cette bande est un épaulement de la bande à 293 cm^{-1} . Pour que cette bande soit bien résolue, il faut travailler à une température inférieure à 100 K. Par ailleurs, la bande intense à 1311 cm^{-1} est due à la nature antiferromagnétique de l'hématite³⁸. Le doublet à 608-657 cm^{-1} a été décrit dans la littérature et la bande à ~ 660 cm^{-1} est caractéristique de la magnétite (Fe_3O_4)^{39,40}. Par ailleurs il a été également montré que plus la teinte de l'ocre rouge tend vers le violet plus l'intensité de cette bande augmente et que ces deux bandes sont souvent identifiés dans le cas d'ocres rouges montrant qu'à l'état naturel ces pigments sont souvent un mélange d'hématite et de magnétite.

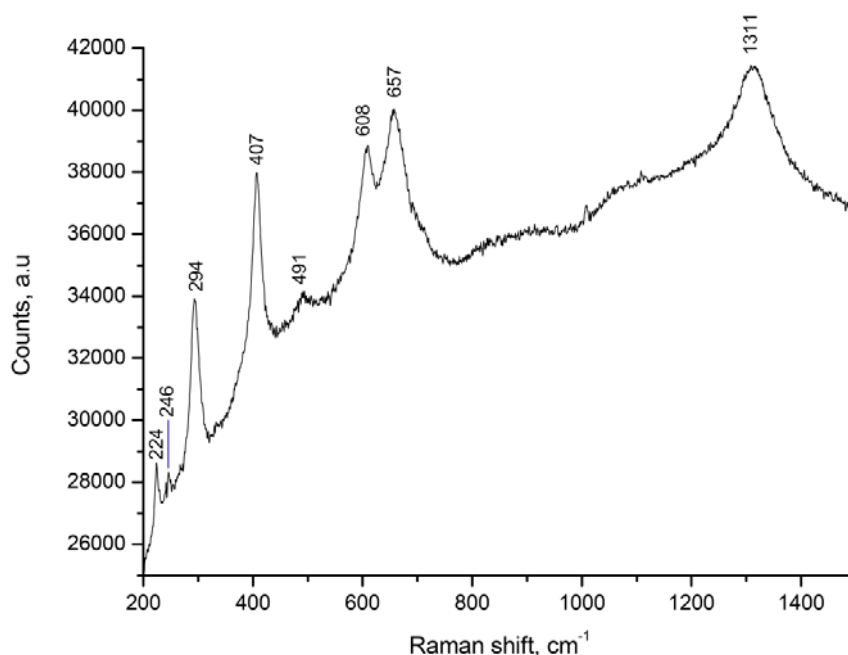


Figure 3-14: Spectre Raman de l'assiette à dorer

L'analyse spectroscopique révèle un support de composition assez singulière car les textes traitant de la technique de la dorure mentionnent plutôt l'utilisation de gypse. En revanche, l'assiette à dorer est une ocre rouge, ce qui est classique pour ce type de préparation.

5.4. Analyse protéomique

Afin de réaliser l'extraction des protéines contenues dans cet échantillon, nous avons eu recours à la méthodologie décrite dans le cas des peintures modèles. L'échantillon a été broyé dans la résine d'extraction avec de l'eau acidifiée (1% TFA), puis le surnageant contenant les protéines a été centrifugé et dessalé par dialyse. Les protéines ainsi extraites ont été hydrolysées avec de la trypsine et le digest résultant analysé par nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR. L'échantillon a été divisé en 2 afin d'effectuer une analyse sur l'échantillon entier ce qui inclue le support en plâtre et l'assiette à dorer, puis l'assiette à dorer a été grattée du support en plâtre afin d'analyser les 2 couches séparément et de distinguer le type de colle entrant dans la composition de chacune des couches.

Dans un premier temps, l'analyse a été réalisée sur la totalité de l'échantillon, ce qui inclut le support en plâtre, l'assiette à dorer et les feuilles d'or. La figure 3-15 présente les courants ioniques totaux obtenus pour les analyses MS et MS/MS de la dorure.

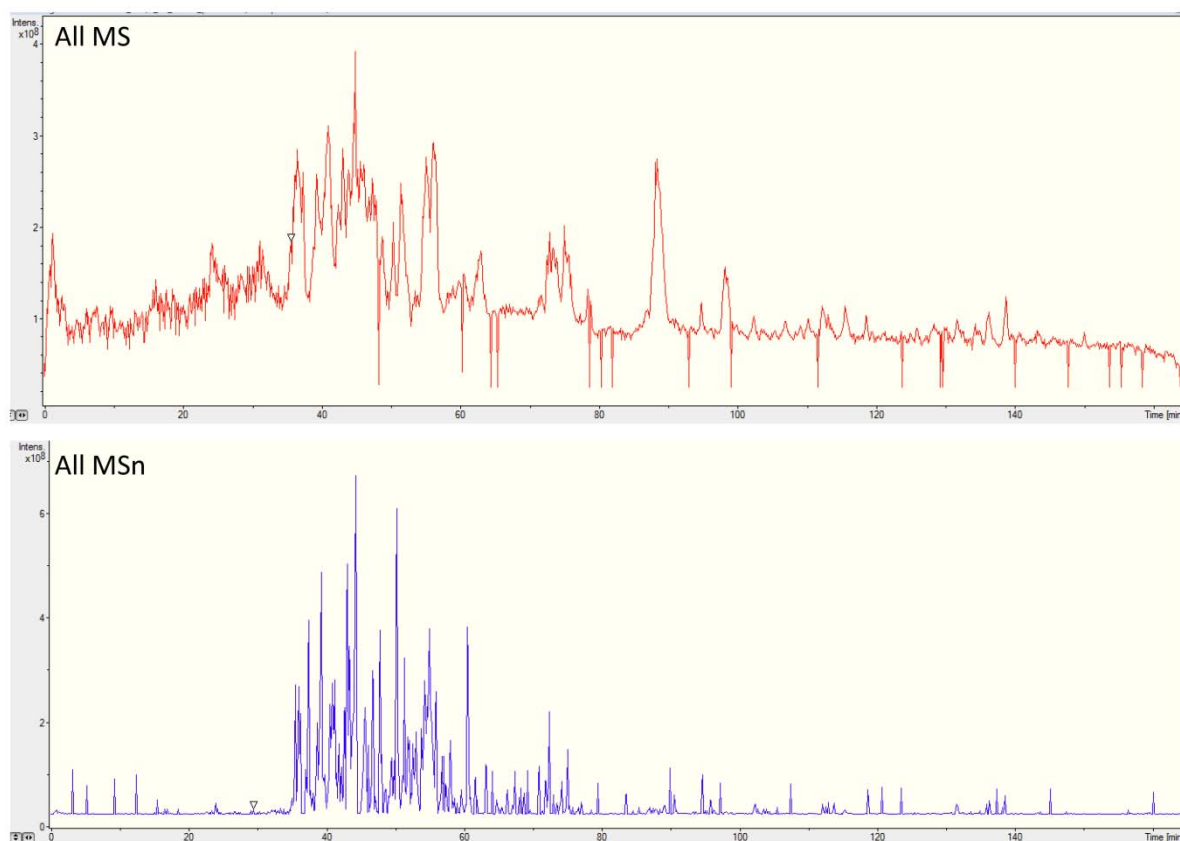


Figure 3-15: TIC résultants de l'analyse nanoLC-nanoESI-Qh-FT-ICR de l'échantillon de dorure

L'interrogation de la banque de données Swiss-Prot a conduit à l'identification de collagène de différentes espèces et également de kératine humaine (cf fig. 3-16). La kératine

est un contaminant habituel provenant de la manipulation de l'échantillon par l'être humain. Concernant les collagènes identifiés, on peut tout de même noter que deux protéines de collagène bovin (les collagènes type I $\alpha 1$ et $\alpha 2$) sont identifiées avec les scores les plus importants, ce qui laisse supposer la présence de marqueurs peptidiques pour cette espèce. Néanmoins, comme pour les analyses précédentes, nous avons repris pour chaque protéine identifiée par mascot la liste des peptides identifiés. Pour chaque séquence peptidique, un blast a été effectué afin de déterminer les peptides spécifiques présents dans notre échantillon. Suite aux blasts effectués, seuls des marqueurs peptidiques de l'espèce bovine ont été identifiés indiquant que les collagènes d'autres espèces ont été identifiés avec des peptides communs à l'espèce bovine.

<i>{MATRIX}</i> Mascot Search Results <i>{SCIENCE}</i>	
User	: SD
Email	:
Search title	: paint Salianski calib
MS data file	: H:\Sophie\Dorure ech 5A\ech entier\dorure_cal.mgf
Database	: Sprot 0411 (525207 sequences; 185522689 residues)
	: Error tolerant search of all significant protein hits
Timestamp	: 28 Mar 2011 at 11:52:27 GMT
Protein hits	: CO1A1_BOVIN Collagen alpha-1(I) chain OS=Bos taurus GN=COL1A1 PE=1 SV=3
	CO1A2_BOVIN Collagen alpha-2(I) chain OS=Bos taurus GN=COL1A2 PE=1 SV=2
	CO1A1_CANFA Collagen alpha-1(I) chain OS=Canis familiaris GN=COL1A1 PE=1 SV=1
	CO1A1_HUMAN Collagen alpha-1(I) chain OS=Homo sapiens GN=COL1A1 PE=1 SV=5
	CO1A1_RAT Collagen alpha-1(I) chain OS=Rattus norvegicus GN=Coll1a1 PE=1 SV=5
	CO1A1_MOUSE Collagen alpha-1(I) chain OS=Mus musculus GN=Coll1a1 PE=1 SV=4
	CO1A2_CANFA Collagen alpha-2(I) chain OS=Canis familiaris GN=COL1A2 PE=2 SV=2
	CO1A2_HUMAN Collagen alpha-2(I) chain OS=Homo sapiens GN=COL1A2 PE=1 SV=7
	CO1A1_CHICK Collagen alpha-1(I) chain OS=Gallus gallus GN=COL1A1 PE=1 SV=3
	CO1A2_RAT Collagen alpha-2(I) chain OS=Rattus norvegicus GN=Colla2 PE=1 SV=3
	CO1A1_CYNPY Collagen alpha-1(I) chain OS=Cynops pyrrhogaster GN=COL1A1 PE=2 SV=1
	CO2A1_BOVIN Collagen alpha-1(II) chain OS=Bos taurus GN=COL2A1 PE=1 SV=4
	K2C1_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
	CO1A2_MAMAE Collagen alpha-2(I) chain (Fragments) OS=Mammuth americanum PE=1 SV=2
	TRYP_PIG Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1
	K1C9_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
	CO3A1_MOUSE Collagen alpha-1(III) chain OS=Mus musculus GN=Col3a1 PE=2 SV=4
	CO1A2_CHICK Collagen alpha-2(I) chain (Fragments) OS=Gallus gallus GN=COL1A2 PE=1 SV=2
	K1C16_HUMAN Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4
	CO1A2_RABIT Collagen alpha-2(I) chain (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=COL1A2 PE=2 SV=1
	CO2A1_RAT Collagen alpha-1(II) chain OS=Rattus norvegicus GN=Col2a1 PE=2 SV=2
	CO2A1_MOUSE Collagen alpha-1(II) chain OS=Mus musculus GN=Col2a1 PE=1 SV=2
	CO3A1_BOVIN Collagen alpha-1(III) chain OS=Bos taurus GN=COL3A1 PE=1 SV=1
	CO1A2_RANCA Collagen alpha-2(I) chain OS=Rana catesbeiana GN=COL1A2 PE=2 SV=1
	CO2A1_XENLA Collagen alpha-1(II) chain OS=Xenopus laevis GN=col2a1 PE=2 SV=2
	CO1A1_BRACN Collagen alpha-1(I) chain (Fragments) OS=Brachylophosaurus canadensis GN=COL1A1 PE=1 SV=1

Figure 3-16: Résultats de l'interrogation mascot effectuée pour l'échantillon de dorure analysé en totalité

Ainsi, sur les 28 peptides identifiés pour le collagène type I $\alpha 1$, 4 peptides spécifiques sont dénombrés. C'est la première fois dans cette étude que des marqueurs peptidiques du collagène type I $\alpha 1$ sont identifiés. En effet, dans le cas présent la couverture de séquence atteint 41% pour cette protéine. Lors des analyses effectuées précédemment, le recouvrement de séquence avait atteint un maximum de 32% pour l'échantillon de colle de peau de bœuf,

cependant, tous les peptides identifiés étaient communs à d'autres espèces et ne pouvaient pas être considérés comme des marqueurs peptidiques de l'espèce bovine. Le spectre MS/MS montré en figure 3-17 a permis l'identification du peptide GEPGPAGLPGPPGER, marqueur peptidique du collagène type I $\alpha 1$ de l'espèce bovine, grâce à la présence sur le spectre des pics attribués aux ions y_3^+ à y_{13}^+ . Concernant les autres protéines de collagène bovin, nous avons répertorié 8 marqueurs peptidiques du collagène type I $\alpha 2$ et un seul pour le collagène de type III, les séquences des marqueurs peptidiques identifiés sont données dans la table 3-9. En revanche, aucun marqueur peptidique n'est identifié pour le collagène de type II. On peut tout de même noter que ce type de collagène n'avait jamais été identifié lors des analyses sur les échantillons de référence.

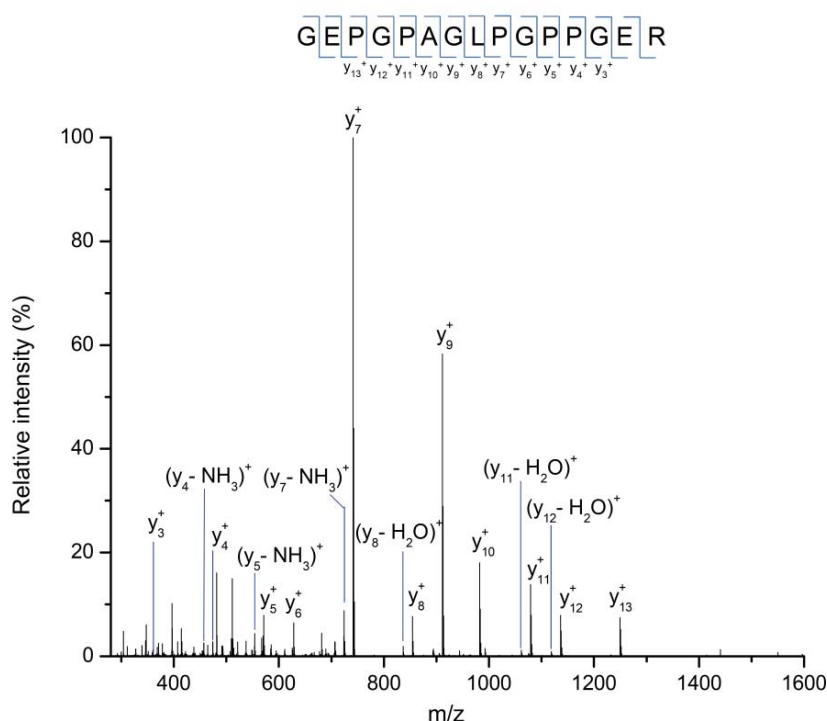


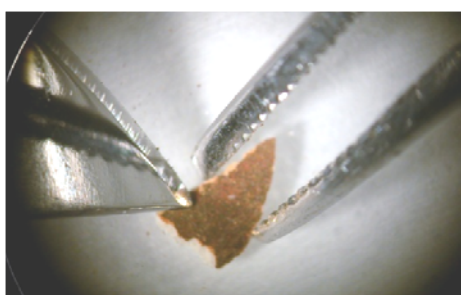
Figure 3-17: Spectre MS/MS de l'ion triplement chargé à $m/z = 718,336$ ($\Delta m = - 1$ ppm) provenant de l'hydrolysate des protéines extraites de l'échantillon de dorure et présentant les fragments y de la séquence peptidique GEPGPAGLPGPPGER spécifique du collagène type I $\alpha 1$ de l'espèce bovine (*Bos Taurus*)

Protéines identifiées	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Numéro d'accèsion de la protéine	Marqueurs peptidiques	Position	Dorure complète	Support en plâtre	Assiette à dorer
Collagen alpha-1(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	138854	P02453 (CO1A1_BOVIN)	GARGEPGAGLPGPPGER	469-486	x		
				GEPGPAGLPGPPGER	472-486	x		
				GETGPAGRPEVGGPPPPGAGEKGGAPGADGPAGAPGTPGPQGIAGQR	910-957	x		
				GAPGADGPAGAPGTPGPQGIAGQR	934-957	x	x	
				GPAGAPGTPGPQGIAGQR	940-957		x	
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	128985	P02465 (CO1A2_BOVIN)	GLVGEPPAGSKGESGNKGEPPGAVGQPPGPPSGEEGKR	341-379	x		
				GSTGEIGPAGPPPPGLR	380-397	x		x
				GEQGPAGPPGFQGLPGPAGTAGEAGKPGER	542-571	x	x	
				GIPGEFGLPGPAGAR	572-586	x	x	x
				GPSGPPGPDGNGKEPPVVGAPGTAGPSGSLPGER	608-643	x		
				SGETGASGPPGFVGEK	829-844			x
				PQGLLGAPGFLGLPGSR	861-877		x	
				GYPGNAGPVGAAGAPGQGPVGPVVK	947-972		x	
				GEPGPAGAVGPAGAVGPR	977-994	x	x	x
				IGQPGAVGPAGIR	1066-1078	x	x	x
IGQPGAVGPAGIRG	1066-1079	x	x					
Collagen alpha-1(III) chain	Bos taurus (Bovine)	93594	P04258 (CO3A1_BOVIN)	GAPGPQGPAPGLGIAGLTGAR	777-800	x	x	

Table 3-9: Peptides spécifiques aux collagènes bovins identifiés pour l'échantillon de dorure

Dans un second temps, la couche supérieure de l'échantillon incluant l'assiette à dorer et les feuilles d'or, a été grattée du support en plâtre afin de réaliser une analyse séparée de chaque couche et de distinguer le type de colle utilisé dans la préparation du support et dans la préparation de l'assiette.

a)



b)



c)



Figure 3-18: Photographies prises sous microscope montrant a) l'échantillon avant que l'assiette à dorer ne soit grattée du support, b) l'échantillon au cours de l'opération, c) un fragment du support obtenu après enlèvement de l'assiette à dorer

L'analyse protéomique séparée des deux échantillons (assiette à dorer et plâtre) a également conduit à l'identification de protéines de collagène et de kératine. Comme pour l'échantillon analysé en totalité, les collagènes de type I $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de l'espèce bovine sont identifiés avec les

scores les plus importants et les blasts effectués sur les séquences peptidiques ont mené à l'identification de marqueurs peptidiques de l'espèce bovine pour les deux échantillons.

Pour l'échantillon de plâtre, deux peptides spécifiques du collagène type I $\alpha 1$ ont été identifiés ainsi que 7 peptides spécifiques du collagène type I $\alpha 2$ et un peptide spécifique du collagène type III $\alpha 1$. Parmi les 7 marqueurs peptidiques du collagène type I $\alpha 2$, les séquences PQGLLGAPGFLGLPGSR et GYPGNAGPVGGAAGAPGPQGPVGPVKG respectivement en position 861-877 et 947-972 n'avaient pas été identifiées lors de l'analyse effectuée sur l'échantillon de dorure total.

Par ailleurs, concernant l'assiette à dorer, malgré la faible quantité d'échantillon disponible pour l'analyse étant donné la petite taille de l'échantillon et la minceur de cette couche, trois protéines de collagène ont été identifiées par mascot : les collagènes type I $\alpha 1$ et $\alpha 2$ et le collagène type II $\alpha 1$. Tous les peptides identifiés pour les collagènes type I et II $\alpha 1$ sont communs à plusieurs espèces, ce qui ne nous apporte pas d'informations quant à l'espèce d'origine de la colle animale. Toutefois, 5 marqueurs peptidiques du collagène type I $\alpha 2$ de l'espèce bovine ont été identifiés, montrant que la colle animale utilisée dans la préparation de l'assiette à dorer est de la colle de bœuf. Par exemple, le spectre MS/MS présenté figure 3-19 a permis l'identification du peptide IGQPGAVGPAGIR en position 1066-1078 dans le collagène type I $\alpha 2$ de l'espèce *Bos taurus* grâce aux ions y_5^+ à y_{12}^+ .

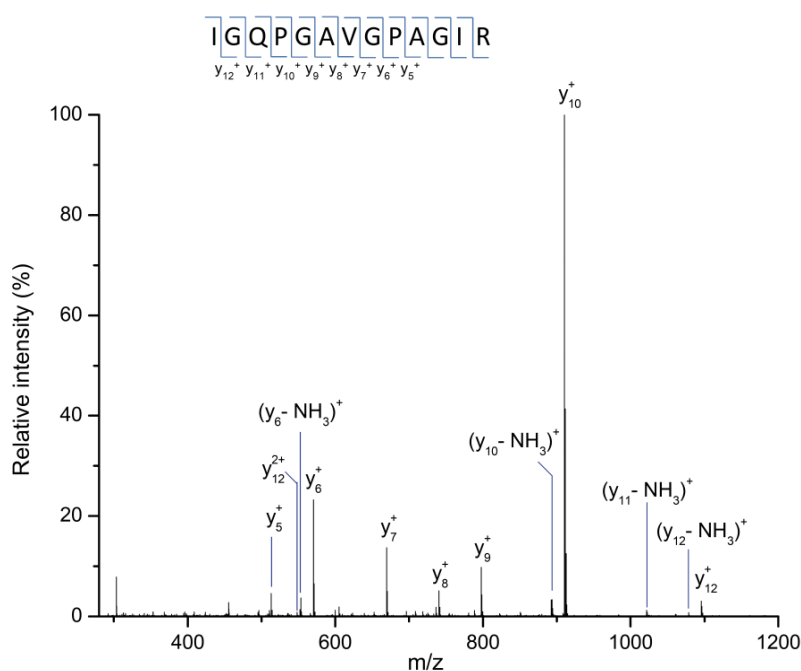


Figure 3-19: Spectre MS/MS de l'ion doublement chargé à $m/z = 604,841$ ($\Delta m = 1$ ppm) provenant de l'hydrolysat des protéines extraites de l'assiette à dorer et présentant les fragments y du peptide IGQPGAVGPAGIR spécifique du collagène type I $\alpha 2$ de l'espèce bovine (*Bos Taurus*)

L'analyse de cet échantillon de dorure datée du XVIII^{ème} siècle et provenant de l'église Saint Maximin de Thionville (France) a été réalisée grâce à deux outils analytiques : la micro-spectrométrie Raman et la protéomique. Les analyses par μ -Raman ont permis d'identifier les matériaux inorganiques utilisés pour la préparation de la couche d'apprêt et de l'assiette à dorer alors que l'analyse protéomique visait à identifier la colle animale utilisée pour la réalisation de cette dorure. Les résultats montrent que la couche d'apprêt, qui est une couche d'enduit appliquée sur le support à dorer dans le but d'obtenir une surface lisse, est composée de plusieurs minéraux : thénardite, calcite et gypse, et de colle d'origine bovine. L'assiette à dorer est une ocre rouge composée d'hématite et de magnétite à laquelle de la colle d'origine bovine a été ajoutée. L'emploi de colle animale confère à l'assiette à dorer un pouvoir adhésif qui permet, après humidification de cette couche de préparation, la fixation des feuilles d'or.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) P. Mora; L. Mora; Philippot, P. *La conservation des peintures murales* Editrice Compositori ed.: Bologne 1977.
- (2) Gettens, R. J.; Stout, G. L. *Painting materials: a short encyclopedia*; Courier Dover Publications: New York, 1966.
- (3) Mactaggart, P.; Mactaggart, A. *Practical gilding*; Archetype, 2002.
- (4) Wagstaff, L. *The gilding book: techniques, designs and inspirations using gold, silver and metal leaf*; Lorenz Books, 1996.
- (5) Pelton, B. W. *Furniture making and cabinet work: a handbook*; Van Nostrand, 1961.
- (6) Plesters, J. *Studies in Conservation* **1956**, 2, 110-157.
- (7) Johnson, M.; Packard, E. *Studies in conservation* **1971**, 16, 145-164.
- (8) Martin, E. *Stud Conserv* **1977**, 22, 63-67.
- (9) Cren-Olivé, C., Martin, E., Rolando, C., Vieillescazes, C. In *Proceedings of 6th International Conference on Non- Destructive Testing and Microanalysis for the Diagnostics and Conservation of the Cultural and Environmental Heritage*; Parisi, C., Gagliardi, S., Parisi, G. M., Torcinaro, G., Eds.: Roma, 1999, pp 1193-1206.
- (10) Cren-Olivé, C.; Martin, E.; Vieillescazes, C.; Rolando, C. *Art et Chimie, la couleur. Actes du congrès. Paris, 16-18 septembre 1998. CNRS Editions* **1998**, 111-114.
- (11) Kockaert, L., Gausset, P., Dubi-Rucquoy, M. *Stud Conserv* **1989**, 34, 183-188.
- (12) Vagnini, M.; Pitzurra, L.; Cartechini, L.; Miliani, C.; Brunetti, B.; Sgamellotti, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, 392, 57-64.
- (13) Dolci, L.; Sciutto, G.; Guardigli, M.; Rizzoli, M.; Prati, S.; Mazzeo, R.; Roda, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, 392, 29-35.
- (14) Sciutto, G.; Dolci, L.; Buragina, A.; Prati, S.; Guardigli, M.; Mazzeo, R.; Roda, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, 399, 2889-2897.
- (15) Colombini, M. P.; Modugno, F. *Journal of Separation Science* **2004**, 27, 147-160.
- (16) Kenndler, E.; Schmidt-Beiwil, K.; Mairinger, F.; Pöhm, M. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **1992**, 342, 135-141.
- (17) Casoli, A.; Mirti, P.; Palla, G. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **1995**, 352, 372-379.
- (18) Castro, R. M.; Carbo', M. T. D.; Martinez, V. P.; Adelantado, J. V. G.; Reig, F. B. *Journal of Chromatography A* **1997**, 778, 373-381.

- (19) Mateo Castro, R.; Carbo Domenech, M. T.; Peris Martinez, V.; Gimeno Adelantado, J. V.; Bosch Reig, F. *Journal of Chromatography A* **1997**, *778*, 373-381.
- (20) M. P. Colombini, R. F., A. Giacomelli and B. Muscatello *Studies in Conservation* **1998**, *43*, 33-41.
- (21) Aruga, R.; Mirti, P.; Casoli, A.; Palla, G. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **1999**, *365*, 559-566.
- (22) Colombini, M. P.; Modugno, F.; Menicagli, E.; Fuoco, R.; Giacomelli, A. *Microchemical Journal* **2000**, *67*, 291-300.
- (23) Mateo-Castro, R.; Gimeno-Adelantado, J. V.; Bosch-Reig, F.; Doménech-Carbó, A.; Casas-Catalán, M. J.; Osete-Cortina, L.; De la Cruz-Cañizares, J.; Doménech-Carbó, M. T. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **2001**, *369*, 642-646.
- (24) Schneider; Kenndler *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **2001**, *371*, 81-87.
- (25) Gimeno-Adelantado, J. V.; Mateo-Castro, R.; Doménech-Carbó, M. T.; Bosch-Reig, F.; Doménech-Carbó, A.; De la Cruz-Cañizares, J.; Casas-Catalán, M. J. *Talanta* **2002**, *56*, 71-77.
- (26) Peris-Vicente, J.; Gimeno Adelantado, J. V.; Carbó, M. T. D.; Castro, R. M.; Reig, F. B. *Talanta* **2006**, *68*, 1648-1654.
- (27) Příkryl, P.; Havlíčková, L.; Pacáková, V.; Hradilová, J.; Štulík, K.; Hořta, P. *Journal of Separation Science* **2006**, *29*, 2653-2663.
- (28) Albertini, E.; Raggi, L.; Vagnini, M.; Sassolini, A.; Achilli, A.; Marconi, G.; Cartechini, L.; Veronesi, F.; Falcinelli, M.; Brunetti, B.; Miliani, C. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *399*, 2987-2995.
- (29) Zhang, G.; Liu, T.; Wang, Q.; Chen, L.; Lei, J.; Luo, J.; Ma, G.; Su, Z. *Food Hydrocolloid* **2009**, *23*, 2001-2007.
- (30) Buckley, M.; Collins, M.; Thomas-Oates, J.; Wilson, J. C. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, *23*, 3843-3854.
- (31) Tran, T.-N.-N.; Aboudharam, G.; Gardeisen, A.; Davoust, B.; Bocquet-Appel, J.-P.; Flaudrops, C.; Belghazi, M.; Raoult, D.; Drancourt, M. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e17319.
- (32) Richter, K. K.; Wilson, J.; Jones, A. K. G.; Buckley, M.; van Doorn, N.; Collins, M. J. *Journal of Archaeological Science* **2011**, *38*, 1502-1510.
- (33) In *Catalogue des brevets d'invention pris du 1er janvier au 31 décembre 1868 (1) n°5*, France, Ministère de l'Agriculture ed.; Imprimerie et librairie de Mme V. BOUCHARD-HUZARD, rue de l'éperon 5: Paris, 1869, pp 161.

- (34) Tokarski, C.; Martin, E.; Rolando, C.; Cren-Olivé, C. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 1494-1502.
- (35) Rutt, H. N.; Nicola, J. H. *Journal of Physics C: Solid State Physics* **1974**, 7, 4522.
- (36) Hamilton, A.; Menzies, R. I. *Journal of Raman Spectroscopy* **2009**, 41, 1014-1020.
- (37) Sarma, L. P.; Prasad, P. S. R.; Ravikumar, N. *Journal of Raman Spectroscopy* **1998**, 29, 851-856.
- (38) de Faria, D. L. A.; Venâncio Silva, S.; de Oliveira, M. T. *Journal of Raman Spectroscopy* **1997**, 28, 873-878.
- (39) Froment, F.; Tournié, A.; Colomban, P. *Journal of Raman Spectroscopy* **2008**, 39, 560-568.
- (40) Cristini, O.; Kinowski, C.; Turrell, S. *Journal of Raman Spectroscopy* **2010**, 41, 1410-1417.

ANNEXES

Résultats détaillés de l'analyse nano LC nano ESI-Qh-FT-ICR pour chaque échantillon

1. Echantillon de colle de relieur (Kremer, référence 63060)

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	128985	733	30	20	GSTGEIGPAGPPG ¹ PGLR	380-397	1631,826	1631,827	1
						GSTGEIGPAGPPGPPGLR		1647,821	1647,823	1
						GPAGPPGPPGLR	386-397	1103,572	1103,573	1
						GIPGEFGLPGPAGAR	572-586	1426,720	1426,716	-3
						GPSGPPGPDGNKGE ¹ PGVVGAPGTAGPSGSPGLPGER	608-643	3226,512	3226,506	-2
						GYPGNAGPVGAAGAPGPGQGPVGPVVK	947-972	2260,123	2260,126	1
						GEPGPAGAVGPAGAVGPR	977-994	1531,774	1531,776	1
						IGQPGAVGPAGIR	1066-1078	1191,672	1191,673	1
IGQPGAVGPAGIR	1207,667	1207,667	0							
Collagen alpha-I(III) chain	Bos taurus (Bovine)	93594	88	5	3	GAPGEKGE ¹ GGPPGAAGPAGGSGPAGPPGPOGVK	672-704	2767,316	2767,320	2
						GAPGPPQPPGAPGLGIAGLTGAR	777-800	2081,101	2081,100	-1
						GAPGPPQPPGAPGLGIAGLTGAR		2097,096	2097,095	-1
						GAPGPPQPPGAPGLGIAGLTGAR		2113,091	2113,090	0

¹ P signifie que l'acide aminé est une hydroxyproline
K signifie que l'acide aminé est une hydroxylysine

2. Echantillon de colle d'os (Kremer, référence 63000)

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	128985	441	22	14	GSTGEIGPAGPPGPPGLR	380-397	1704,843	1704,848	3
						GIPGEFGLPGPAGAR	572-586	1426,720	1426,719	0
						GPSGPPGPDGNKGE ¹ PGVVGAPGTAGPSGSPGLPGER	608-643	3226,512	3226,519	2

3. Echantillon de colle de peau de bœuf (Kremer, référence 63020)

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	128985	525	29	19	GSTGEIGPAGPPGPPGLR	380-397	1631,826	1631,830	2
						GPAGPPGPPGLR	386-397	1103,572	1103,573	1
						GEQGPAGPPGFQGLPGPAGTAGEAGKPGER	542-571	2791,316	2791,325	3
						GIPGEFGLPGPAGAR	572-586	1426,720	1426,716	-3
						GPSGPPGPDGNKGE ^u PGVVGAPGTAGPSGSPGLPGER	608-643	3226,512	3226,505	-2
						GYPGNAGPVGAAGAPGPGQGPVGPVGK	947-972	2260,123	2260,129	3
						GEPGPAGAVGPAGAVGPR	977-994	1531,774	1531,774	0
						IGQPGAVGPAGIR	1066-1078	1191,672	1191,673	1
IGQPGAVGPAGIR	1207,667	1207,667	0							
Collagen alpha-1(III) chain	Bos taurus (Bovine)	93594	74	5	2	GAPGEKGE ^u GPPGAAGPAGGSGPAGPPGPGQVK	672-704	2767,316	2767,321	2
						GAPGPGQPPGAPG ^u PLGIAGLTGAR	777-800	2097,096	2097,095	0

4. Echantillon de colle de peau de lapin (Kremer, référence 63028)

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Oryctolagus cuniculus (Rabbit)	53096	69	7	2	GLPGVAGALGEPGLGIAGPPGAR	43-66	2128,127	2128,128	0
						GEPGPAGSIGPVGAAGPR	139-156	1561,784	1561,788	2

5. Echantillon d'ichtyocolle Salianski (Kremer, référence 63110)

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Oncorhynchus mykiss (Rainbow trout) (Salmo gairdneri)	126908	148	5	4	GQPGNIGFP ^u PK	481-492	1199,593	1199,594	1
						GEQGPAGAPGE ^u QGLPGPAGPAGEAGK	538-563	2306,092	2306,093	0
						GPSGERGEGGAPGL ^u GFAGPPGSDGQSGPR	703-732	2720,253	2720,252	-1

6. Echantillon de colle de peau de lapin PN03

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Oryctolagus cuniculus (Rabbit)	53096	199	19	6	GLPGVAGALGEPGLGIAGPPGAR	43-66	2128,127	2128,124	-2
						GYPGNAGPVGAAGAPGPGQGSVGP ^u TGK	109-134	2252,082	2252,088	3
						GEPGPAGSIGPVGAAGPR	139-156	1561,784	1561,784	0

7. Echantillon de colle de peau de lapin PN04

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Oryctolagus cuniculus (Rabbit)	53096	329	19	4	GLPGVAGALGEPGLGIAGPPGAR	43-66	2128,127	2128,125	-1
						GYPGNAGPVGAAGAPGPGQGSVGP ^u TGK	109-134	2252,088	2252,093	3
						GEPGPAGSIGPVGAAGPR	139-156	1561,784	1561,784	0

8. Echantillon de colle de peau de lapin PN05

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	128985	515	31	20	GSTGEIGPAGPPGPPGLR	380-397	1631,826	1631,830	2
						GSTGEIGPAGPPGPPGLR		1647,821	1647,824	2
						GEQGPAGPPGFQGLPGPAGTAGEAGKPGER	542-571	2791,316	2791,324	3
						GIPGEFGLPGPAGAR	572-586	1426,720	1426,718	-1
						GPSGPPGPDGNKGEVVGAPGTAGPSGSPGLPGER	608-643	3226,512	3226,514	1
						GAPGAIGAPGPAGANGDRGEAGPAGPAGPR	674-706	2779,338	2779,333	-2
						GPSGEPGTAGPPGTPGQQLLGPAGFGLPGR	845-877	3032,48	3032,478	-2
						GYPGNAGPVGAAGAPGQGPVGPVVK	947-972	2260,123	2260,130	3
						AGPVGAAGAPGQGPVGPVVK	952-972	1755,926	1755,931	3
						GEPPGAVGPAGAVGPR	977-994	1531,774	1531,779	3
IGQPGAVGPAGIR	1066-1078	1191,672	1191,673	1						
Collagen alpha-1(III) chain	Bos taurus (Bovine)	93594	360	22	11	GEPPQGHAGAPPPGPPGSDGSPGGKEMGPAGIPGAPGLIGAR	213-257	4031,866	4031,869	1
						GPTGPAGPPGAGQPGDKGESGAPVPGIAGPR	606-638	2949,458	2949,467	3
						GAPGEKGEPPGAAGPAGGSGPAGPPGQGVK	672-704	2767,316	2767,316	0
						GAPGEKGEPPGAAGPAGGSGPAGPPGQGVKGER	672-707	3125,476	3125,466	-3
						GAPGPQGGPAGPLGIAGLTGAR	777-800	2097,096	2097,094	-1

9. Echantillon de colle de peau de lapin PN06

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	128985	609	33	21	GSTGEIGPAGPPGPPGLR	380-397	1631,826	1631,830	2
						GPAGPPGPPGLR	386-397	1103,572	1103,573	1
						GEQGPAGPPGFQGLPGPAGTAGEAGKPGER	542-571	2791,316	2791,321	2
						GIPGEFGLPGPAGAR	572-586	1426,720	1426,718	-1
						GPSGPPGPDGNKGEVVGAPGTAGPSGSPGLPGER	608-643	3226,512	3226,506	-2
						GPSGEPGTAGPPGTPGQQLLGPAGFGLPGR	845-877	3032,484	3032,480	-1
						GYPGNAGPVGAAGAPGQGPVGPVVK	947-972	2260,123	2260,129	3
						GEPPGAVGPAGAVGPR	977-994	1531,774	1531,776	1
						IGQPGAVGPAGIR	1066-1078	1191,672	1191,673	1
						IGQPGAVGPAGIR	1078	1207,667	1207,669	2
Collagen alpha-1(III) chain	Bos taurus (Bovine)	93594	101	13	6	GAPGEKGEPPGAAGPAGGSGPAGPPGQGVKGER	672-707	3166,502	3166,498	-1
						GAPGPQGGPAGPLGIAGLTGAR	777-800	2081,101	2081,099	-1

10. Echantillon de colle de peau de lapin Totin-Frères

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Oryctolagus cuniculus (Rabbit)	53096	185	14	3	GLPGVAGALGEPGLGIAGPPGAR	43-66	2128,127	2128,129	1
						GEPPGAGSIGVGAAGPR	139-156	1561,784	1561,784	0

11. Echantillon de peinture modèle liée avec la colle de relieur

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	128985	635	13	11	RGSTGEIGPAGPPGPPGLR	379-397	1803,922	1803,923	0
						GSTGEIGPAGPPGPPGLR	380-397	1647,821	1647,823	1
						GPAGPPGPPGLR	386-397	1103,572	1103,571	-1
						GIPGEFGLPGPAGAR	572-586	1426,720	1426,721	1
						GEPPGAVGPAGAVGPR	977-994	1531,774	1531,774	0
						IGQPGAVGPAGIR	1066-1078	1191,672	1191,672	0
IGQPGAVGPAGIR	1207,667	1207,668	1							

12. Echantillon de peinture modèle liée avec la colle de peau bovine

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	128985	591	19	14	RGSTGEIGPAGPPGPPGLR	379-397	1803.922	1803.919	-2
						GSTGEIGPAGPPGPPGLR	380-397	1647.821	1647.823	1
						GPAGPPGPPGLR	386-397	1103.572	1103.573	1
						GIPGEFGLPGPAGAR	572-586	1426.720	1426.718	-1
						PGPAGAVGPAGAVGPR	979-994	1345.710	1345.7109	0
						IGQPGAVGPAGIR	1066-1078	1191.672	1191.671	-1
IGQPGAVGPAGIR	1207.667	1207.667	0							
Collagen alpha-1(III) chain	Bos taurus (Bovine)	93594	185	10	6	GESGAPGVPGIAGPR	624-638	1352.668	1352.668	0
						GAPGPQGGPPGAPGLGIAGLTGAR	777-800	2081.101	2081.106	2

13. Echantillon de peinture modèle liée avec la colle d'os

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	128985	550	17	14	GIPGEFGLPGPAGAR	572-586	1426.720	1426.721	1
						GIPGEFGLPGPAGAR		1442.715	1442.719	3
						IGQPGAVGPAGIR	1066-1078	1207.667	1207.666	-1

14. Echantillon de peinture modèle liée avec la colle de peau de lapin PN04

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Oryctolagus cuniculus (Rabbit)	53096	145	14	3	GLPGVAGALGEPGLGIAGPPGAR	43-66	2128.127	2128.126	0
						GEPGPAGSIGPVGAAGPR	139-156	1561.784	1561.786	1

15. Echantillon de peinture modèle liée avec l'ichtyocolle Salianski

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Oncorhynchus mykiss (Rainbow trout) (Salmo gairdneri)	126908	107	6	4	GFPPTPLPGMK	160-171	1221.570	1221.570	0
						GAAGLPVAGAPGPPGPR	304-321	1611.800	1611.802	1
						GEQGPAGAPGEQGLPGPAGPAGEAGK	538-563	2306.092	2306.096	2
						GPSGERGEGGPAGLPGFAGPPGSDGQSGPR	703-732	2720.253	2720.258	2

16. Echantillon de dorure analysé en entier

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-1(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	138854	1416	41	37	GARGE <u>P</u> G <u>P</u> AGL <u>P</u> G <u>P</u> GER	469-486	1718.833	1718.834	0
						GE <u>P</u> G <u>P</u> AGL <u>P</u> G <u>P</u> GER	472-486	1434.673	1434.672	-1
						GETG <u>P</u> AGR <u>P</u> GEV <u>G</u> PP <u>P</u> PPG <u>P</u> AGEK <u>G</u> APGADG <u>P</u> AGAPG <u>T</u> PG <u>P</u> QGIAGQR	910-957	4285.038	4285.031	-2
						GAPGADG <u>P</u> AGAPG <u>T</u> PG <u>P</u> QGIAGQR	934-957	2087.998	2088.004	3
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	128985	1158	35	31	GLVGE <u>P</u> PAGSKGESGNKGE <u>P</u> AVGQ <u>P</u> PPG <u>P</u> SGE <u>E</u> GKR	341-379	3645.714	3645.706	-2
						GSTGEIG <u>P</u> AG <u>P</u> PG <u>P</u> GLR	380-397	1647.821	1647.820	-1
						GEQGPAG <u>P</u> PPG <u>E</u> QGL <u>P</u> GPAGTAGEAGK <u>P</u> GER	542-571	2791.316	2791.322	2
						GIPGEFGL <u>P</u> GPAGAR	572-586	1410.725	1410.729	3
						GIPGEFGL <u>P</u> GPAGAR		1426.720	1426.722	2
						GIPGEFGL <u>P</u> GPAGAR		1442.715	1442.719	2
						G <u>P</u> SGPPG <u>D</u> GNK <u>G</u> EP <u>G</u> VV <u>G</u> APG <u>T</u> AG <u>P</u> SG <u>P</u> SG <u>L</u> PER	608-643	3226.512	3226.516	1
						GE <u>P</u> GPAGAVGPAGAVGPR	977-994	1531.774	1531.775	1
						IGQ <u>P</u> GAVGPAGIR	1066-1078	1207.667	1207.667	0
IGQ <u>P</u> GAVGPAGIRG	1066-1079	1264.688	1264.691	2						
Collagen alpha-1(III) chain	Bos taurus (Bovine)	93594	66	2	1	GAPG <u>P</u> QGP <u>P</u> AG <u>P</u> GLGIAGLTGAR	777-800	2097.130	2097.123	-3
						GAPG <u>P</u> QGP <u>P</u> AG <u>P</u> GLGIAGLTGAR		2113.124	2113.118	-3

17. Echantillon de dorure - couche d'apprêt analysé séparément

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	128985	557	29	25	GEQGPAG <u>P</u> PPG <u>E</u> QGL <u>P</u> GPAGTAGEAGK <u>P</u> GER	542-571	2791.316	2791.320	2
						GIPGEFGL <u>P</u> GPAGAR	572-586	1410.725	1410.726	1
						GIPGEFGL <u>P</u> GPAGAR		1426.720	1426.716	-3
						PQGLLGAP <u>G</u> F <u>L</u> GL <u>P</u> GSR	861-877	1667.899	1667.901	1
						GYPGNAG <u>P</u> VGAAGAP <u>G</u> PQGPVGPVVK	947-972	2260.123	2260.130	3
						GE <u>P</u> GPAGAVGPAGAVGPR	977-994	1531.774	1531.773	-1
						IGQ <u>P</u> GAVGPAGIR	1066-1078	1207.667	1207.665	-2
IGQ <u>P</u> GAVGPAGIRG	1066-1079	1264.688	1264.687	-1						
Collagen alpha-1(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	138854	520	37	31	GAPGADG <u>P</u> AGAPG <u>T</u> PG <u>P</u> QGIAGQR	934-957	2072.003	2072.007	2
						GPAGAP <u>G</u> T <u>P</u> GPQGIAGQR	940-957	1619.801	1619.804	1
Collagen alpha-1(III) chain	Bos taurus (Bovine)	93594	50	3	2	GAPG <u>P</u> QGP <u>P</u> AG <u>P</u> GLGIAGLTGAR	777-800	2081.101	2081.106	2
						GAPG <u>P</u> QGP <u>P</u> AG <u>P</u> GLGIAGLTGAR		2097.096	2097.101	2

18. Echantillon de dorure - assiette à dorer analysée séparément

Protéine	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre total de peptides identifiés	Peptides spécifiques	Position	Masse théorique	Masse expérimentale	Δm (ppm)
Collagen alpha-2(I) chain precursor	Bos taurus (Bovine)	128985	478	11	10	GSTGEIG <u>P</u> AG <u>P</u> PG <u>P</u> GLR	380-397	1647.821	1647.824	2
						GIPGEFGL <u>P</u> GPAGAR	572-586	1426.720	1426.720	0
						SGETGASGPP <u>G</u> FVGEK	829-844	1491.684	1491.688	3
						GE <u>P</u> GPAGAVGPAGAVGPR	977-994	1531.774	1531.775	0
IGQ <u>P</u> GAVGPAGIR	1066-1078	1207.667	1207.668	1						

Identification of Animal Glue Species in Artworks Using Proteomics: Application to a 18th Century Gilt Sample

Sophie Dallongeville,[†] Monika Koperska,[†] Nicolas Garnier,[‡] Geneviève Reille-Taillefert,[§] Christian Rolando,[†] and Caroline Tokarski^{*,†}

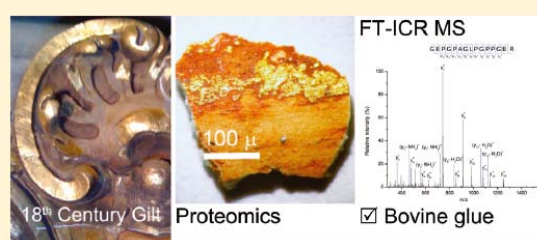
[†]Miniaturisation pour l'Analyse, la Synthèse & la Protéomique (MSAP), USR CNRS 3290, and Protéomique, Modifications Post-traductionnelles et Glycobiologie, IFR 147, Université de Lille 1 Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

[‡]SARL Laboratoire Nicolas Garnier, 63270 Vic le Comte, France

[§]Atelier de Restauration Taillefert (A.R.T S.A.), 37, rue de Gruenewald, L1657 Luxembourg

S Supporting Information

ABSTRACT: This study proposes a proteomic-based strategy for the identification of the origin species of glues used as binding media and adhesives in artworks. The methodology, based on FTICR high resolution mass spectrometry, was evaluated on glues from different animal origin (i.e., bovine, rabbit, and fish). The analysis of the peptide mixture resulting from the enzymatic hydrolysis of the proteins led to the identification of species-specific peptides. Up to 15 specific peptides were identified for the bovine species and three for the rabbit species and, in the case of sturgeon glue, three fish-specific peptides were found by sequence homology to the rainbow trout. Then, the method was applied to authenticate different rabbit skin glue samples, including a 100 year-old sample named "Colle à Doreurs" coming from the "Maison Totin-Frères". For this sample, two specific peptides of rabbit collagen were identified. To evaluate the method in a complex matrix, model paints composed of lead white, linseed oil, and animal glue were prepared. Species-specific peptides were identified in each paint sample. Finally, a gilt sample from St Maximin church dating from the eighteenth century was analyzed, and 13 peptides specific to bovine collagens were identified starting from very low sample amount (50 μ g).



Over the past centuries, artists have used various organic compounds as binding media and adhesives in artworks.^{1,2} The choice of the binding medium is often specific to the artist's technique but also adapted to the artwork support and to the artist's environment. In consequence, the identification of binders provides fundamental information for art historians but also for restorers and conservators. In Europe, protein materials, polysaccharides (gums) and siccativ oils were extensively used. Among these substances, animal glues were widely used not only as binders for pigments³ but also mixed with chalk for the preparation of the ground layer in canvas paintings, as adhesives,⁴ or for gilding on manuscripts, wood⁵ or building embellishment.^{6,7} Animal glue was obtained by boiling tissues such as bones, skins, and cartilaginous parts of animals or fishes. Mainly constituted of collagen, animal glue can be easily identified using chromatographic techniques coupled to mass spectrometry (GC-MS or HPLC-MS)^{8–16} due to the high content of glycine, proline, and hydroxyproline in collagen.^{17,18} Alternative techniques based on immunology, in particular the Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), were recently applied to identify collagen in artworks,^{19,20} and a method based on mitochondrial DNA analysis was described for the identification of the origin species of animal glues used as binders.²¹

Focusing on the proteomics approach, the identification of proteins in artworks was first performed by comparison of the

peptide MALDI fingerprinting with reference materials, showing that the various proteinaceous binders could be differentiated using their MS pattern.²² This approach has recently been applied to archeological samples together with data clustering of modern model samples in order to identify animal species using the MS profile of the collagen remaining in the bones even when no sequence information was available.^{23–25} However, no attempt was made to identify the peptides and their modifications using this mass spectrometry peptide profiling method. A recent study shows that the use of liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI MS/MS) can lead to the identification of marker peptides of collagens from different types.²⁶ A protocol based on cyanogen bromide digestion was applied directly to rat tissues that are rich in collagen (skin, tail tendon, or aorta) and marker peptides of the different types of collagen were identified.²⁷ Marker peptides of animal species were also identified using LC-ESI MS/MS and allowed the differentiation between porcine and bovine gelatin grade food.²⁸ In a previous study, our team proposed a proteomics method to identify very small amounts of proteins in ancient paintings using nanoLC nanoESI MS/

Received: August 10, 2011

Accepted: October 20, 2011

MS.^{29,30} This method was then applied to identify protein binders in historical paintings^{31,32} and also to identify protein modifications in mural paintings.³³ Our team recently showed that the use of high resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry³⁴ (FTICR MS) enables the identification of animal species in archeological samples even when no or poor sequence information is available in proteomics databases.^{35,36} This work proposes to adapt the proteomic approach based on nano-LC nanoESI high resolution MS and MS/MS to identify the origin species of animal glue from a few micrograms of highly denaturated samples. High resolution FT-ICR analyzer was chosen preferentially to lower resolution ones (e.g. Q-TOF) because it provides reliable protein identification with a single analysis, which is a crucial point for investigation on artwork samples. The methodology was developed on animal glues from various origins and in particular, it was applied to authenticate animal glues sold by different retailers with certified origins. Then, to evaluate the efficiency of the methodology on complex samples, different model paints composed of lead white, oil, and animal glue from various species were prepared. Thus, it can be ensured that the interaction with the other components of the paint does not prevent one from identifying the origin species of the glue binder. Besides, lead white was chosen as pigment because it represents the most used white pigment since ancient time for its siccative properties; it is documented to accelerate many chemical mechanisms in paints.³⁷ The analyses were performed on very small amounts of paints (50 to 200 μg) which proved the efficiency of such a method on a small amount of complex samples. The methodology was successfully applied to (i) the famous hundred year-old Totin binder³⁸ named "Colle à Doreurs" (Totin Gilder Glue) and (ii) an 18th century gilt sample from St Maximin church (Thionville, France; church listed as a French historical monument).

■ EXPERIMENTAL SECTION

Animal Glue Samples. Bone glue (63000), hide glue (63020), rabbit skin glue (63028), bookbinder glue (63060), and Salianski isinglass (63110) were purchased from Kremer (Aichstetten, Germany). Rabbit skin glue (PN05) was obtained from a French company (kept voluntarily anonymous) specializing in gilding and associated products. Samples of rabbit skin glue (PN03, PN04, PN05, and PN06) were kindly provided by a gilder (Atelier de la feuille d'or, Faubourg St Antoine, Paris, France), but the commercial provenance of these samples is unknown. One hundred-year old rabbit skin glue named "Colle à Doreurs" (Totin Gilder Glue) comes from Maison Totin Frères (France). This society was located in Montreuil-sous-Bois (France), and a patent concerning the manufacture of Gilder Glue made with rabbit skin was deposited in 1868,³⁸ making this manufacturer very famous among restorers and gilders. This artisanal manufacturer stopped activities shortly after the Second World War.

Ancient Gilt Sample. An 18th century gilt sample from the St Maximin church located in Thionville (France) was kindly provided by the Atelier de Restauration Taillefert. A restoration campaign was undertaken for this edifice, and the gilt sample was removed from the mascaron decorating a transverse arch located under the vault of the church in order to investigate the gilding technique employed in this case. Analyses were performed starting from three supports: from 50 μg of total sample (estimated by measuring their size using a microscope and assuming a density

of 1) and from the two main layers constituting this sample separately (amounts estimated less than 50 μg); the upper layer containing the bole layer (red clay mixed with animal glue) and the gold leaf was scrapped off from the plaster support using a scalpel. Due to the small sample size, this procedure was performed under a microscope.

Animal Glue Solution Preparation. Solid samples of animal glue were dissolved in deionized water at 60 °C during 4 h in order to obtain a final protein concentration of 5 mg/mL.

Model Paint Preparation. Model paints were prepared with bookbinder glue (63060), bone glue (63000), hide glue (63020), rabbit skin glue (PN04), and Salianski isinglass (63110). Paints were prepared using the following proportions: 100 μL of deionized water was added to 500 mg of lead carbonate in order to wet the pigment. Then, 300 μL of animal glue solution was added to this paste. Finally, 100 μL of linseed oil was added, and the resulting mixture was mixed energetically using a vortex until an emulsion was obtained. Thin films of resulting paints were manually spread on glass slides, and they were left to dry in the laboratory for 2 weeks without any particular precautions.

Protein Extraction from Model Paintings and Art Samples.

Very small sample amounts of the model paints (200 μg estimated according to the size of the sample) were carefully removed and were ground with a single-use synthetic pestle in 50 μL of protein extraction solution which consists of a commercial resin (guaranteed free of any proteins, RNA, and DNA) solubilized with deionized water containing 1% trifluoroacetic acid. After centrifugation, the supernatants were collected and desalted against 1 L of deionized water overnight using a dialysis unit. The samples were then dry-evaporated and concentrated in 5 μL of deionized water.

Chemicals and Reagents, Enzymatic Hydrolysis, Peptide Desalting, Sample Analysis, and Database Search. Full experimental details are given in Supporting Information.

■ RESULTS AND DISCUSSION

The aim of this work was to identify the origin species of animal glue from ancient and denaturated artwork samples. The proposed line was based on the identification of species-specific peptides of animal glues using optimized proteomic methodology. The first part of the manuscript deals with the analysis of reference animal glue samples; this part includes methodology optimization on low sample amounts. On the basis of the optimized method, the second part of the manuscript proposes animal glue origin authentication, including particularly the analysis of the famous hundred-year-old Totin binder named "Colle à Doreurs" (Totin Gilder Glue). The third part of the manuscript deals with the analysis of model paints composed of lead white, animal glue, and linseed oil. This part demonstrates the efficiency of the developed method for the origin species identification of animal glues included in complex matrix. Finally, the last part presents the results obtained on 50 μg of gilt sample dating from the 18th century obtained from the St Maximin church (Thionville, France).

Analysis of Reference Animal Glue Samples. This part of the study was focused on animal glues from three different species: bovine (*Bos taurus*), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and fish (Caspian and Russian sturgeons, *Acipenser guldenstadti*). More precisely, five standard samples obtained from the Kremer retailer were used. Among these samples, three were indicated to

have bovine origin: bone glue (referenced with number 63000 in the Experimental Section), hide glue (reference 63020), and bookbinder glue (reference 63060); one was indicated to be rabbit skin glue (reference 63028), and the last one was Salianski isinglass (reference 63110, fish origin). It can be pointed out that each species contains high sequence homology to other species. For example, 92% of collagen $\alpha 2$ type I sequence from rabbit species is similar to bovine species (result obtained using BLASTp software, <http://www.uniprot.org/blast/uniprot/>). Consequently, the proposed methodology aims to identify constitutive peptides from proteins and to search species-specific peptides. The analytical strategy was based on five main steps: (i) glue solubilization and enzymatic hydrolysis to create peptide fingerprints of proteins, (ii) sample desalting using C18 phase, (iii) peptide analysis using a procedure adapted for low sample amounts based on nanochromatography separation hyphenated with high resolution mass spectrometry, (iv) protein identification using bioinformatic tools, and (v) search for specific peptides using alignment tools pointing out similarities between a given sequence and all the sequences of a database. Steps i to v are described in details in the Supporting Information. Indeed, a peptide sequence present in only one protein and one species may be considered specific of the corresponding species. This uniqueness was checked on all identified peptides using two orthogonal approaches: first, each sequence was searched using BLASTp tool for identifying the aligned sequence on the nonredundant protein database (nr databank), and then each peptide that was found unique was checked using the full NCBI protein database using a homemade parser based on BioPython. The analyses of the five glue samples resulted in the identification of several collagen proteins as detailed below.

Samples from Bovine Species. Collagen type I (collagen $\alpha 1$ type I (CO1A1_BOVIN) and collagen $\alpha 2$ type I (CO1A2_BOVIN)) found in tendons, skin, artery walls, bones, and teeth, is the most abundant collagen in vertebrates; it was identified in bookbinder, hide, and bone glues. Collagen $\alpha 1$ type III (CO3A1_BOVIN) was identified in bookbinder and hide glue samples. Taking example of collagen $\alpha 2$ type I identified in bookbinder glue sample, 20 peptides of this protein were identified among which seven are specific of the bovine species (see Table 1, entries a, b, d–h for peptide sequences). It can be noted that almost all of the identified peptides have a high content of hydroxyprolines (noted **P** in this manuscript) instead of prolines; this particularity is specific to collagen and is regularly used to quantify these proteins.³⁹ Hydroxylysine (noted **K**) was also found but with a lower frequency.

For the bone and hide glues, respectively, three and eight specific peptides of this protein were counted (Table 1, entries a, d–e, and a–h, respectively). As example, the MS/MS spectrum shown in Figure S-1 (in Supporting Information) was obtained from the hide glue sample and allowed the identification of the specific peptide GSTGEIGPAGPPPPGLR in position 380–397 from bovine collagen $\alpha 2$ type I with the set of y_4^+ to y_{16}^+ ions and the b_5^+ ion. Concerning bovine collagen type III (CO3A1), two specific peptides were identified for bookbinder and hide glue samples (Table 1 entries i and j). The results obtained prove that the samples analyzed are from bovine origin and the information given by the retailer is correct.

Sample from Rabbit Species. Concerning rabbit species, only one rabbit collagen protein is fully sequenced until now: the collagen $\alpha 2$ type I (CO1A2_RABIT). Rabbit collagen $\alpha 1$ type I was not fully sequenced yet, and only one fragment constituted of

Table 1. Specific Peptides of Collagen Proteins Identified for the Five Standard Glue Samples^a

entries	proteins	taxonomies	protein id. numbers	specific peptides	positions	A	B	C	D	E	
a	collagen alpha-2(I) chain precursor	<i>Bos taurus</i> (bovine)	P02465 (CO1A2_BOVIN)	GSTGEIGPAGPPPPGLR	380–397	x	x	x			
b				GPAGPPPPGLR	386–397	x	x				
c				GEQGPAGPPGQGLPFPAGTAGAAGKPFGER	542–571	x	x				
d				GIPGEGPLPAGAR	572–586	x	x	x			
e				GPSGPPDGNKGEHPVVGAPGTAGPSGSPGLPGER	608–643	x	x	x			
f				GYPGNAGPVGAAAGAPGPPQVPVGVK	947–972	x	x	x			
g				GEFPAGAVGAVGAVGPR	977–994	x	x	x			
h				IGQPAGVGPAGIR	1066–1078	x	x	x			
i	collagen alpha-1(III) chain	<i>Bos taurus</i> (bovine)	P04258 (CO3A1_BOVIN)	GAFGEKEGEGPAAAGPAGGSGPAGPPGQGVK	672–704	x	x				
j				GAFPGPPGAPGLIAGLTCAR	777–800	x	x				
k	collagen alpha-2(I) chain precursor	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (rabbit)	Q28668 (CO1A2_RABIT)	GLFGVAGALGEPGLGIAGPPGAR	43–66			x			
l				GEFPAGSIVGAAAGR	139–156				x		
m	collagen alpha-2(I) chain precursor	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (rainbow trout; salmo gairdneri)	O93484 (CO1A2_ONCMY)	GQPCNIGFPGPK	481–492					x	
n				GEQGPAGAPGQGLPFPAGPAGEAGK	538–563						x
o				GPSGERGEGPAGLPGFAGPPGSDGQSGPR	703–732						

^a Samples: (A) bookbinder glue (63060); (B) hide glue (63020); (C) bone glue (63000); (D) rabbit skin glue (63028); (E) salianski isinglass (63110). Experimental details are presented in the Supporting Information (Tables S-1 to S-5).

53 amino acids is available in the Swiss-Prot and Uniprot databases. Other rabbit collagen proteins were sequenced (collagen type IV, VIII, or XII), but these proteins are not skin constituents and therefore are not expected to be identified in rabbit skin glues. In spite of the small number of rabbit collagen proteins available in the proteomic database, two specific peptides of rabbit collagen $\alpha 2$ type I were identified for the sample of rabbit skin glue (reference 63028): the peptides GLPGVAGALGEPG \underline{P} LG \underline{I} AGPPGAR and GEPGPAGSIGPVGAAGPR, respectively, in position 43–66 and 139–156 (Table 1, entries k and l). The identification of these peptides proves that the analyzed glue is of rabbit origin.

Sample from Fish Species. For the sample of Salianski isinglass (63110) made with sturgeon bladder, protein identification was realized by sequence homology to other fish species due to the lack of sturgeon proteins in the proteomic databases. At the moment, only six fish collagens including three different fish species are listed in the SwissProt database (release 2011_08), and among them, only one protein is a collagen type I: the collagen $\alpha 2$ type I of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (CO1A2_ONCMY). Three peptides of collagen $\alpha 2$ type I from rainbow trout were identified (Table 1, entries m, n, and o). These peptides are not present in collagens from other species and, consequently, are considered as fish-specific. As an example, the MS/MS spectrum (Figure S-2, Supporting Information) obtained for the sturgeon glue sample led to the identification of the sequence GQPGNIGFPGPK present in position 481–492 in the collagen $\alpha 2$ type I from the rainbow trout using y ions from y_4^+ to y_{10}^+ and ions b_6^+ and b_7^+ . Due to the lack of collagen from different fish species in the database, the exact origin of fish glue cannot be determined. Nevertheless, specific peptides were identified by sequence homology with the rainbow trout proving the fish origin of this Salianski isinglass.

Animal Glue Origin Authentication. *Commercially Available Animal Glues.* The developed approach was applied to four different samples of rabbit skin glue referenced PN03, PN04, PN05, and PN06 with the intention to check the information given by the retailer. The results obtained show that three specific peptides of rabbit collagen $\alpha 2$ type I (CO1A2_RABIT) were identified in samples PN03 and PN04: the sequences GLPGVAGALGEPG \underline{P} LG \underline{I} AGPPGAR (position 43–66), GYPGNAGPVGAAGA \underline{P} GPQGSVGP \underline{T} GK (position 109–134), and GEPGPAGSIGPVGAAGPR (position 139–156). These results prove that both samples PN03 and PN04 are rabbit skin glues. However, in sample PN05, no peptide belonging to rabbit collagen was identified despite the information given by the retailer. Nevertheless, several bovine collagen proteins including specific peptides were identified. Indeed, 10 peptides specific to bovine collagen type I (CO1A2_BOVIN) and five peptides characteristic to bovine collagen type III (CO3A1_BOVIN) were found. In particular, the MS/MS spectrum presented in Figure S-3 (Supporting Information) allowed the identification of the peptide GAPGPQGGP \underline{P} AP \underline{P} GLGIAGLTGAR with b ions b_5^+ , b_6^+ , b_7^+ , b_9^+ , b_{10}^+ , b_{11}^+ , b_{13}^+ , and b_{15}^+ to b_{17}^+ and with y_4^+ to y_{13}^+ ions and y_{15}^+ to y_{17}^+ ions. This peptide is present only in bovine collagen $\alpha 1$ type III (CO3A1_BOVIN position 777–800). This result shows that this modern skin glue sold as rabbit glue (sample PN05) is in reality bovine glue. Regarding the sample PN06, whose commercial provenance is unknown, no rabbit protein was identified but three bovine collagen proteins were found including nine specific peptides for collagen $\alpha 2$ type I

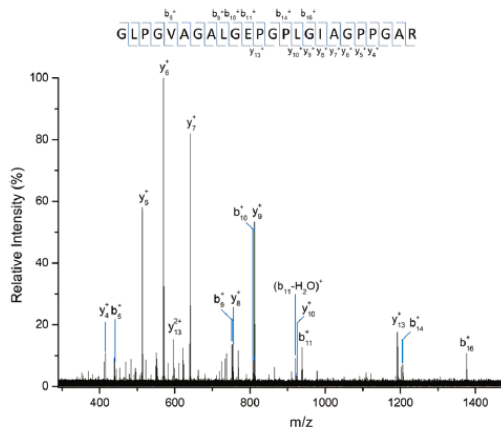


Figure 1. MS/MS spectrum of the triply charged ion at $m/z = 710.376$ ($\Delta m = 1$ ppm) from the hydrolyzed extract of the sample coming from “Maison Totin-Frères” and presenting the y and b fragments of the peptide sequence GLPGVAGALGEPG \underline{P} LG \underline{I} AGPPGAR specific to the collagen $\alpha 2$ type I from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Detailed data (peptide and fragment ions Δm) are given in the Supporting Information (Figure S-6).

protein (CO1A2_BOVIN) and two specific peptides for collagen type III (CO3A1_BOVIN), indicating that this sample is from bovine and not from rabbit origin.

Hundred-Year-Old Famous Totin “Colle à Doreurs”. The manufacture “Maison Totin Frères” (France) deposited in 1868 a patent related to the production of rabbit skin glue.³⁸ This rabbit skin glue named “Colle à Doreurs” was very famous among restorers and gilders. The sample analyzed was estimated to be at least 100 years old. The analytical methodology was applied to a 50 μg sample of “binder for gilder” (estimated). The analysis resulted in the identification of two rabbit collagen-specific peptides: the sequences GLPGVAGALGEPG \underline{P} LG \underline{I} AGPPGAR and GEPGPAGSIGPVGAAGPR, respectively, in position 43–66 and 139–156 in the rabbit collagen $\alpha 2$ type I (CO1A2_RABIT). As shown Figure 1, the MS/MS spectrum generated led to the identification of the peptide in position 43–66 of rabbit collagen. The complete set of y_4^+ to y_{10}^+ ions and both y_{13}^+ and y_{13}^{2+} ions were successfully identified. Concerning the series of b ions, six ions including b_5^+ , b_9^+ to b_{11}^+ , b_{14}^+ , and b_{16}^+ were identified. This result shows that the proposed proteomic method is adapted to ancient samples stored without particular precautions and that the methodology is efficient even on proteins from sample damaged owing to conservation conditions.

Species Identification of Glues Included in Model Paints.

To evaluate the developed methodology on more complex samples, model paints composed of animal glue, lead white and linseed oil were investigated. Consequently, a supplementary step consisting in the protein extraction was necessary; the extraction was performed using water acidified with 1% TFA according to previously published protocols.³⁰ To mimic the analysis of a precious ancient sample, the amount of sample analyzed was limited to 200 μg (see Experimental Section).

Paintings Including Animal Glue from Bovine Origin. In the model paintings including bovine glue as binder (bookbinder glue, bone glue, and hide glue), both collagen type I proteins (CO1A1 and CO1A2_BOVIN) were identified. Collagen type

III protein (CO3A1_BOVIN) was also identified except for bone glue painting. More precisely, six specific peptides of bovine collagen $\alpha 2$ type I were identified for the samples of bookbinder glue and hide glue paintings while two were identified for bone glue painting. Two specific peptides of bovine collagen $\alpha 2$ type I were identified in all samples: the sequences GIPGEFGLPGPA-GAR and IGQPGAVGPAGIR, respectively, in position 572–586 and 1066–1078. Concerning the bovine collagen $\alpha 1$ type III (CO3A1_BOVIN), specific peptides were found only in the bookbinder glue painting. Despite the intrinsic complexity of the samples and the low amount analyzed, results obtained from model paintings are similar to those obtained for standard glues, which means that the proteomics approach developed in this work is well-adapted to different kind of samples, including complex matrix as paintings.

Paintings Including Animal Glue from Rabbit Origin. A model painting including rabbit skin glue (PN04) was also prepared. Indeed, previous results show that, unlike bovine collagens, only few rabbit specific peptides were identified, owing to the small number of rabbit collagens fully sequenced and present in the proteomic databases. As a consequence, it was interesting to evaluate the methodology on such a sample. Two rabbit collagen-specific peptides were successfully identified: the sequences GLPGVAGALGEPGLGIAGPPGAR in position 43–66 and GEPGPAGSIGPVGAAGPR in position 139–156 in rabbit collagen $\alpha 2$ type I (CO1A2_RABIT). Figure S-4 (Supporting Information) shows the MS/MS spectrum which led to the identification of the peptide GEPGPAGSIGPVGAAGPR in position 139–156 in the rabbit collagen $\alpha 2$ type I using the complete set of y ions y_3^+ to y_{16}^+ .

Paintings Including Animal Glue from Fish Origin. Regarding the sample including Salianski isinglass as a binder, four fish-specific peptides, belonging to the collagen $\alpha 2$ type I of the rainbow trout (CO1A2_ONCMY) were identified. Among these peptides, two of them were already found in the standard Salianski isinglass sample: the peptides GEQGPAGAPGFQGLPGPAGPA-GEAGK and GPSGERGEGGPAGLPGFAGPPGSDGQSGPR, respectively, in position 538–563 and 703–732 (See Table 1, entries n and o). The two others peptides: GFPPTPLPGMK (position 160–171) and GAAGLPVAGAPGFPGPR (position 304–321) were identified for the first time.

Analysis of a 18th Century Gilt Sample. The developed methodology was applied to a gilt sample taken from a mascarón (Figures 2, left and medium panels) decorating a traverse arch located under the vault of the chancel of the St Maximin church located in Thionville (France). This church dates from the second part of the 18th century and has been listed as a French historical monument since 1984. Here, the gilding was applied on a stucco decor; this type of decoration was especially important during the Baroque and Rococo periods. The detailed observation of the sample (Figure 2, right panel) shows that above the plaster coating there is a reddish layer on which the gold leaf is deposited. There are three main techniques of laying gold onto a surface: oil gilding, water gilding, and ground gilding.⁴⁰ Oil gilding, also called mordant gilding, requires the use of “gold size”, a solvent-based adhesive containing oil and often resin. Gold size is applied on the ground, and gold leaves are laid on this surface. Ground gilding consists in applying gold leaf directly to the ground usually with egg white (glair) but animal glue and gum were also suggested. Water gilding, also called “gilding on bole”, is a more elaborate process. It consists in applying gesso to the substrate to produce a very fine smooth surface. An adhe-

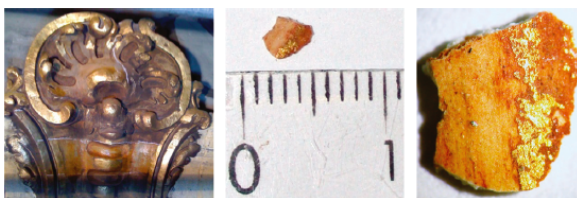


Figure 2. Left panel: picture showing the mascarón, the microsample was taken from the upper left part of the mascarón; middle panel: picture showing the size of the microsample analyzed (ruler scale in cm). Right panel: picture showing the red layer under the gold leaf.

sive layer usually made of bole (refined clay available in various colors) and glue (bovine or rabbit skin) is applied above this gesso coating and polished to a fine finish. Gold sheets are laid onto this surface and burnished using an agate stone or an animal tooth, this operation provides the gilded surface a brilliant and smooth effect. The reddish layer observed on the analyzed sample (Figure 2 right panel) corresponds to the bole and indicates that the gilding was performed using the water technique. Usually, analysis of gilt samples are focused on the identification of compounds used for the adhesive layer,^{6,41,42} the colored grounds⁴³ or the metal coating.⁴⁴ Here, our purpose was to apply the proteomic methodology previously described to identify the animal glue species employed in this gilt. Two analyses were performed on the ancient sample: (i) analysis of a piece of 50 μg of total sample (estimated) and (ii) analysis of the two main layers constituting this sample separately so that the binder of the plaster support could be distinguished from the adhesive gilding (amounts estimated less than 50 μg).

Concerning the analysis of the whole sample, several specific peptides for bovine collagens were identified (see table 2). For example, among the 28 peptides identified for the bovine collagen $\alpha 1$ type I (CO1A1_BOVIN), four peptides are species specific. In the previous analyses, no specific peptides were identified for this protein. Indeed, 41% protein sequence coverage was obtained in this ancient sample whereas a maximum of 32% was reached previously in the case of the cow hide glue reference sample. In total, eight specific peptides were identified for bovine collagen $\alpha 2$ type I (CO1A2_BOVIN) and one for bovine collagen $\alpha 1$ type III (CO3A1_BOVIN) (see table 2). Besides, collagen $\alpha 1$ type II (CO2A1_BOVIN) was also identified in the sample, but among the peptides identified for this protein, none was specific (data not shown). The analysis of a few micrograms of this ancient sample resulted in a set of ions with good signal-to-noise ratio; e.g. series of y_3^+ to y_{13}^+ ions shown in Figure S-5 (Supporting Information) led to the identification of the sequence GEPGPAGLPGPPGER in position 472–486 in the collagen $\alpha 1$ type I from bovine (CO1A1_BOVIN). The white plaster layer and a reddish powder corresponding to the bole were analyzed independently (see Experimental Section for details) and resulted in the identification of specific peptides of bovine collagens. For the plaster support, all the bovine collagen proteins identified in the entire gilt sample were retrieved (see table 2). Concerning the collagen $\alpha 2$ type I (CO1A2_BOVIN), two specific peptides that were not identified in the entire gilt sample were identified in the plaster: the peptides PQGLLGPAGFLGLPGSR and GYPGNAGPVGAAGAPGPQ-GPVGPK, respectively in position 861–877 and 947–972 (see Table 2). As for the whole gilt sample, no specific peptides

Table 2. Species Specific Peptides of Collagen Proteins Identified for the Gilt Sample Analyzed Entirely and the Different Layers Constituting This Sample Analyzed Separately^a

identified proteins	taxonomies	protein id.numbers	specific peptides			positions	A	B	C	
collagen alpha-1(I) chain precursor	<i>Bos taurus</i> (bovine)	P02453 (CO1A1_BOVIN)	GARGEPPAGLPPGPPGER			469–486	×			
			GEPGAGLPPGPPGER			472–486	×			
			GETGPAGRPEVGPAGKEKAGADGAPAGAPGTPGPGQGIAGQR			910–957	×			
			GAFGADGAPAGAPGTPGPGQGIAGQR			934–957	×			
			GPAGAPGTPGPGQGIAGQR			940–957	×			
collagen alpha-2(I) chain precursor	<i>Bos taurus</i> (bovine)	P02465 (CO1A2_BOVIN)	GLVGEPPAGSKESGKCEPGAVGQPPGSPGEEGKGR			341–379	×			
			GSTGEIGPAGPPGPPGLR			380–397	×		×	
			GEQGPAGPPGFQGLPGPAGTAGEAGKPPGER			542–571	×		×	
			GIPGEFLLPGPAGAR			572–586	×		×	
			GPSPPGPDGNKCEPGVWGAPGTAGSPGSPGLPGER			608–643	×			×
			SGETGASGPPGFVGEK			829–844				
			PQQLLGAPGFLGPPGSR			861–877			×	
			GYPGNAGPVGAAAPGPHQGPVGPVVK			947–972			×	
			GEPGAGAVGPAGAVGPR			977–994			×	
			IGQPGAVGPAGIR			1066–1078			×	
collagen alpha-1(III) chain	<i>Bos taurus</i> (bovine)	P04258 (CO3A1_BOVIN)	IGQPGAVGPAGIRG			1066–1079	×			
			GAPGQPPGAPGGLGIAGLTGAR			777–800		×		

^a Samples: (A) gilt sample; (B) plaster support; (C) upper layer (gilding bole and gold leaf). Experimental details are presented in the Supporting Information (Tables S-6 to S-8).

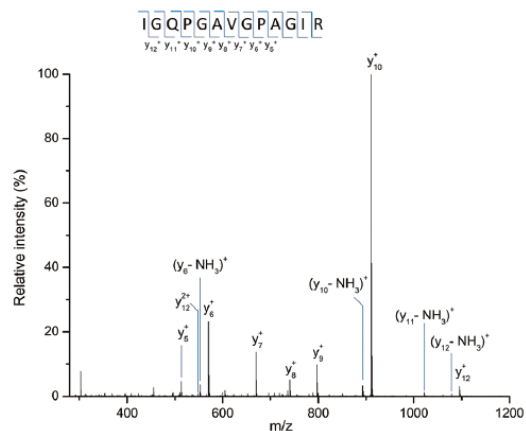


Figure 3. MS/MS spectrum of the doubly charged ion at $m/z = 604.841$ ($\Delta m = 1$ ppm) from the hydrolyzed extract of the upper layer of the gilt sample and presenting the y fragments of the peptide sequence IGQPGAVGPAGIR specific to the collagen $\alpha 2$ type I from bovine (*Bos taurus*). Detailed data (peptide and fragment ions Δm) are given in the Supporting Information (Figure S-7).

were identified for the collagen $\alpha 1$ type II (CO2A1_BOVIN). The analysis of the red layer allowed the identification of three bovine collagens despite the small sample amount available for the analysis owing to the thinness of this layer (Table 2). In this case, collagens $\alpha 1$ type I (CO1A1_BOVIN) and type II (CO2A1_BOVIN) were identified but with peptides common to other species and five specific peptides were found for collagen $\alpha 2$ type I (CO1A2_BOVIN). For example, the MS/MS spectrum shown in Figure 3 allowed the identification of the peptide IGQPGAVGPAGIR in position 1066–1078 in the collagen $\alpha 2$ type I from *Bos taurus* (CO1A2_BOVIN) using the set of y_5^+ to y_{12}^+ ions. These results show that, despite the low amount of sample analyzed, the developed methodology succeeded in identifying the origin of the animal glue used for the making of this gilt. Bovine glue was used for the preparation of the plaster support but also as adhesive for the metal leaf, which is quite surprising because ancient treatises recommend the use of rabbit skin glue owing to its better adhesive properties.⁴⁵

CONCLUSION

This work shows the efficiency of the optimized proteomic approach based on nanoLC, nanoESI high resolution MS, and MS/MS regarding the discrimination between collagens from different animal species. The methodology, first developed on standard commercially available animal glues, was applied to the species authentication of several commercial samples. The results obtained showed that among these samples two were actually bovine glue instead of rabbit glue as indicated by supplier. Moreover, a 100 year-old sample from famous Totin “Colle à Doreurs” was analyzed according to the developed procedure and rabbit-collagen-specific peptides were identified. More interestingly, it was demonstrated that the methodology is well-adapted to complex samples containing a low amount of protein such as paintings. Finally, the methodology was successfully applied to a gilt sample dating from the 18th century, showing that glue from bovine origin was used for the preparation of the plaster support and also as adhesive for the gold leaf. It can be concluded that the

proposed proteomic technique represents a powerful tool for accurate identification of the origin species of animal glues.

■ ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: Caroline.Tokarski@univ-lille1.fr.

■ ACKNOWLEDGMENT

This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche ANR-08-JCJC-0082-01. The mass spectrometry facilities used for this study are funded by the European community (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France), the IBISA (Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie) network, the CNRS, the Université Lille 1 Sciences et Technologies, and the TGE FTICR. The authors thank Dr. Maria van Agthoven for her help with editing this manuscript.

■ REFERENCES

- Gettens, R. J.; Stout, G. L. *Painting materials: a short encyclopedia*; Courier Dover Publications: New York, 1966.
- Mills, J. S.; White, R. *The organic chemistry of museum objects*, 2nd Ed.; Butterworth-Heinemann: London, 1994.
- Thompson, D. V. *The practice of tempera painting*; Courier Dover Publications: New York, 1962.
- Castellani, L.; Ferrantelli, P.; Sinibaldi, M.; Vigliano, G. *J. Cult. Herit.* **2001**, *2*, 209–215.
- Carvalho, A. P.; Vaz, M. F.; Ferreira, M. M.; Pires, J. *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 1653–1658.
- Katsibiri, O.; Boon, J. J. *Spectrochim. Acta, Part B: At. Spectrosc.* **2004**, *59*, 1593–1599.
- Thompson, D. V. *The materials and techniques of medieval painting*; Courier Dover Publications: New York, 1956.
- Chiavari, G.; Gandini, N.; Russo, P.; Fabbri, D. *Chromatographia* **1998**, *47*, 420–426.
- Colombini, M. P.; Giacomelli, R. F., A.; Muscatello, B. *Stud. Conserv.* **1998**, *43*, 33–41.
- Schneider, U.; Kennidler, E. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **2001**, *371*, 81–87.
- Colombini, M. P.; Modugno, F. *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 147–160.
- Peris-Vicente, J.; Gimeno Adelantado, J. V.; Carbó, M. T. D.; Castro, R. M.; Reig, F. B. *Talanta* **2006**, *68*, 1648–1654.
- Příkryl, P.; Havlíčková, L.; Pacáková, V.; Hradilová, J.; Štulík, K.; Hofta, P. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 2653–2663.
- Colombini, M. P.; Gautier, G. GC/MS in the Characterisation of Protein Paint Binders. In *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*; Colombini, M. P., Modugno, F., Eds.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2009; pp 237–259.
- Fremout, W.; Dhaenens, M.; Saverwyns, S.; Sanyova, J.; Vandenaabeele, P.; Deforce, D.; Moens, L. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *658*, 156–162.
- Fremout, W.; Sanyova, J.; Saverwyns, S.; Vandenaabeele, P.; Moens, L. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 1991–1999.
- Eastoe, J. *Biochem. J.* **1955**, *61*, 589–600.
- Eastoe, J. *Biochem. J.* **1957**, *65*, 363–368.
- Cartechini, L.; Vagnini, M.; Palmieri, M.; Pitzurra, L.; Mello, T.; Mazurek, J.; Chiari, G. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 867–876.
- Arslanoglu, J.; Schultz, J.; Loike, J.; Peterson, K. *J. Biosci.* **2010**, *35*, 3–10.
- Albertini, E.; Raggi, L.; Vagnini, M.; Sassolini, A.; Achilli, A.; Marconi, G.; Cartechini, L.; Veronesi, F.; Falcinelli, M.; Brunetti, B.; Miliani, C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *399*, 2987–2995.
- Kuckova, S.; Nemeč, I.; Hýnek, R.; Hradilova, J.; Grygar, T. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 275–282.
- Buckley, M.; Collins, M.; Thomas-Oates, J.; Wilson, J. C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 3843–3854.
- Richter, K. K.; Wilson, J.; Jones, A. K. G.; Buckley, M.; van Doorn, N.; Collins, M. J. *J. Archaeol. Sci.* **2011**, *38*, 1502–1510.
- Tran, T.-N.-N.; Aboudharam, G.; Gardeisen, A.; Davoust, B.; Bocquet-Appel, J.-P.; Flaudrops, C.; Belghazi, M.; Raouf, D.; Drancourt, M. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e17319.
- Zhang, G.; Sun, A.; Li, W.; Liu, T.; Su, Z. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1114*, 274–277.
- Pataridis, S.; Eckhardt, A.; Mikulíková, K.; Sedláková, P.; Mikšík, I. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 3483–3488.
- Zhang, G.; Liu, T.; Wang, Q.; Chen, L.; Lei, J.; Luo, J.; Ma, G.; Su, Z. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 2001–2007.
- Tokarski, C.; Martin, E.; Cren-Olivé, C.; Rolando, C. Protein studies in the Cultural Heritage. In *Molecular Biology and Cultural Heritage*; Saiz-Jimenez, C., Ed. Taylor & Francis: Oxford, 2003; pp 119–130.
- Tokarski, C.; Martin, E.; Rolando, C.; Cren-Olivé, C. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1494–1502.
- Fremout, W.; Dhaenens, M.; Saverwyns, S.; Sanyova, J.; Vandenaabeele, P.; Deforce, D.; Moens, L. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *658*, 156–162.
- Leo, G.; Cartechini, L.; Pucci, P.; Sgamellotti, A.; Marino, G.; Birolo, L. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 2269–2280.
- Leo, G.; Bonaduce, I.; Andreotti, A.; Marino, G.; Pucci, P.; Colombini, M. P.; Birolo, L. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2056–2064.
- Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.; Emmett, M. R.; Rodgers, R. P.; Blakney, G. T.; Nilsson, C. L. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2007**, *13*, 57–59.
- Solazzo, C.; Fitzhugh, W. W.; Rolando, C.; Tokarski, C. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4590–4597.
- Dallongeville, S.; Garnier, N.; Casasola, D.; Bonifay, M.; Rolando, C.; Tokarski, C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *399*, 3053–3063.
- Gettens, R. J.; Kühn, H.; Chase, W. T. *Stud. Conserv.* **1967**, *12*, 125–139.
- Totin, M. M. 80821 Brevet de 15 ans, Fabrication de la colle sèche dite colle à doreurs. In *Catalogue des brevets d'invention pris du 1er janvier au 31 décembre 1868*, Ministère de l'Agriculture, Ed.; Imprimerie et librairie de Mme V. Bouchard-Huzard, rue de l'éperon 5: Paris, 1869; p 161.
- Colgrave, M. L.; Allingham, P. G.; Jones, A. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1212*, 150–153.
- Mactaggart, P.; Mactaggart, A. *Practical gilding*; Archetype Publications: London, 2002.
- Fedrico, M. A.; Favaro, M.; Traldi, P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 2203–2209.
- Katsibiri, O.; Howe, R. F. *Microchem. J.* **2010**, *94*, 83–89.
- Sansonetti, A.; Striova, J.; Biondelli, D.; Castellucci, E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 2667–2676.
- Ortega-Feliu, I.; Moreno-Suárez, A. I.; Gómez-Tubío, B.; Ager, F. J.; Respaldiza, M. A.; García-Dils, S.; Rodríguez-Gutiérrez, O. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **2010**, *268*, 1920–1923.
- Haney, J. *The Gilder's manual: a complete practical guide to gilding in all its branches: designed for all trades in which gilding is used including silvering: together with picture framing, picture repairing, and much other useful information, valuable receipts*; Excelsior Pub. House: New York, 1876; p 135.

Chapitre 4: Développement méthodologique pour l'analyse des résidus de protéines dans les amphores par protéomique

CHAPITRE 4: DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE POUR L'IDENTIFICATION DE RESIDUS DE PROTEINES DANS LES AMPHORES PAR PROTEOMIQUE

1. INTRODUCTION	- 195 -
1.1. LES AMPHORES: GÉNÉRALITÉS	- 195 -
1.2. L'ANALYSE DE RÉSIDUS ORGANIQUES ARCHÉOLOGIQUES	- 197 -
1.2.1. <i>Le concept de bio-marqueur archéologique</i>	- 198 -
1.2.2. <i>Les différentes formes de résidus organiques</i>	- 199 -
1.2.3. <i>Les techniques d'analyse basées sur la spectrométrie de masse</i>	- 200 -
1.3. LES BIO-MARQUEURS RELATIFS AUX PRODUITS MARINS.....	- 201 -
1.3.1. <i>Bio-marqueurs existants</i>	- 201 -
1.3.2. <i>Marqueurs peptidiques</i>	- 202 -
2. DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE SUR DES ECHANTILLONS DE POISSON ...	- 203 -
2.1. EXTRACTION PROTÉIQUE	- 203 -
2.1.1. <i>Conditions d'extraction évaluées</i>	- 203 -
2.1.2. <i>Extraction du matériel protéique de l'anchois</i>	- 203 -
2.1.3. <i>Extraction du matériel protéique de la bonite</i>	- 206 -
2.2. PEPTIDES SPECIFIQUES ET DISTINCTION ENTRE LES ESPECES	- 207 -
3. APPLICATION DE LA METHODOLOGIE SUR DES CERAMIQUES PREALABLEMENT IMPREGNEES DE CHAIR DE POISSON.....	- 214 -
3.1. CERAMIQUE IMPREGNEE D'UNE ESPECE DE POISSON	- 214 -
3.2. CERAMIQUE IMPREGNEE D'UN MELANGE D'ESPECES DE POISSON	- 218 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 223 -
ANNEXES	- 225 -

LISTE DES TABLES ET FIGURES

TABLE 4-1 : NOMBRE DE PROTÉINES IDENTIFIÉES PAR INTERROGATION DE LA BANQUE DE DONNÉES SWISSPROT EN FONCTION DES CONDITIONS D'EXTRACTIONS ÉVALUÉES.	- 205 -
TABLE 4-2 : PROTÉINES IDENTIFIÉES PAR HOMOLOGIE DE SÉQUENCE PAR INTERROGATION DE LA BANQUE DE DONNÉES SWISS-PROT POUR LES ÉCHANTILLONS DE TISSUS D'ANCHOIS FRAIS, D'ANCHOIS SEC ET DE BONITE (EXTRACTION PROTÉIQUE RÉALISÉE AVEC LA SOLUTION C : URÉE/THIOURÉE/DTT/CHAPS).	- 206 -
TABLE 4-3 : NOMBRE DE PROTÉINES IDENTIFIÉES POUR L'ÉCHANTILLON DE BONITE SÉCHÉE PAR INTERROGATION DE LA BANQUE DE DONNÉES SWISS-PROT EN FONCTION DES CONDITIONS D'EXTRACTIONS ÉVALUÉES.	- 207 -
TABLE 4-4 : SUBSTITUTIONS D'ACIDE AMINÉ IDENTIFIÉES POUR L'ANCHOIS ET LA BONITE CONCERNANT LA LOURDE CHAÎNE DE MYOSINE IDENTIFIÉE PAR HOMOLOGIE DE SÉQUENCE AVEC LA CARPE COMMUNE.	- 210 -
TABLE 4-5 : SUBSTITUTIONS D'ACIDE AMINÉ IDENTIFIÉES EN UTILISANT LES SPECTRES MS/MS DES ÉCHANTILLONS DE TISSU DE POISSON.	- 211 -
TABLE 4-6 : SUBSTITUTIONS D'ACIDE AMINÉ IDENTIFIÉES EN UTILISANT LES SPECTRES MS/MS DES ÉCHANTILLONS DE CÉRAMIQUES IMPRÉGNÉES.....	- 218 -
FIGURE 4-1 : MONT TESTACCIO, ROME.....	- 195 -
FIGURE 4-2 : TABLE DE DRESSSEL EXTRAITE DE: HEINRICH DRESSSEL, <i>CORPUS INSCRIPTIONUM LATINARUM</i> , BAND XV, BERLIN 1899	- 196 -
FIGURE 4-3 : DE GAUCHE À DROITE : ESTAMPILLE, GRAFFITO ET MARQUE PEINTE	- 197 -
FIGURE 4-4 : SPECTRE MS/MS DE L'ION DOUBLEMENT CHARGÉ À M/Z 775.40 DE L'EXTRAIT HYDROLYSÉ D'ANCHOIS FRAIS ET PRÉSENTANT LES FRAGMENTS B ET Y DE LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE VIDSMQGLDSEVR.	- 209 -
FIGURE 4-5 : SPECTRE MS/MS DE L'ION TRIPLEMENT CHARGÉ À M/Z 553.59 DE L'EXTRAIT HYDROLYSÉ DE BONITE SÉCHÉE ET PRÉSENTANT LES FRAGMENTS B ET Y DE LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE GHEDMKEQVAMVER.....	- 209 -
FIGURE 4-6 : SPECTRE MS/MS DE L'ION DOUBLEMENT CHARGÉ À M/Z 582.31 DE L'EXTRAIT HYDROLYSÉ D'ANCHOIS FRAIS ET PRÉSENTANT LES FRAGMENTS B ET Y DE LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE AVVDGAYEVIK.	- 212 -
FIGURE 4-7 : SPECTRE MS/MS DE L'ION DOUBLEMENT CHARGÉ À M/Z 651.35 DE L'EXTRAIT HYDROLYSÉ DE BONITE SÉCHÉE ET PRÉSENTANT LES FRAGMENTS B ET Y DE LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE QLEDDLVTLQK.....	- 213 -
FIGURE 4-8 : A) PHOTOGRAPHIE D'UN MORCEAU DE CÉRAMIQUE (40 X 25 MM) IMPRÉGNÉE D'ANCHOIS. B) PHOTOGRAPHIE D'UN FRAGMENT DE CÉRAMIQUE IMPRÉGNÉE (15 X 10 MM) DONT LA SURFACE A ÉTÉ GRATTÉE ET LAVÉE À L'EAU DÉSIONISÉE.....	- 214 -
FIGURE 4-9 : SPECTRE MS/MS DE L'ION DOUBLEMENT CHARGÉ À M/Z 687.34 DE L'EXTRAIT HYDROLYSÉ DE LA CÉRAMIQUE IMPRÉGNÉE D'ANCHOIS ET PRÉSENTANT LES FRAGMENTS B ET Y DE LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE VAEQELVDVSER-	- 215 -
FIGURE 4-10 : SPECTRE MS/MS DE L'ION DOUBLEMENT CHARGÉ À M/Z 761.44 DE L'EXTRAIT HYDROLYSÉ DE LA CÉRAMIQUE IMPRÉGNÉE DE BONITE ET PRÉSENTANT LES FRAGMENTS B ET Y DE LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE IAYLLGLNSADMLK.	- 216 -
FIGURE 4-11 : SPECTRE MS/MS DE L'ION DOUBLEMENT CHARGÉ À M/Z 539.77 DE L'EXTRAIT HYDROLYSÉ DE LA CÉRAMIQUE IMPRÉGNÉE D'ANCHOIS ET PRÉSENTANT LES FRAGMENTS B ET Y DE LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE AFEIIDQDK.	- 217 -

FIGURE 4-12 : SPECTRE MS/MS DE L'ION DOUBLEMENT CHARGÉ À M/Z 687.35 DE L'EXTRAIT HYDROLYSÉ DE CÉRAMIQUE IMPRÉGNÉE D'UN MÉLANGE ANCHOIS / BONITE ET PRÉSENTANT LES FRAGMENTS B ET Y DE LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE VAEQELVDVSR - 220 -

FIGURE 4-13 : SPECTRE MS/MS DE L'ION DOUBLEMENT CHARGÉ À M/Z 761.43 DE L'EXTRAIT HYDROLYSÉ DE CÉRAMIQUE IMPRÉGNÉE D'UN MÉLANGE ANCHOIS / BONITE ET PRÉSENTANT LES FRAGMENTS B ET Y DE LA SÉQUENCE PEPTIDIQUE IAYLLGLNSADMLK - 221 -

Chapitre 4: Développement méthodologique pour l'identification de résidus de protéines dans les amphores par protéomique

1. Introduction

1.1. Les amphores: généralités

Le terme grec « *amphoreus* » a donné le mot latin « *amphora* » qui signifie: « *que l'on porte par deux anses* ». Mentionnées par le poète Homère, les amphores sont apparues dans le monde grec dès le VIème siècle avant J-C. Une amphore est un vase en terre cuite, fabriqué avec de l'argile et de l'eau et utilisé pour le transport et le stockage de nombreux produits, principalement des produits alimentaires tels que le vin, l'huile, le poisson en saumure, les olives, le miel, les fruits secs (amandes, dattes...), etc. L'amphore était donc le conditionnement d'un grand nombre de produits appelés à circuler par voie terrestre, fluviale et maritime. Elle est parfois réutilisée: soit broyée afin d'entrer dans la composition du mortier au tuileau romain, soit telle quelle comme canalisation ou pour ménager un vide sanitaire mais le plus souvent elle est jetée dès que son contenu est consommé: c'est ainsi que s'est formé le *mont Testaccio* à Rome, résultant de l'accumulation de débris d'amphores.



Figure 4-1: Mont Testaccio, Rome

(Source: <http://www.archaeospain.com/testaccio/>)

La première classification est l'œuvre de l'archéologue et épigraphiste allemand Heinrich Dressel (1845-1920) qui a rédigé une typologie recensant 45 types d'amphores romaines suite aux fouilles entreprises sur le mont *Testaccio*¹. Ces amphores, dites Dressel 1 à 45, sont datées entre le I^{er} siècle avant J-C et le IV^{ème} siècle après J-C. Elles ont été classées en fonction de leur contenu, leur origine, et leur époque de fabrication. On distingue 3 grandes sortes d'amphores: les amphores à vin, les amphores à huile et les amphores à salaisons et sauces de poisson (*garum*, *hallec*, *muria*, *liquamen*). Cette classification a été complétée et remaniée au fil du temps. En particulier Pélichet ajoute les types 46 à 49 en 1947, Almagro (1955) ajoute les types 50 à 57 et subdivise le type 26 (a et b) et le type 27 (a à c), Beltran fait la typologie générale des amphores espagnoles en 1970 alors que Keay crée 93 types en 1984². Au total, après la publication de Dressel, on a subdivisé (ex. Dressel 1 a, 1 b, 1 c), regroupé (ex. Dressel 2-4, Dressel 7-11) et surtout complété par de nouveaux types dénommés selon des noms d'auteur (Pélichet, Almagro, Beltran, Pascual, Lamboglia), de site (Haltern, Oberaden, Pompei) ou d'aire culturelle (Gauloise, Africaine, Massaliote, Byzacène).

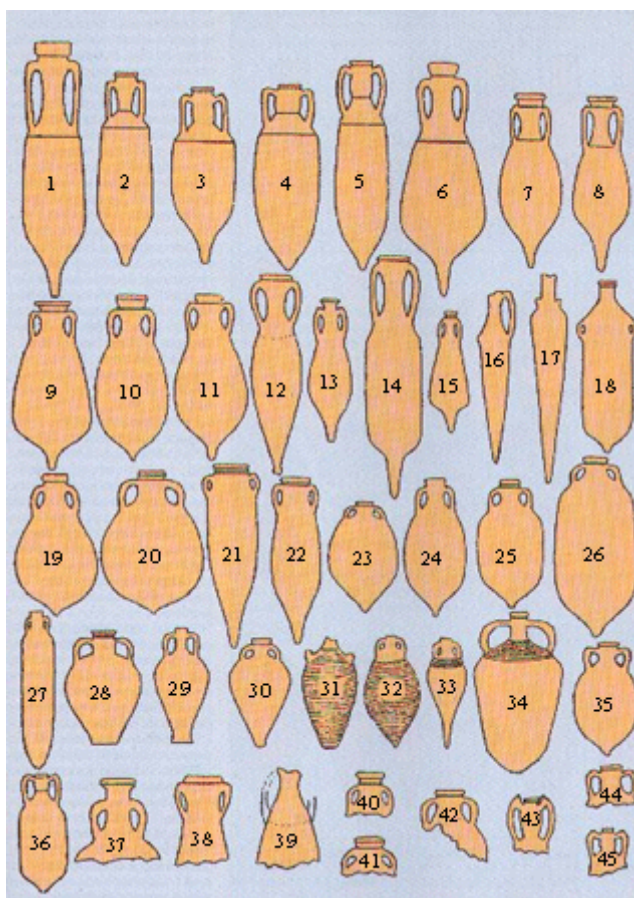


Figure 4-2: Table de Dressel extraite de:
Heinrich Dressel, *Corpus Inscriptionum Latinarum*, band XV, Berlin 1899

L'intérêt archéologique pour les amphores est dû à 3 facteurs principaux. Tout d'abord les amphores bénéficient d'un bon état de conservation. Effectivement, comme toutes les terres cuites elles se dégradent peu et même cassées elles gardent leur intérêt puisque de nombreuses informations peuvent être obtenues à partir des tessons. Ensuite, les amphores présentent des formes spécifiques qui dépendent de 3 variables : le contenu, la région de production et l'époque de production. Enfin, des inscriptions sont généralement trouvées sur les amphores. Il en existe 3 types : les estampilles imprimées dans la pâte avant cuisson qui sont les marques de l'atelier de production de l'amphore, les graffiti, généralement gravés sur la poterie à l'aide d'un outil, où encore au doigt, et ce, avant ou après cuisson de l'amphore et les marques peintes après cuisson par les commerçants. Ces différents éléments permettent d'obtenir des renseignements sur l'artisan ayant façonné l'amphore, le commerçant, et parfois d'autres mentions font état de la contenance de l'amphore et de son lieu d'origine.



Figure 4-3: De gauche à droite : estampille, graffiti et marque peinte
(Source: http://www.cealex.org/sitecealex/amphores/amphores_F.htm)

L'amphore est donc un excellent marqueur archéologique et représente un instrument de mesure privilégié du commerce antique³. Toutefois, même si leur typologie et leur lieu de production sont de mieux en mieux connus⁴, de nombreuses incertitudes subsistent quant à la nature de leurs divers contenus⁵, conduisant parfois à des interprétations erronées sur les proportions des différentes denrées échangées (huile, vin, salaisons de poissons). Les approches traditionnelles (forme, épigraphie, contexte économique de la région d'origine, situation des ateliers, présence ou non d'un revêtement intérieur de poix) ne parviennent plus à résoudre ces problèmes et le recours à l'analyse chimique des résidus organiques présents dans l'amphore s'avère nécessaire.

1.2. L'analyse de résidus organiques archéologiques

L'analyse de résidus organiques archéologiques représente un véritable challenge analytique pour deux raisons principales. D'une part, ces résidus sont souvent des mélanges

complexes composés de différentes substances et, d'autre part, les conditions de conservation des objets archéologiques, souvent enfouis sous terre depuis des siècles, dégradent la matière organique préservée dans ces objets ce qui en rend l'analyse assez compliquée. Afin d'identifier les différentes structures moléculaires présentes dans les résidus organiques archéologiques, l'utilisation de méthodes chromatographiques et/ou de spectrométrie de masse sont impératives. L'analyse de résidus organiques archéologiques a donc connu un véritable essor dans la seconde moitié du 20^{ème} siècle grâce aux avancées techniques qui ont été réalisées en matière d'instrumentation. En particulier, l'émergence de nouvelles techniques analytiques telles que les méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse, offrant la possibilité de séparer et de caractériser différentes molécules présentes au sein d'un même échantillon, a ouvert la voie à ce type d'analyses, désormais considérée comme une véritable discipline.

1.2.1. Le concept de bio-marqueur archéologique

En 2008, le concept de « bio-marqueur archéologique » est proposé par Evershed ⁶ pour définir toutes les substances retrouvées dans les résidus organiques et fournissant des informations sur les activités humaines passées. Ce concept peut être appliqué à toutes les classes de biomolécules (lipides, ADN, protéines, etc.). Toutefois, dans certains cas, la structure entière de la molécule n'est pas conservée et les bio-marqueurs associés prendront la forme de fragments. Par exemple, en ce qui concerne les protéines anciennes, les bio-marqueurs seront principalement des peptides ou des acides aminés.

Parmi ces bio-marqueurs archéologiques, certains ont été largement étudiés au cours des dernières années et parfois l'identification d'un seul constituant suffit pour retrouver le composé d'origine. C'est le cas par exemple des di- et tri- terpènes, leur seule identification témoigne de la présence de résine dans les résidus organiques archéologiques ^{7,8}. De la même manière, la cire d'abeille est facilement reconnaissable, notamment à cause du mélange caractéristique de composés aliphatiques la constituant ^{9,10}. D'autres composés tels que les graisses animales et les huiles végétales sont plus difficiles à caractériser. En effet, leurs constituants majeurs sont des triglycérides (également appelés triacylglycérols ou triacylglycérides ou TAG) mais ceux-ci ont tendance à s'hydrolyser laissant derrière-eux des acides n-alcanoïques ¹¹. La seule identification de ces acides n-alcanoïques n'est donc pas suffisante pour retrouver l'origine du composé initial. Le plus souvent, une analyse isotopique au carbone 13 est également effectuée et les informations paléo-environnementales sont prises en compte ¹²⁻¹⁴. En général, les structures moléculaires sont dégradées et on se retrouve dans

des cas de figures similaires au cas présenté précédemment. La capacité à identifier la source d'un résidu organique sur la base de ses structures altérées est donc un aspect primordial du concept de bio-marqueur archéologique. En conséquence, la connaissance des mécanismes chimiques et biochimiques impliqués dans la dégradation des biomolécules est nécessaire. En effet, la connaissance de ces mécanismes nous permet de savoir, par exemple, que les acides n-alcanoïques identifiés dans les résidus organiques archéologiques proviennent principalement des triglycérides, eux-mêmes issus de l'hydrolyse des graisses animales et/ou des huiles végétales. De la même façon, l'identification d'acides gras hydroxylés dans les résidus organiques archéologiques permet de retrouver de quels acides gras monoinsaturés ils dérivent. En effet, la position de deux groupes hydroxyles voisins est liée à la position d'origine de l'insaturation. Cette information combinée au nombre de carbones de l'acide gras permet de remonter à la source (animale ou végétale) et fournit donc des informations sur les ressources qui furent exploitées dans le passé ¹⁵.

En résumé, la seule identification des structures chimiques des composés présents dans les résidus organiques n'est pas suffisante et l'étude des mécanismes d'altération de ces biomolécules dus à leur exploitation par l'être humain ou à leur enfouissement sous terre pendant des siècles s'avère nécessaire pour révéler les ressources exploitées par nos ancêtres. Les résidus organiques retrouvés dans les poteries ou tout autre type de vaisselle archéologique constituent une véritable source d'informations concernant l'utilisation de la vaisselle, les activités économiques locales mais également les techniques de production employées.

1.2.2. Les différentes formes de résidus organiques

Les résidus organiques conservés dans les poteries archéologiques sont principalement retrouvés sous 3 formes :

- Les résidus d'origine préservés *in situ* (à ne pas confondre avec des résidus intrusifs provenant de l'enfouissement archéologique). Ce cas d'étude est relativement rare et jusqu'à présent seul l'exemple des vases funéraires antiques (retrouvés dans les tombes égyptiennes) peut être mentionné ¹⁶.
- Les résidus visibles apparaissant en surface à l'intérieur et/ou à l'extérieur de la vaisselle. Les résidus les plus couramment identifiés en poterie sont des particules de suie à l'extérieur et des résidus carbonisés à l'intérieur dont on suppose qu'ils proviennent principalement de la cuisson d'aliments, alors que dans les lampes les

résidus visibles retrouvés sont surtout des restes de combustibles ou de mèches qui ont brûlé à l'intérieur de celles-ci ¹⁷.

- Les résidus adsorbés sont invisibles à l'œil nu et sont préservés au sein même de la paroi du récipient. Cette dernière catégorie est de loin la plus commune en poterie et représente probablement le type de résidus le plus abondant. Ces résidus sont adsorbés soit par effet de la chaleur, soit par action mécanique entre la marchandise et la céramique constituant la poterie. Des expériences de laboratoire ont notamment contribué à comprendre les mécanismes d'adsorption des résidus et les mécanismes d'altérations associés à l'utilisation de la vaisselle ¹⁸.

Les investigations menées au cours des années précédentes ont montré qu'un grand nombre de produits provenant de continents différents ont été identifiés grâce à l'analyse chimique des résidus organiques archéologiques. On peut citer, entre autres, les huiles végétales, les graisses provenant d'animaux terrestres ¹⁹ mais également d'animaux marins ²⁰, les résines ²¹, les goudrons, les cires végétales, la cire d'abeille ²², l'huile de palmiste, le cacao ²³ ...

1.2.3. Les techniques d'analyse basées sur la spectrométrie de masse

Parmi les résidus identifiés, la détection de résidus issus du vin ou d'autres boissons alcoolisées a constitué un véritable challenge. L'identification de tels résidus a déjà été reportée à plusieurs reprises dans la littérature ^{24, 25}. Cependant, le travail récent de Stern ²⁶ montre l'importance d'utiliser des techniques de pointe afin d'identifier sans ambiguïté les traces de composés dérivant de résidus chimiquement complexes. Ainsi, différentes méthodes ont été testées afin de vérifier la présence d'acide tartrique et syringique dans des amphores et les meilleurs résultats ont été obtenus avec la méthodologie développée par Guasch-Jané *et al* ²⁷, qui utilise la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS-MS). Cette technique présentant une sélectivité et une sensibilité essentielle, avait permis la détection d'acide tartrique et syringique, deux biomarqueurs du vin, dans des échantillons archéologiques égyptiens.

Dès lors, les analyses basées sur la spectrométrie de masse pour identifier les résidus organiques archéologiques ont connu un véritable essor. Ces analyses offrent un avantage considérable car elles ne nécessitent pas de prétraitement de l'échantillon et sont réalisables sur de très faibles quantités de matière (de l'ordre du µg). Elles ont permis notamment d'identifier quel revêtement était utilisé pour enduire l'intérieur des amphores et les rendre

imperméables^{28, 29}. La spectrométrie de masse a été également utilisée pour identifier des triglycérides et a permis de différencier les TAG provenant du lait de ceux trouvés dans les graisses animales³⁰ mais également de mettre en évidence le type de combustible employé dans des lampes à huiles retrouvées sur le site archéologique d'Olbia (Ukraine) datant du 5^{ème} siècle avant J.C¹⁷.

Les progrès réalisés, d'une part, en matière d'instrumentation dans le domaine de la spectrométrie de masse et, d'autre part, en bioinformatique ont contribué à l'émergence de la protéomique. Cette discipline relativement nouvelle se consacre à l'étude des protéines et englobe un certain nombre de techniques différentes. Les protéines contenues en très faible quantité dans des matrices complexes sont extraites et leur analyse par spectrométrie de masse suivie de l'interrogation de banques de données spécifiques permet leur identification. La protéomique est donc parfaitement adaptée à l'analyse de protéines conservées dans les résidus archéologiques organiques. Les premiers résultats, montrant le potentiel de cette technique, ont été publiés par Solazzo et al. en 2008³¹. Des protéines conservées dans des tessons de poteries provenant d'Alaska ont été identifiées, dévoilant ainsi les habitudes alimentaires du peuple esquimau.

1.3. Les bio-marqueurs relatifs aux produits marins

1.3.1. Bio-marqueurs existants

Le poisson ou les salaisons de poisson étaient des marchandises fréquemment échangées dans le passé et jusqu'à présent un seul type de bio-marqueur de cette marchandise, provenant des résidus lipidiques a été mis en évidence²⁰. Les graisses et les huiles de poisson sont riches en acides gras polyinsaturés, contrairement aux graisses/huiles provenant d'animaux ou de plantes terrestres. En particulier, deux composés, l'acide icosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), faisant tous deux partie de la famille des oméga 3, seraient bénéfiques pour la santé. Cette différence de composition lipidique constitue un moyen de distinguer les deux types de denrées. Toutefois, les acides gras insaturés ont tendance à s'oxyder très facilement avec l'utilisation de la vaisselle ou l'enfouissement sous terre, ces composés sont donc difficilement retrouvés en quantité suffisante dans les résidus organiques archéologiques. Malgré cette difficulté, des molécules pouvant être des bio-marqueurs du poisson ont été identifiées récemment par Copley et al. L'analyse de résidus lipidiques, réalisée sur des poteries provenant de zones côtières du Brésil et d'Afrique du sud, a démontré que la présence d'acide phytanique (acide 3,7,11,15-tetraméthyl hexadécanoïque)

et de l'acide 4,8,12-triméthyl tridecanoïque (4,8,12-TMTD) dans des résidus organiques archéologiques était liée à la présence de produits marins. En effet, ces composés sont présents en forte concentration chez les animaux marins alors que chez les animaux terrestres leur concentration est très faible. De plus, ces composés n'ont jamais été détectés lors de l'analyse de résidus archéologiques provenant de poteries retrouvées à l'intérieur des terres (plusieurs milliers d'échantillons). D'autres molécules pourraient également suggérer la source marine de certaines marchandises. Il s'agit des acides ω -(*o*-alkyl phényl) alcanoniques contenant entre 16 et 20 atomes de carbone, dont la présence dans les résidus organiques archéologiques serait liée à la dégradation thermique (par température supérieure à 270°C) d'acides gras insaturés.

1.3.2. Marqueurs peptidiques

Nous proposons ici une approche complètement novatrice dans le domaine de l'analyse de résidus organiques archéologiques basée sur l'identification de marqueurs peptidiques. En l'occurrence, notre travail étant focalisé sur les bio-marqueurs de produits marins, nous nous intéressons ici aux marqueurs peptidiques spécifiques des protéines de poisson. Le concept de marqueur peptidique ayant été expliqué dans le chapitre précédent, nous ne reviendrons pas sur sa définition ici.

Ainsi, une méthodologie a été dans un premier temps développée sur des échantillons de poisson actuels : l'anchois et la bonite qui sont des espèces qui étaient déjà consommés par les civilisations anciennes. L'objectif consiste à mettre en évidence les protéines pouvant être extraites de ces échantillons et plus particulièrement d'identifier les peptides résultants de l'hydrolyse enzymatique de ces protéines. Parmi les peptides identifiés, ceux qui sont spécifiques aux espèces de poisson seront considérés comme des bio-marqueurs du poisson. Ainsi, cette première étape nous permet de réaliser une banque de données des bio-marqueurs du poisson pouvant être potentiellement retrouvés dans les céramiques archéologiques. Ensuite, afin d'évaluer la méthodologie sur une céramique contenant des résidus de poisson adsorbés, un tessou de céramique a été imprégnée avec de la chair de poisson pendant plusieurs mois. Avant l'analyse l'échantillon prélevé est lavé à de nombreuses reprises afin d'éliminer tout résidu visible et d'imiter au mieux un fragment de céramique archéologique. Cette seconde étape nous permet de prendre connaissance de la nature des protéines adsorbées sur la céramique et, de manière plus intéressante d'estimer les marqueurs peptidiques

retrouvés. Enfin, des échantillons d'amphores provenant de divers sites archéologiques et ayant été conservés dans diverses conditions ont été analysés en utilisant cette approche.

2. Développement méthodologique sur des échantillons de poisson

La méthodologie exposée ci-dessous a d'abord été développée et optimisée sur des espèces de poisson fréquemment trouvées dans le bassin Méditerranéen et connues pour avoir été consommées dans l'Antiquité soit l'anchois (*Engraulis encrasicolus*) et la bonite (*Sarda sarda*). L'objectif consiste à mettre en évidence les protéines pouvant être extraites de ces échantillons et plus particulièrement d'identifier les marqueurs peptidiques résultants de l'hydrolyse enzymatique de ces protéines.

2.1. Extraction protéique

2.1.1. Conditions d'extraction évaluées

La première difficulté de l'analyse protéomique consiste à trouver les meilleures conditions d'extraction des protéines. Afin d'atteindre cet objectif, différentes solutions d'extraction ont été testées. Une extraction douce a été réalisée en employant de l'eau acidifiée à 1% d'acide trifluoroacétique. Cette extraction a déjà été utilisée avec succès pour extraire les protéines présentes dans divers échantillons du patrimoine culturel. Ensuite différents tampons contenant de grandes quantités de dénaturants (urée, thiourée) et de détergents (SDS, CHAPS), qui sont des produits couramment utilisés en protéomique, ont été utilisés.

En résumé les solutions d'extraction testées sont :

- A : 99 % H₂O milliQ 1% TFA
- B : 1.5M Tris, 50mM DTT, 0,5% SDS pH=8,5
- C : 7M urée, 2M thiourée, 50mM Tris, 50mM DTT, 4% CHAPS pH=8,5
- D : 7M urée, 2M thiourée, 50mM Tris, 50mM DTT, 0.5% SDS pH=8,5

2.1.2. Extraction du matériel protéique de l'anchois

En premier lieu, les différentes solutions d'extraction ont été employées afin d'extraire le matériel protéique d'un échantillon d'anchois frais. Un morceau d'anchois frais a donc été broyé dans chacune des solutions décrites ci-dessus. L'extraction protéique a été réalisée suivant le protocole décrit dans la partie « matériels et méthodes ». Les protéines extraites ont ensuite été soumises à une hydrolyse enzymatique. Le mélange de peptides obtenu a été

analysé par spectrométrie de masse et le traitement des données à l'aide d'outils bioinformatiques a conduit à l'identification des protéines extraites de l'échantillon. Concernant ce point, il est important de préciser que peu de protéines de poisson sont présentes dans les banques de données protéomiques (ici Swiss-Prot). Par conséquent, l'interrogation des banques de données est réalisée sans restriction de taxonomie et l'identification des protéines est effectuée par homologie de séquence avec d'autres espèces de poisson. Le nombre de protéines identifiées permet de comparer l'efficacité des différentes solutions employées pour l'extraction protéique.

En ce qui concerne l'anchois frais, le plus grand nombre de protéines de poisson est identifiée avec la solution D (urée/thiourée/DTT/SDS) soit 11 protéines (voir table 4-1). Si nous nous intéressons aux protéines de poisson différentes, nous remarquons que les solutions d'extraction C (urée/thiourée/DTT/CHAPS) et D (urée/thiourée/DTT/SDS) conduisent au même résultat c'est-à-dire 5 protéines différentes identifiées. Il semble donc que ces deux solutions d'extraction aient une efficacité similaire.

Par ailleurs l'extraction du matériel protéique a également été effectuée sur un échantillon d'anchois sec. De l'anchois frais a été broyée à l'aide d'un mortier et d'un pilon et nous avons laissé sécher le broyat ainsi obtenu à l'air libre. Une dizaine de milligrammes d'anchois sec ont été soumis à l'extraction protéique et à l'hydrolyse enzymatique décrite dans la partie « matériels et méthodes ». Nous observons que dans le cas de l'anchois sec le plus grand nombre de protéines est identifié avec la solution C : 17 protéines de poisson ont été identifiées au total. Par contre, si nous nous focalisons sur le nombre de protéines de poisson différentes, nous remarquons que pour les solutions C et D le résultat obtenu est le même soit 7 protéines de poisson différentes identifiées.

Ces résultats nous permettent d'ores et déjà d'affirmer que les solutions A et B (eau acidifiée et solution contenant du DTT et du SDS respectivement) sont les solutions les moins efficaces quant à l'extraction du matériel protéique de l'anchois. Les solutions d'extraction fortement concentrées en urée et thiourée conduisent à des résultats semblables quelque soit le détergent utilisé (CHAPS ou SDS). Le CHAPS étant plus facile à éliminer que le SDS dans les échantillons, nous avons décidé d'utiliser la solution d'extraction C (urée/thiourée/DTT/CHAPS) dans la suite de ce travail.

Echantillon	Extraction	Nombre total de protéines identifiées	Nombre de protéines de poisson identifiées	Nombre de protéines de poisson différentes
Anchois frais	A: 99% H ₂ O 1% TFA	25	6	3
	B: SDS/DTT	40	8	4
	C: urée/thiourée/DTT/CHAPS	56	10	5
	D: urée/thiourée/DTT/SDS	81	11	5
Anchois sec	A: 99% H ₂ O 1% TFA	40	6	3
	B: SDS/DTT	23	6	4
	C: urée/thiourée/DTT/CHAPS	106	17	7
	D: urée/thiourée/DTT/SDS	93	12	7

Table 4-1: Nombre de protéines identifiées par interrogation de la banque de données SwissProt en fonction des conditions d'extractions évaluées

En ce qui concerne les protéines identifiées (table 4-2), celles-ci proviennent en majeure partie des cellules musculaires. Plus particulièrement, les protéines de myosine, de tropomyosine et d'actine, sont des protéines participant à la contraction musculaire. En effet, les muscles striés ont une structure remarquablement organisée basée sur la répétition d'un motif structural, appelé sarcomère, composé de deux sortes de filaments : les filaments fins et les filaments épais. Les filaments fins ont un diamètre d'environ 7 nm et sont constitués de plusieurs types de molécules telles que l'actine, la tropomyosine et la troponine alors que les filaments épais ont un diamètre d'environ 15 nm et sont essentiellement constitués d'une espèce moléculaire, la myosine II qui est une molécule allongée composée de deux chaînes lourdes (environ 200 kDa chacune) et de quatre chaînes légères (environ 20 kDa chacune). D'autres protéines identifiées parmi les protéines extraites sont également localisées dans les muscles mais jouent un rôle différent. Par exemple la parvalbumine est une protéine de liaison du calcium présente dans les muscles squelettiques jouant le rôle de tampon pour limiter l'augmentation du calcium libre cytosolique et favoriser la relaxation. Ainsi, les protéines les plus abondantes de la chair de poisson sont identifiées avec succès, indiquant que les conditions d'extraction employées sont optimales pour l'étude.

Nom de la protéine	Espèce de poisson	Poids moléculaire (Da)	Numéro d'accèsion de la protéine	Anchois frais	Anchois sec	Bonite
Myosin heavy chain, fast skeletal muscle	Common carp	221462	Q90339	x	x	x
Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform	Grey mullet	20054	P82159	x	x	x
Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform	Grey mullet	13658	P82160	x	x	x
Tropomyosin-1 alpha chain	Zebrafish	32703	P13104	x	x	x
	Golden grey mullet	32710	P84335	x	x	x
Actin, alpha anomalous	Japanese pufferfish	41952	P53483	x	x	
Actin, alpha skeletal muscle A	Japanese pufferfish	41918	P68140			x
Actin, cytoplasmic 1	Japanese pufferfish	41740	P68142			x
Parvalbumin alpha	Common carp	11444	P09227			x
Parvalbumin beta	Chub mackerel	11538	P59747	x	x	
	Common carp	11429	P02618	x	x	
	Atlantic cod	11544	Q90YK9		x	
	Alaska pollock	11500	Q90YK8		x	
Parvalbumin-2	Zebrafish	11615	Q9I8V0		x	
L-lactate dehydrogenase	Sea lamprey	36409	P33571		x	
L-lactate dehydrogenase A chain	White crocodile fish	36160	P69080	x		
	Patagonian blennie	36286	O93542	x	x	x
	Blackeye goby	36198	O93401			x
	Killifish	36311	Q92055		x	
Hemoglobin cathodic subunit alpha	Conger eel	15269	P83479		x	
Hemoglobin subunit beta-A	Five-ray yellowtail	16362	Q9PVM2		x	
Myoglobin	Sard	15787	Q9DGJ0			x
Creatine kinase, testis isozyme	Rainbow trout	42977	P24722			x
Keratin, type II cytoskeletal 8	Zebrafish	57723	Q6NWF6		x	
Troponin C, skeletal muscle	European freshwater eel	18120	P81660			x
Triosephosphate isomerase	Coelacanth	26715	P00941			x

Table 4-2: Protéines identifiées par homologie de séquence par interrogation de la banque de données Swiss-Prot pour les échantillons de tissus d'anchois frais, d'anchois sec et de bonite (extraction protéique réalisée avec la solution C : urée/thiourée/DTT/CHAPS)

2.1.3. Extraction du matériel protéique de la bonite

La méthodologie mise au point précédemment sur les échantillons d'anchois a été appliquée sur un échantillon de bonite qui a été séchée et salée selon une méthode traditionnelle

de conservation par un artisan espagnol. Comme pour l'anchois, l'identification des protéines a été réalisée par homologie de séquence avec d'autres espèces de poisson. L'extraction a été réalisée avec les solutions A, B et C afin d'effectuer une comparaison avec les résultats obtenus pour l'anchois.

Echantillon	Extraction	Nombre total de protéines identifiées	Nombre de protéines de poisson identifiées	Nombre de protéines de poisson différentes
Bonite séchée	A: 99% H ₂ O 1% TFA	22	6	4
	B: SDS/DTT	102	15	9
	C: urée/thiouree/DTT/CHAPS	107	14	9

Table 4-3: Nombre de protéines identifiées par interrogation de la banque de données Swiss-Prot en fonction des conditions d'extractions évaluées

Dans le cas de la bonite, le plus grand nombre de protéines de poisson est identifié avec la solution B (table 4-3). Cependant les solutions B et C permettent d'identifier le même nombre de protéines de poisson différentes. Cela montre une fois de plus que la solution C est l'une des solutions d'extraction les plus efficaces. La solution C ayant donné de bons résultats lors de l'extraction du matériel protéique de l'anchois et de la bonite, nous considérons cette solution comme étant la plus efficace et nous nous limiterons à son utilisation dans la suite de ce travail. Comme pour l'anchois, la majeure partie des protéines identifiées sont localisées dans les cellules musculaires. Nous pouvons noter que dans le cas présent la troponine qui est l'un des constituants des filaments fins des muscles striés est identifiée (table 4-2).

La méthode d'extraction du matériel protéique de poisson a donc été développée et optimisée sur des échantillons d'anchois frais et sec et appliquée avec succès sur un échantillon de bonite. Ces résultats montrent que la méthodologie mise au point est optimale pour l'étude. Les protéines étant identifiées grâce à la bioinformatique, nous allons désormais nous focaliser sur la recherche de peptides spécifiques aux protéines de poisson.

2.2. Peptides spécifiques et distinction entre les espèces

Les conditions d'extraction les plus efficaces étant déterminées, on cherche maintenant à identifier des peptides représentant des marqueurs spécifiques du poisson et pouvant ainsi être considérés, pour les futures études, comme des bio-marqueurs témoignant de la présence de poisson dans les amphores.

L'homologie de séquence entre 2 protéines d'espèces différentes est très grande. Il y a 97% d'homologie de séquence entre les protéines de myosine (chaîne lourde) de la carpe commune (*cyprinus carpio*) et de la carpe dorée (*hypophthalmichthys molitrix*). Ceci indique que

les protéines diffèrent seulement par quelques acides aminés dans leur séquence. En conséquence, seuls quelques peptides sont spécifiques d'une espèce et peuvent être utilisés comme marqueurs. Ainsi, pour chaque échantillon analysé, nous avons répertorié les séquences de peptides spécifiques au poisson (détaillées en annexe). Au total on dénombre 37 et 36 peptides spécifiques pour les échantillons d'anchois et de bonite respectivement. En regardant attentivement ces résultats, on remarque que certains peptides sont spécifiques d'une protéine mais communs à plusieurs espèces de poisson. Par exemple, le peptide LFLNQK est un peptide commun aux protéines de parvalbumine beta des espèces de maquereau blanc (*Scomber japonicus*) et de carpe commune (*Cyprinus carpio*). L'identification d'un tel peptide prouve la présence de protéines de poisson mais ne permet pas d'identifier précisément l'espèce. La liste des peptides spécifiques au poisson ainsi établie constitue une base de données des marqueurs du poisson susceptibles d'être identifiés sur des échantillons archéologiques.

L'identification des séquences de peptides par la bioinformatique est réalisée grâce aux spectres MS/MS enregistrés pour chaque échantillon. L'attribution des séquences a été vérifiée manuellement et dans certains cas la séquence du peptide identifiée par méthode *De Novo* diffère d'un acide aminé par rapport à celle attribuée par la bioinformatique. En effet, il est important de rappeler que l'identification des protéines est effectuée par homologie de séquence avec d'autres espèces de poisson. Si on se focalise sur la protéine de myosine (lourde chaîne) de la carpe commune qui est identifiée pour tous les échantillons, on remarque que certaines séquences sont propres à l'anchois et d'autres propres à la bonite.

Le peptide de séquence VIDSMQSTLDSEVR est identifié en position 1594-1607 dans la chaîne lourde de la myosine de la carpe commune. Dans le cas de l'anchois, le spectre MS/MS obtenu permet d'identifier la séquence VIDSMQGLDSEVR, notamment grâce à l'identification des ions y_1^+ à y_{12}^+ et des ions b_1^+ à b_4^+ permettant de mettre en évidence la substitution de la 7ème sérine par un résidu glycine (fig.4-4). Concernant l'espèce de la bonite, la présence des ions y_1^+ , y_2^+ , y_4^+ à y_9^+ , y_{11}^+ , y_{12}^+ et des ions b_2^+ à b_5^+ sur le spectre MS/MS montre que la séquence peptidique identifiée est VIDSMQSNLDSEVR, prouvant que la 8ème thréonine est substituée par un résidu asparagine. On peut ainsi affirmer qu'il existe des peptides spécifiques à l'anchois et à la bonite et que l'identification de ces peptides permet de distinguer les deux espèces de poisson. De la même manière, le peptide 1664-1677 de séquence GQEDMKEQVAMVER pour la carpe commune est identifié avec substitution du 3ème acide glutamique en acide aspartique dans le cas de l'anchois (GQDDMKEQVAMVER) alors que pour la bonite la 2ème glutamine est substituée par un résidu histidine conduisant à la séquence GHEDMKEQVAMVER (figure 4-5).

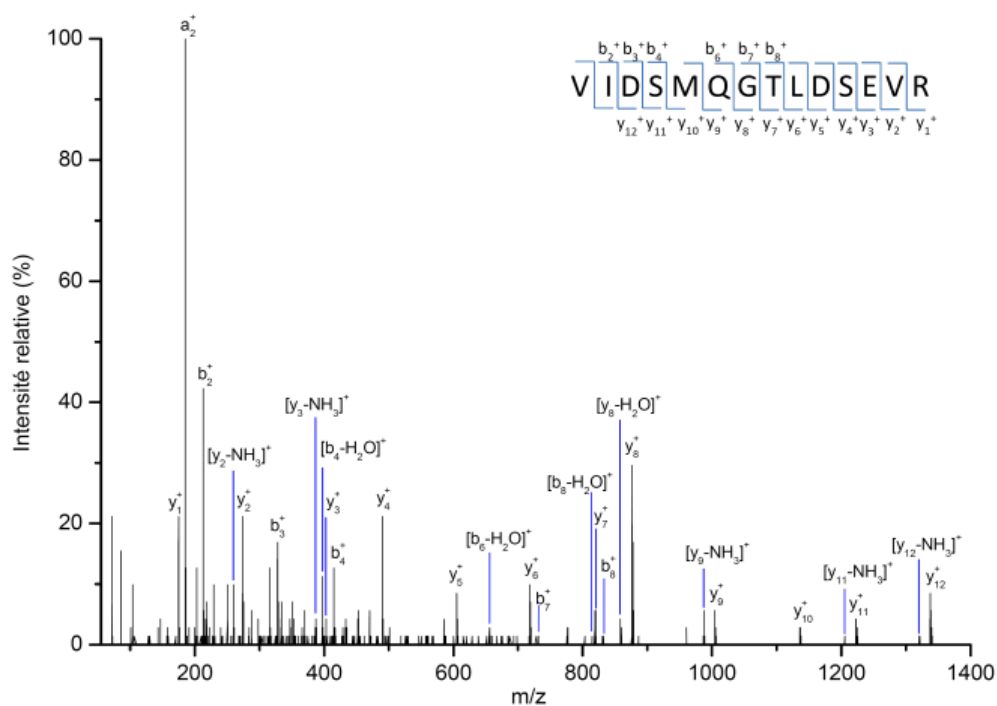


Figure 4-4: Spectre MS/MS de l'ion doublement chargé à m/z 775,40 de l'extrait hydrolysé d'anchois frais et présentant les fragments b et y de la séquence peptidique VIDSMQGTLDSEVR

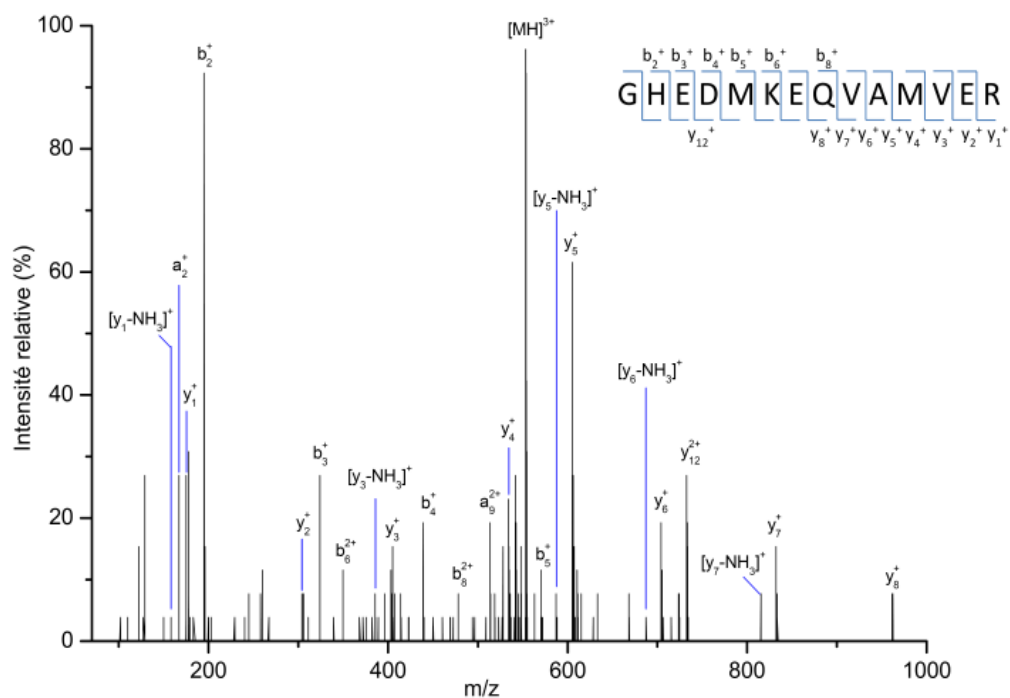


Figure 4-5: Spectre MS/MS de l'ion triplement chargé à m/z 553,59 de l'extrait hydrolysé de bonite séchée et présentant les fragments b et y de la séquence peptidique GHEDMKEQVAMVER

Au total, 15 et 9 peptides présentant une séquence avec un acide aminé différent en comparaison avec la séquence attribuée par la bioinformatique sont identifiés respectivement pour l'anchois et la bonite dans le cas de la protéine de la chaîne lourde de myosine séquencée pour la carpe commune (table 4-4). Cela prouve que le séquençage de peptides par méthode *De Novo* permet de retrouver la séquence peptidique exacte et donc de distinguer deux espèces différentes, même si les protéines relatives à ces espèces ne sont pas présentes dans les banques de données protéomiques.

Séquence peptidique	Position	Acide aminé substitué	Anchois frais	Anchois sec	Bonite
IAYLM <u>G</u> LNSADMLK	386-399	M5 → L			x
TPGLMEN <u>Y</u> LVIHQLR	681-695	Y8 → F		x	
L <u>A</u> LLVTMTQALCR	782-794	L3 → S		x	
ET <u>N</u> ERLEDEEEINAELTAK	922-940	N3 → T	x	x	
LEDEEEINAELT <u>A</u> K	927-940	A13 → G			x
NLTEEMASQDESI <u>A</u> K	978-992	A14 → G	x	x	
LAQESIMDLENE <u>K</u> QQSDEK	1062-1080	E12 → D	x	x	
KKDFE <u>I</u> SQLLSK	1083-1094	I6 → T	x	x	
IEE <u>L</u> EEEEIEAER	1116-1127	L4 → V		x	
MEIDDL <u>T</u> SNMEAVAK	1227-1241	T7 → S			x
AN <u>S</u> LAANLDK	1436-1445	S3 → A			x
YEE <u>S</u> QAELEGAQK	1461-1473	S4 → G			x
NSYEEALD <u>H</u> LETLK	1487-1500	H9 → Q	x	x	
NSYEEALD <u>H</u> LETLKR	1487-1501	H9 → Q	x		
SEI <u>Q</u> TALEEAEGTLEHEESK	1539-1558	Q4 → L		x	
VIDSMQ <u>S</u> TLDSEVR	1594-1607	S7 → G	x	x	
VIDSMQ <u>S</u> TLDSEVR	1594-1607	T8 → N			x
DAQLHL <u>D</u> EAVR	1653-1663	E8 → D		x	x
GQEDMKEQVAM <u>V</u> ER	1664-1677	E3 → D	x	x	
GQEDMKEQVAM <u>V</u> ER	1664-1677	Q2 → H			x
VAEQELVD <u>A</u> SER	1702-1713	A9 → V	x	x	
LDEAE <u>S</u> LAMK	1798-1807	S6 → N	x	x	x
ELE <u>A</u> EVEAEQR	1822-1832	A4 → T	x	x	

Table 4-4: Substitutions d'acide aminé identifiées pour l'anchois et la bonite concernant la lourde chaîne de myosine identifiée par homologie de séquence avec la carpe commune

Des substitutions d'acide aminé ont été mises en évidence sur d'autres protéines que la chaîne lourde de myosine et sont exposées dans la table 4-5. En ce qui concerne l'anchois, 3 séquences caractéristiques de cette espèce ont été mises en évidence : les séquences

MEMQEIQLK pour la protéine de tropomyosine, AFEIIDQDK pour la parvalbumine et AVVDGAYEVIK pour la lactate déshydrogénase.

Protéine - Espèce	Séquence peptidique	Position	Substitution d'acide aminé	Anchois frais	Anchois sec	Bonite
Tropomyosin-1 alpha chain - Danio rerio (Zebrafish) (Brachydanio rerio)	MEL <u>Q</u> EIQLK	141-149	L3 → M	x	x	
	QLEDDL <u>V</u> ALQK	38-48	A8 → T			x
Tropomyosin-1 alpha chain - Liza aurata (Golden grey mullet)	SKQLEDDL <u>V</u> ALQK	36-48	A10 → T			x
	QLEDDL <u>V</u> ALQK	38-48	A8 → T			x
Parvalbumin beta - Scomber japonicus (Chub mackerel)	A <u>F</u> AIIDQDK	47-55	A3 → E	x	x	
Parvalbumin beta - Cyprinus carpio (Common carp)	A <u>F</u> AIIDQDK	46-54	A3 → E	x	x	
L-lactate dehydrogenase A chain - Chaenocephalus aceratus (White crocodile fish)	<u>E</u> VVDGAYEVIK	232-242	E1 → A	x	x	
L-lactate dehydrogenase B chain - Fundulus heteroclitus (Killifish) (Mummichog)	AVVD <u>S</u> AYEVIK	234-244	S5 → G	x	x	
Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform - Mugil capito (Grey mullet)	VEFSADQIED <u>Y</u> R	37-48	R12 → L			x
	VEFSADQIED <u>Y</u> REAFGLFDR	37-56	R12 → L			x
Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform - Mugil capito (Grey mullet)	LN <u>F</u> DAFLPMLK	64-74	A5 → T			x

Table 4-5: Substitutions d'acide aminé identifiées en utilisant les spectres MS/MS des échantillons de tissu de poisson

Par exemple, deux substitutions d'acide aminé différentes conduisant à la séquence peptidique AFEIIDQDK, caractéristique de la parvalbumine de l'anchois, ont été identifiées. Il s'agit soit du peptide EVVDGAYEVIK identifié en position 232-242 dans la lactate déshydrogénase par homologie de séquence avec le poisson des glaces (*Chaenocephalus aceratus*) avec substitution du 1er acide glutamique par un résidu alanine, soit du peptide de séquence AVVDSAYEVIK identifié en position 234-244 dans la lactate déshydrogénase du choquemort (*Fundulus heteroclitus*) avec substitution de la 5ème sérine par un résidu glycine. Dans les deux cas, les substitutions d'acide aminé identifiées conduisent à la séquence AVVDGAYEVIK (fig.4-6), montrant que celle-ci est caractéristique de la lactate déshydrogénase de l'anchois.

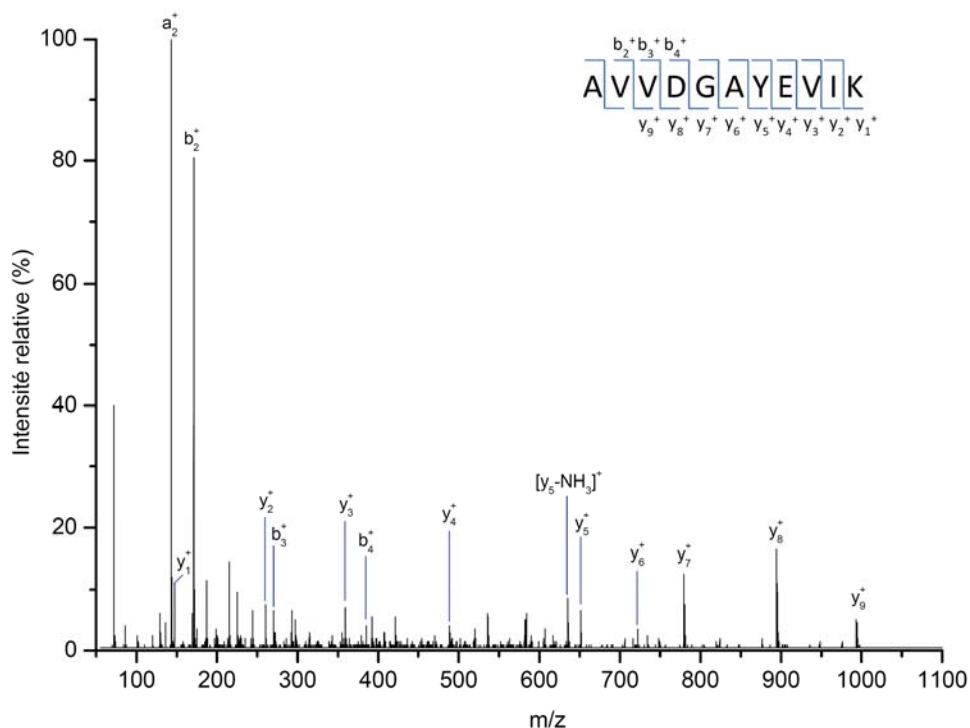


Figure 4-6: Spectre MS/MS de l'ion doublement chargé à m/z 582,31 de l'extrait hydrolysé d'anchois frais et présentant les fragments b et y de la séquence peptidique AVVDGAYEVIK

Concernant la bonite, 3 séquences caractéristiques de cette espèce ont été mises en évidence : les séquences QLEDDLVTLQK pour la protéine de tropomyosine, VEFSADQIEDYL pour la chaîne légère 1 de la myosine et LNFDTFLPMLK pour la chaîne légère 3 de la myosine. Par exemple, 2 substitutions d'acide aminé différentes permettent d'identifier le peptide QLEDDLVTLQK caractéristique de la tropomyosine de bonite. Les spectres MS/MS montrent que la 8ème alanine de la séquence QLEDDLVALQK, correspondant au peptide en position 38-48 dans les protéines de tropomyosine du poisson zèbre (*Danio rerio*) et du mulot doré (*Liza aurata*), est substituée par une thréonine (fig.4-7). Cette substitution est retrouvée sur la séquence SKQLEDDLVALQK en position 36-48 dans la tropomyosine du mulot doré (*Liza aurata*) incluant un clivage manqué de la trypsine.

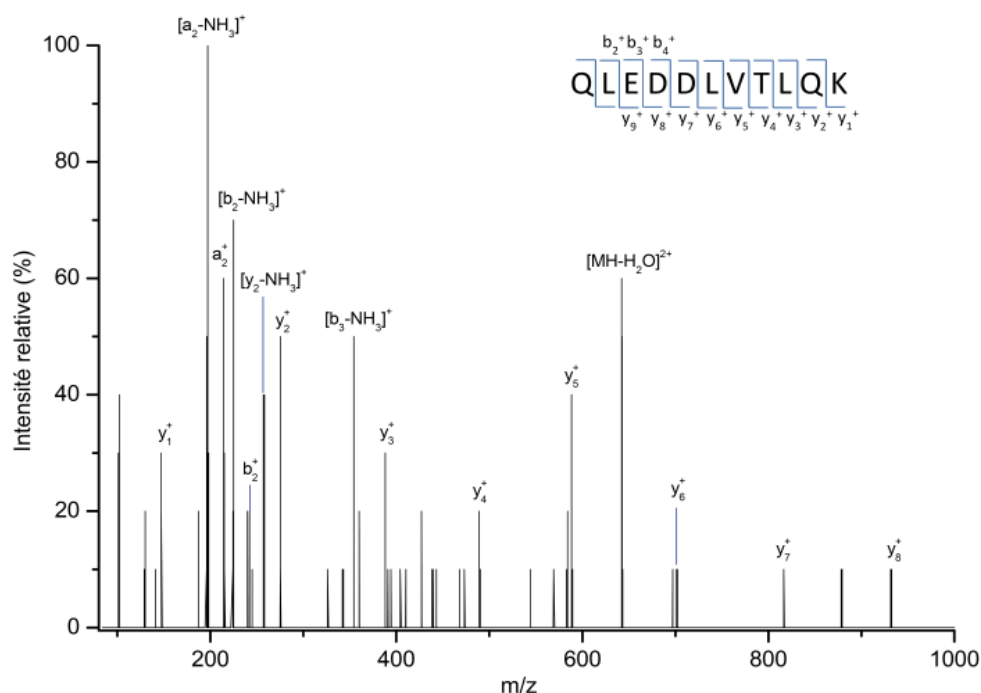


Figure 4-7: Spectre MS/MS de l'ion doublement chargé à m/z 651,35 de l'extrait hydrolysé de bonite séchée et présentant les fragments b et y de la séquence peptidique QLEDDLVTLQK

Le but de cette première partie était de mettre en place une stratégie d'analyse permettant d'identifier le plus grand nombre de protéines. Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant une solution d'extraction protéique contenant dénaturants et détergents en forte concentration. Les protéines identifiées dans le cas des tissus de poisson proviennent majoritairement des cellules musculaires. En particulier, l'identification de la chaîne lourde de myosine a conduit à un grand nombre de peptides spécifiques et l'examen minutieux des spectres MS/MS correspondants aux peptides identifiés par homologie de séquence avec d'autres espèces de poisson a permis de mettre en évidence des substitutions d'acides aminés propres aux deux espèces d'intérêt anchois et bonite.

En résumé, le développement méthodologique réalisé sur les tissus de poisson a permis :

- de trouver les conditions optimales d'extraction du matériel protéique
- de mettre en évidence des séquences peptidiques spécifiques au poisson et plus particulièrement d'identifier des peptides spécifiques des espèces de poisson étudiées

3. Application de la méthodologie sur des céramiques préalablement imprégnées de chair de poisson

3.1. Céramique imprégnée d'une espèce de poisson

Afin de reproduire une céramique archéologique ayant contenu du poisson, un morceau de céramique fabriquée de manière artisanale a été imprégnée de chair de poisson et conservé au laboratoire sans précautions particulières durant plusieurs mois. L'objectif étant de s'assurer que la méthodologie mise au point précédemment sur les échantillons de tissus de poisson permet l'extraction de protéines piégées dans une matrice argileuse. Avant de procéder à l'extraction des protéines, la céramique imprégnée a été rigoureusement nettoyée. Tout d'abord, les résidus de chair de poisson présents en surface ont été grattés afin de ne laisser aucune trace visible. Ensuite, la céramique a été lavée en laissant couler de l'eau désionisée sur la surface (fig.4-8). L'analyse a enfin été réalisée sur des prélèvements de céramique imprégnée et lavée d'environ 4 mm² de surface et d'épaisseur 1 mm. Les protéines ont été extraites avec la solution qui s'est avérée la plus efficace sur les tissus d'anchois et de bonite c'est-à-dire la solution C composée du mélange urée/thiourée/DTT/CHAPS. Cette étape a été suivie de l'hydrolyse enzymatique et les peptides résultants ont été analysés par spectrométrie de masse en tandem.



Figure 4-8: a) Photographie d'un morceau de céramique (40 x 25 mm) imprégnée d'anchois
b) Photographie d'un fragment de céramique imprégnée (15 x 10 mm) dont la surface a été grattée et lavée à l'eau désionisée

L'interrogation de la banque de données Swiss-Prot résulte en l'identification de 9 et 14 protéines de poisson pour les céramiques imprégnées d'anchois et de bonite respectivement. De nouveau, les protéines majoritaires des cellules musculaires ont été identifiées. Parmi les peptides identifiés, on dénombre 31 et 27 peptides spécifiques au poisson pour les échantillons de céramique imprégnée d'anchois et de bonite respectivement (voir résultats détaillés en annexe). Les peptides spécifiques proviennent majoritairement de la chaîne lourde de myosine

qui est la protéine de plus haut poids moléculaire identifiée. La vérification manuelle des spectres MS/MS montre que les séquences identifiées par la bioinformatique ne sont pas toujours exactes. Plus précisément, en ce qui concerne la chaîne lourde de myosine de la carpe commune, 6 et 3 peptides présentent une substitution d'acide aminé pour les échantillons de céramique imprégnée d'anchois et de bonite respectivement (table 4-6). Par exemple, le peptide de séquence VAEQELVDVSER, déjà identifié pour l'échantillon d'anchois (voir table 4-4), est de nouveau identifié dans le cas de la céramique imprégnée de d'anchois (fig.4-9).

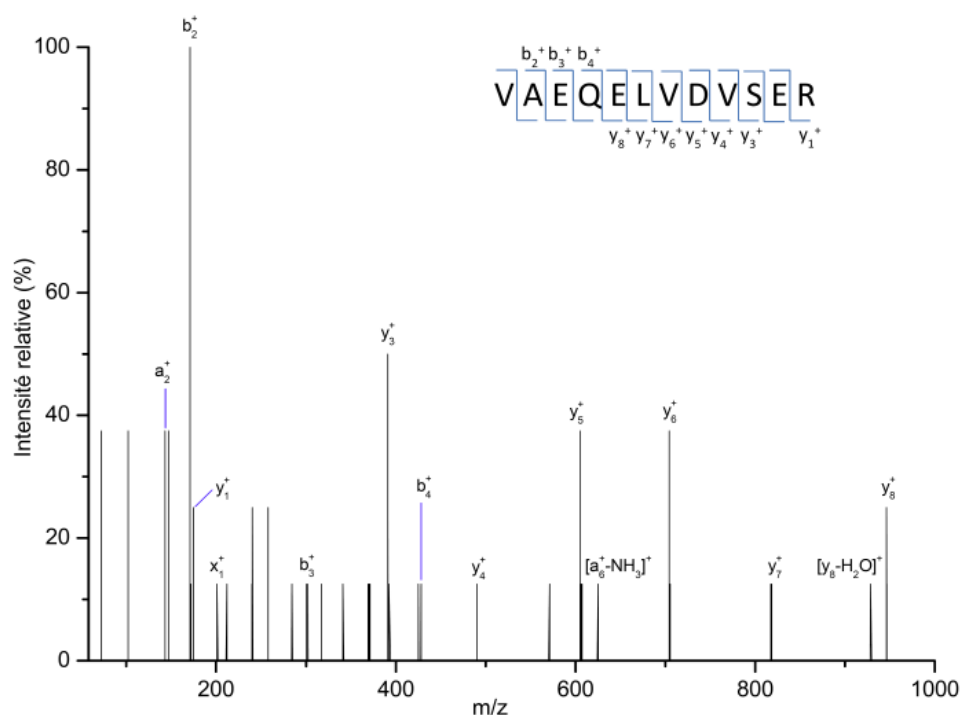


Figure 4-9: Spectre MS/MS de l'ion doublement chargé à m/z 687,34 de l'extrait hydrolysé de la céramique imprégnée d'anchois et présentant les fragments b et y de la séquence peptidique VAEQELVDVSER

De même, la séquence IAYLLGLNSADMLK, identifiée précédemment lors de l'analyse de tissu de bonite est retrouvée lors de l'analyse de la céramique imprégnée de bonite (fig.4-10).

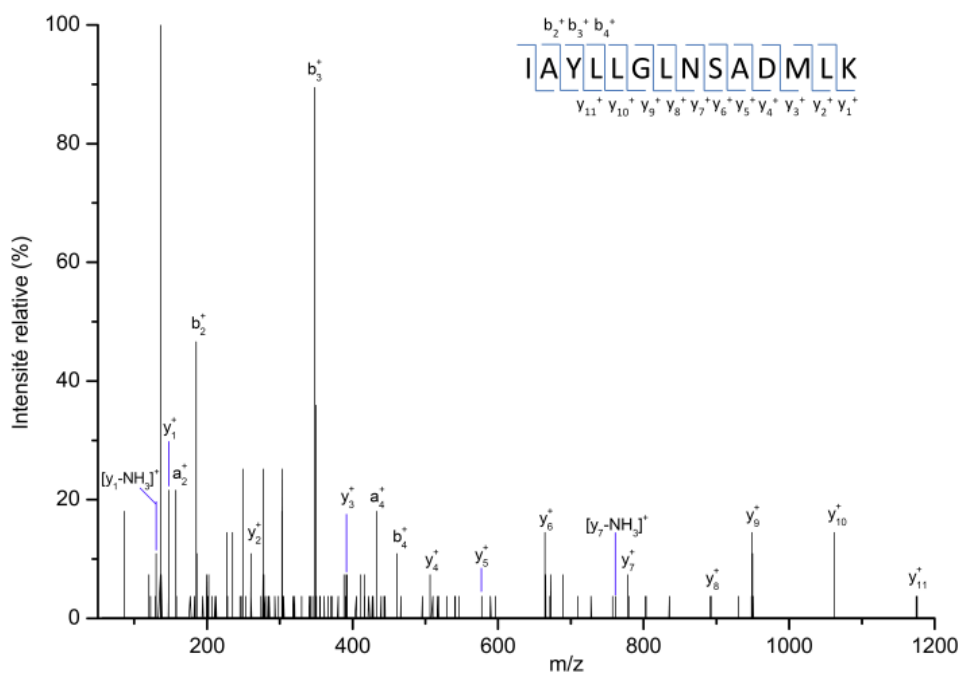


Figure 4-10: Spectre MS/MS de l'ion doublement chargé à m/z 761,44 de l'extrait hydrolysé de la céramique imprégnée de bonite et présentant les fragments b et y de la séquence peptidique IAYLLGLNSADMLK

Concernant les autres protéines identifiées, le spectre MS/MS du peptide AFAIIDQDK, identifié par la bioinformatique en position 47-55 dans la parvalbumine β du maquereau blanc, permet de mettre en évidence la substitution de la 3^{ème} alanine par l'acide glutamique pour l'échantillon de céramique imprégnée d'anchois (fig.4-11). Cette séquence (AFEIIDQDK) avait été identifiée auparavant pour les échantillons d'anchois frais et d'anchois sec (table 4-5). De la même manière, le peptide VEFSADQIEDYREAFGLFDR est identifié par la bioinformatique en position 37-56 dans la chaîne légère 1 de la myosine de la carpe commune pour les échantillons de bonite et de céramique imprégnée de bonite. Or, les spectres MS/MS issus de ces échantillons permettent d'identifier la séquence VEFSADQIEDYLEAFGLFDR, indiquant que, pour l'espèce de la bonite, la 12^{ème} arginine est substituée par un résidu leucine.

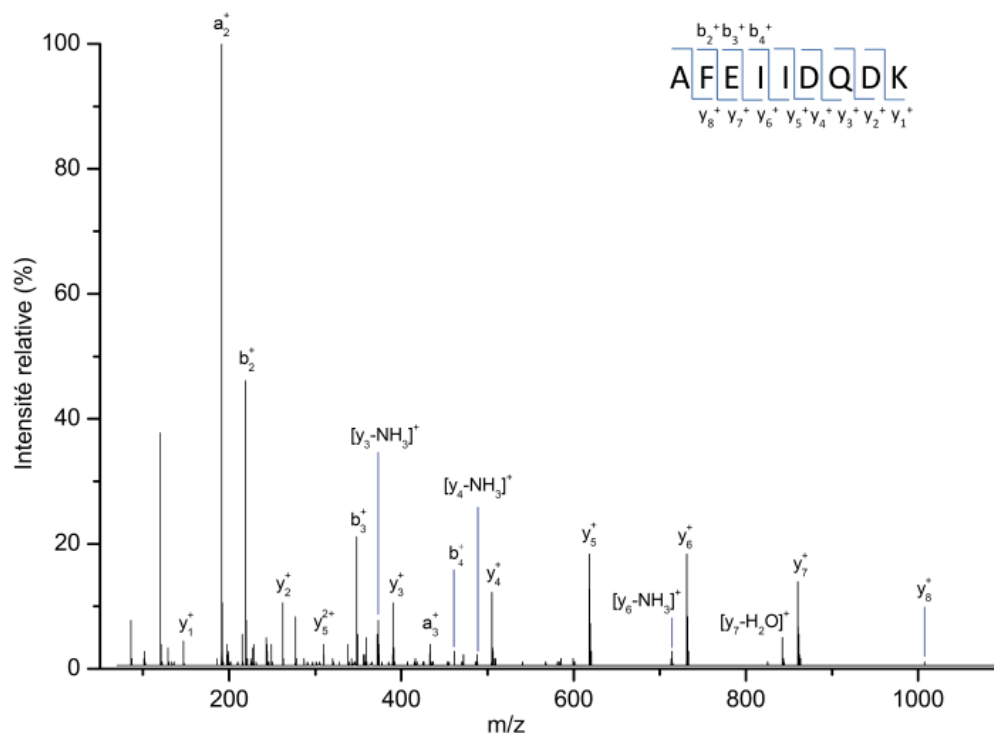


Figure 4-11: Spectre MS/MS de l'ion doublement chargé à m/z 539,77 de l'extrait hydrolysé de la céramique imprégnée d'anchois et présentant les fragments b et y de la séquence peptidique AFEIIDQDK

Les résultats présentés ici montrent que la méthodologie employée pour l'extraction des protéines des tissus de poisson est appliquée avec succès sur les échantillons de céramique préalablement imprégnée de poisson. Les protéines sont identifiées sans ambiguïté et un grand nombre de peptides spécifiques est mis en évidence. De plus, en dépit de la faible intensité des spectres MS/MS, il est possible de procéder au séquençage de peptide par méthode De Novo. Les séquences propres aux espèces étudiées sont ainsi identifiées, permettant de différencier deux espèces dont les protéines ne sont pas répertoriées dans les banques de données.

Protéine - Espèce	Peptide	Position	Substitution d'acide aminé	Céramique imprégnée d'anchois	Céramique imprégnée de bonite	Céramique imprégnée de mélange anchois / bonite
Myosin heavy chain, fast skeletal muscle - <i>Cyprinus carpio</i> (Common carp)	IAYLMGLNSADMLK	386-399	M5 → L		x	x
	TPGLMENYLVIHQLR	681-695	Y8 → F		x	x
	NLTEEMASQDESI A KLTK	978-995	A14 → G	x		
	T KLEQQVDDLEGSLEQEK	1026-1043	T1 → A		x	
	LAQESIMDLEN E KQQSDEK	1062-1080	E12 → D			x
	MEIDDL T SNMEAVAK	1227-1241	T7 → S	x		
	NSYEEALD H LET L KR	1487-1501	H9 → Q	x		x
	VIDSMQ S TLDSEVR	1594-1607	S7 → G	x		
	GQEDMKEQVAMVER	1664-1677	Q2 → H			x
	KVAEQELVD A SER	1701-1713	A10 → V			x
	VAEQELVD A SER	1702-1713	A9 → V	x		x
	LDEAE S LAMK	1798-1807	S6 → N	x		x
Tropomyosin-1 alpha chain - <i>Danio rerio</i> (Zebrafish) (<i>Brachydanio rerio</i>)	MELQEIQLK	141-149	L3 → M	x		x
Parvalbumin beta - <i>Scomber japonicus</i> (Chub mackerel)	AFAIIDQDK	47-55	A3 → E	x		
Parvalbumin beta - <i>Cyprinus carpio</i> (Common carp)	AFAIIDQDK	46-54	A3 → E	x		
Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform - <i>Mugil capito</i> (Grey mullet)	VEFSADQIEDYREAFGLFDR	37-56	R12 → L		x	x
Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform - <i>Mugil capito</i> (Grey mullet)	LNFD A FLPMLK	64-74	A5 → T			x

Table 4-6: Substitutions d'acide aminé identifiées en utilisant les spectres MS/MS des échantillons de céramiques imprégnées

3.2. Céramique imprégnée d'un mélange d'espèces de poisson

Nous avons montré précédemment que l'examen minutieux des spectres MS/MS permettait de différencier les espèces de poisson anchois et bonite. Ainsi, nous avons décidé d'imprégner un morceau de céramique avec un mélange de chair d'anchois et de bonite. Cet échantillon a été conservé 3 mois au laboratoire, puis nettoyé de la même façon que les céramiques imprégnées avec une seule espèce de poisson.

Au total, 15 protéines de poisson ont été identifiées. De nouveau, la première protéine identifiée par la bioinformatique est la chaîne lourde de myosine de la carpe commune. De

manière plus détaillée, on remarque que parmi les 33 peptides identifiés pour cette protéine, 18 lui sont spécifiques (voir résultats détaillés en annexe).

Afin de mettre en évidence la présence de 2 espèces différentes dans l'échantillon, l'anchois et la bonite, les spectres MS/MS ont été vérifiés manuellement. Pour la chaîne lourde de myosine de la carpe commune 8 peptides présentant une substitution d'acide aminé ont été identifiés (table 4-6). Parmi ces peptides, 2 séquences ont été précédemment attribuées aux 2 espèces et ne permettent pas de faire la distinction entre anchois et bonite. Il s'agit du peptide en position 681-695 avec substitution de la 8ème tyrosine par une phénylalanine (TPGLMENYLVIHQLR) et du peptide 1798-1807 avec substitution de la 6ème sérine par une asparagine (LDEAESLAMK). De façon plus intéressante, 3 séquences identifiées sont propres à l'anchois et 2 sont caractéristiques de la bonite. Par exemple, la présence des ions y_1^+ à y_{11}^+ et b_2^+ à b_5^+ sur le spectre MS/MS mène à l'identification du peptide VAEQELVDVSER, correspondant à la séquence VAEQELVDASER en position 1702-1713 dans la chaîne lourde de myosine de la carpe commune avec substitution de la 9ème alanine en valine (fig.4-12). Cette substitution d'acide aminé avait déjà été observée pour les échantillons de tissu d'anchois et de céramique imprégnée d'anchois. Globalement, les 3 séquences suivantes propres à l'anchois ont été identifiées: LAQESIMDLENDKQQSDEK, NSYEEALDQLETLKR et VAEQELVDVSER (respectivement en position 1062-1080, 1487-1501 et 1702-1713 dans la chaîne lourde de myosine de la carpe commune).

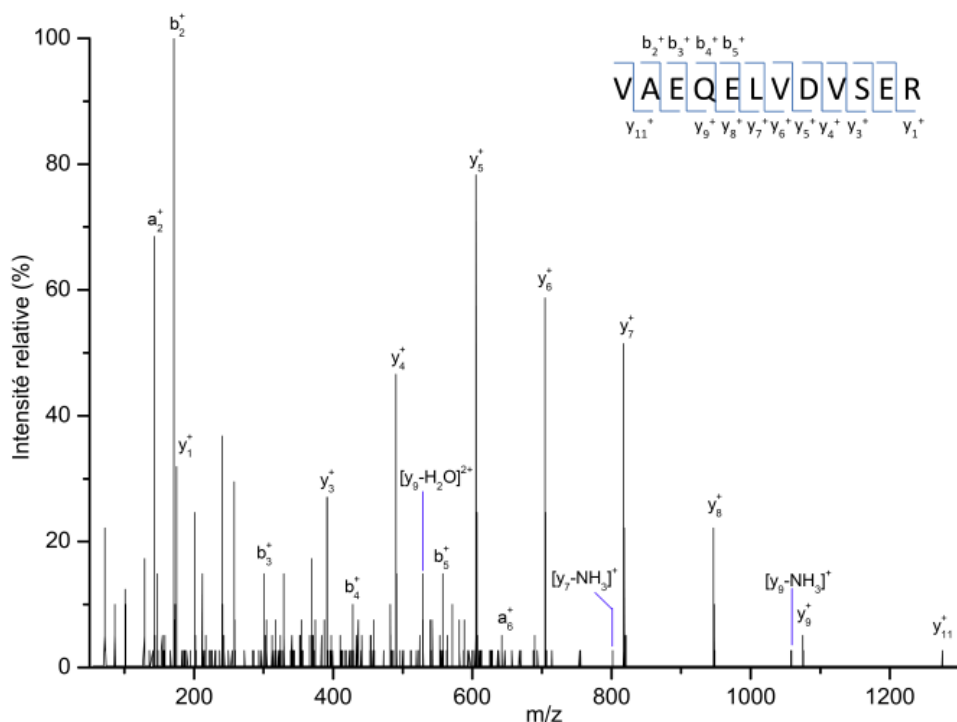


Figure 4-12: Spectre MS/MS de l'ion doublement chargé à m/z 687,35 de l'extrait hydrolysé de céramique imprégnée d'un mélange anchois / bonite et présentant les fragments b et y de la séquence peptidique VAEQELVDVSEK

Concernant les séquences caractéristiques de la bonite, les peptides IAYLLGLNSADMLK et GHEDMKEQVAMVER (respectivement en position 386-399 et 1664-1677 dans la chaîne lourde de myosine de la carpe commune) ont été identifiés. La séquence IAYLLGLNSADMLK, présentant la substitution de la 5^{ème} méthionine par un résidu leucine (fig.13) en comparaison avec le peptide IAYLMGLNSADMLK en position 386-399 dans la chaîne lourde de myosine de la carpe commune, a déjà été identifiée pour les échantillons de tissu de bonite et de céramique imprégnée de bonite.

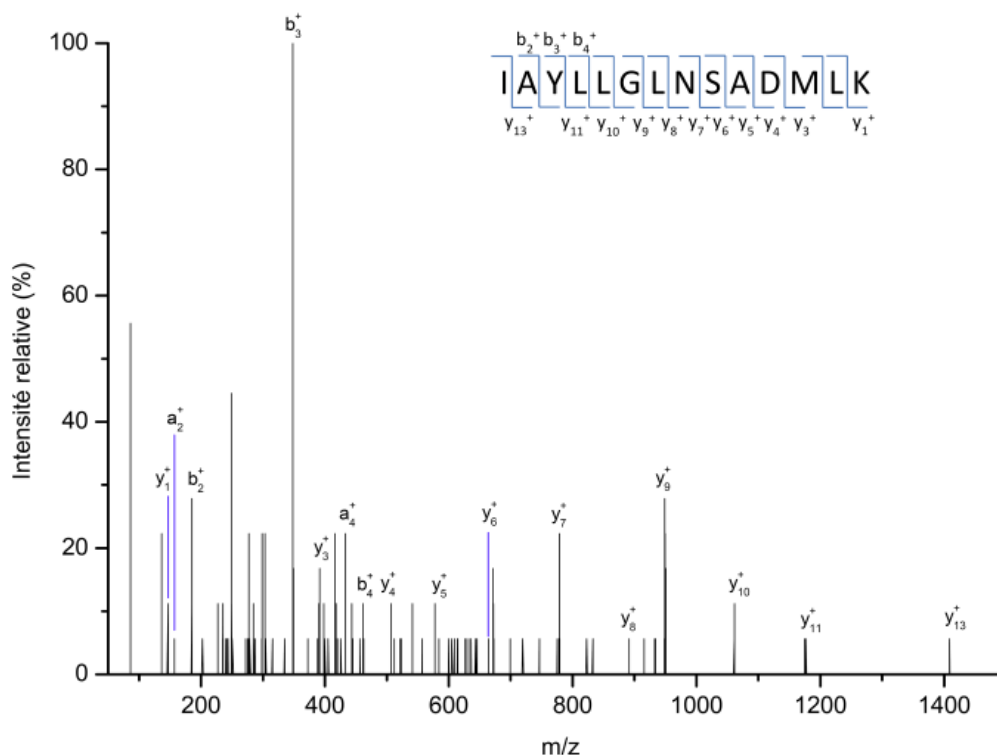


Figure 4-13: Spectre MS/MS de l'ion doublement chargé à m/z 761,43 de l'extrait hydrolysé de céramique imprégnée d'un mélange anchois / bonite et présentant les fragments b et y de la séquence peptidique IAYLLGLNSADMLK

Parmi les autres protéines identifiées, certaines séquences caractéristiques de l'anchois ou de la bonite ont été retrouvées lors de l'analyse de la céramique imprégnée du mélange de poisson. La séquence MEMQEIQLK, présentant une substitution de la 3ème leucine par une méthionine en comparaison de la séquence MELQEIQLK en position 141-149 dans la tropomyosine du poisson zèbre, déjà identifiée dans les échantillons d'anchois frais, anchois sec et céramique imprégnée d'anchois est retrouvée. De même, on retrouve la séquence VEFSAQIEDYL^EAFGLFDR avec substitution de la 12ème arginine par un résidu leucine en comparaison avec le peptide en position 37-56 dans la chaîne légère 1 de la myosine de la carpe commune qui avait déjà été identifiée pour les échantillons de bonite et céramique imprégnée de bonite.

En définitive, la méthodologie développée a été appliquée à des échantillons de céramique imprégnée d'anchois et/ou de bonite afin de reproduire un récipient archéologique ayant contenu du poisson. Dans un premier temps, la céramique a été imprégnée avec une seule espèce de poisson. Les résultats obtenus ont montré que la technique d'extraction des protéines était adaptée à ce type d'échantillon: un grand nombre de protéines et de peptides spécifiques au poisson ont été identifiées et des séquences propres à chaque espèce ont été mises en évidence

par séquençage *De Novo*. Fort de ces résultats, nous avons décidé d'analyser une céramique imprégnée du mélange de ces deux espèces. Une nouvelle fois la méthodologie a été appliquée avec succès. De façon plus intéressante, il a été possible de différencier les deux espèces en présence dans l'échantillon c'est à dire l'anchois et la bonite grâce à la méthode de séquençage *De Novo* permettant de mettre en évidence des séquences peptidiques propres à chaque espèce.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Dressel, H. *Corpus Inscriptionum Latinarum*, vol. XV: Berlin, 1899.
- (2) Lévêque, P. *Céramiques hellénistiques et romaines*, Volume 3; Presses Univ. Franche-Comté, 2001.
- (3) Bonifay, M. *La céramique africaine, un indice de développement économique ?; Antiquité tardive* 2003
- (4) Bernal Casasola, D., and Lagóstena, L. *Figlinae Baeticae, Talleres alfareros y producciones cerámicas en la Bética romana* British Archaeological Reports Int. Ser. 1266, Oxford., 2004.
- (5) Bonifay, M.; Garnier, N. In *Supplying Rome and the Empire.*; Papi, E., Ed.: Journal of Roman Archaeology Suppl. 69, Porthmouth, 2007, pp 8-32.
- (6) Evershed, R. P. *Archaeometry* **2008**, 50, 895-924.
- (7) Hayek, E. W. H.; Krenmayr, P.; Lohninger, H.; Jordis, U.; Moche, W.; Sauter, F. *Analytical Chemistry* **1990**, 62, 2038-2043.
- (8) Regert, M.; Vacher, S.; Moulherat, C.; Decavallas, O. *Archaeometry* **2003**, 45, 101-120.
- (9) Regert, M.; Langlois, J.; Colinart, S. *Journal of Chromatography A* **2005**, 1091, 124-136.
- (10) Charters, S.; Evershed, R. P.; Blinkhorn, P. W.; Denham, V. *Archaeometry* **1995**, 37, 113-127.
- (11) Evershed, R. P.; Dudd, S. N.; Copley, M. S.; Berstan, R.; Stott, A. W.; Mottram, H.; Buckley, S. A.; Crossman, Z. *Accounts of Chemical Research* **2002**, 35, 660-668.
- (12) Mottram, H. R.; Dudd, S. N.; Lawrence, G. J.; Stott, A. W.; Evershed, R. P. *Journal of Chromatography A* **1999**, 833, 209-221.
- (13) Evershed, R. P.; Payne, S.; Sherratt, A. G.; Copley, M. S.; Coolidge, J.; Urem-Kotsu, D.; Kotsakis, K.; Ozdogan, M.; Ozdogan, A. E.; Nieuwenhuyse, O.; Akkermans, P. M. M. G.; Bailey, D.; Andeescu, R.-R.; Campbell, S.; Farid, S.; Hodder, I.; Yalman, N.; Ozbasaran, M.; Bicakci, E.; Garfinkel, Y.; Levy, T.; Burton, M. M. *Nature* **2008**, 455, 528-531.
- (14) Craig, O. E.; Love, G. D.; Isaksson, S.; Taylor, G.; Snape, C. E. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2004**, 71, 613-634.
- (15) Colombini, M. P.; Giachi, G.; Modugno, F.; Ribechini, E. *Microchemical Journal* **2005**, 79, 83-90.

- (16) Charrié-Duhaut, A.; Connan, J.; Rouquette, N.; Adam, P.; Barbotin, C.; de Rozières, M.-F.; Tchaplal, A.; Albrecht, P. *Journal of Archaeological Science* **2007**, *34*, 957-967.
- (17) Garnier, N.; Rolando, C.; Høtje, J. M.; Tokarski, C. *International Journal of Mass Spectrometry* **2009**, *284*, 47-56.
- (18) Evershed, R. P. *World Archaeology* **2008**, *40*, 26 - 47.
- (19) Evershed, R. P.; Mottram, H. R.; Dudd, S. N.; Charters, S.; Stott, A. W.; Lawrence, G. J.; Gibson, A. M.; Conner, A.; Blinkhorn, P. W.; Reeves, V. *Naturwissenschaften* **1997**, *84*, 402-406.
- (20) Evershed, R. P.; Copley, M. S.; Dickson, L.; Hansel, F. A. *Archaeometry* **2008**, *50*, 101-113.
- (21) Regert, M.; Rolando, C. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 965-975.
- (22) Garnier, N.; Cren-Olivé, C.; Rolando, C.; Regert, M. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 4868-4877.
- (23) Henderson, J. S.; Joyce, R. A.; Hall, G. R.; Hurst, W. J.; McGovern, P. E. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 18937-18940.
- (24) McGovern, P. E.; Glusker, D. L.; Exner, L. J.; Voigt, M. M. *Nature* **1996**, *381*, 480-481.
- (25) McGovern, P. E.; Zhang, J.; Tang, J.; Zhang, Z.; Hall, G. R.; Moreau, R. A.; Nuñez, A.; Butrym, E. D.; Richards, M. P.; Wang, C.-s.; Cheng, G.; Zhao, Z.; Wang, C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 17593-17598.
- (26) Stern, B.; Heron, C.; Tellefsen, T.; Serpico, M. *Journal of Archaeological Science* **2008**, *35*, 2188-2203.
- (27) Guasch-Jané, M. R.; Ibern-Gomez, M.; Andrés-Lacueva, C.; Jauregui, O.; Lamuela-Raventos, R. M. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 1672-1677.
- (28) Colombini, M. P.; Modugno, F.; Ribechini, E. *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *40*, 675-687.
- (29) Ribechini, E.; Modugno, F.; Colombini, M. P. *Microchimica Acta* **2008**, *162*, 405-413.
- (30) Mirabaud, S.; Rolando, C.; Regert, M. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 6182-6192.
- (31) Solazzo, C.; Fitzhugh, W. W.; Rolando, C.; Tokarski, C. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 4590-4597.

ANNEXES

Résultats détaillés des identifications réalisées par interrogation de la banque de données protéomique suite aux analyses nanoLC, nano ESI-qQ-TOF MS/MS

Echantillon : anchois frais

Extraction A : eau acidifiée à 1% d'acide trifluoroacétique

Protéines de poisson identifiées	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Peptides spécifiques au poisson	Masse théo.	Masse exp.	Δm (ppm)
Parvalbumin beta	Chub mackerel	11538	121	25	3	LFLQNFK	908.512	908.5131	1
						IGIDEFAAMIK	1222.6267	1222.5595	-50
Parvalbumin beta	Common carp	11429	66	15	2	LFLQNFK	908.512	908.5131	1
Parvalbumin beta	Whiting	11316	64	17	2	AFVVIDQDK	1081.5444	1081.5236	-19
Parvalbumin-2	Zebrafish	11615	62	17	2	AFFVIDQDK	1081.5444	1081.5236	-19

Echantillon : anchois frais
Extraction B : 1.5M Tris, 50mM DTT, 0.5% SDS

Protéines de poisson identifiées	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Peptides spécifiques au poisson	Masse théo.	Masse exp.	Δm (ppm)
Myosin heavy chain, fast skeletal muscle	Common carp	221462	789	9	20	VTFQLSAER	1049.5506	1049.5703	19
						DFEISQLLSK	1178.6183	1178.6032	-13
						GGSFQTVSALFR	1268.6514	1268.6223	-23
						EDEIFPMNPPK	1315.6118	1315.5742	-29
						KKDFEISQLLSK	1434.8082	1434.8891	50
						IEDEQSLGAQLQK	1457.7362	1457.7251	-8
						LEDEEEINAELTAK	1602.7624	1602.7591	-2
						NLTEEMASQDESIK	1664.7563	1664.7278	-17
TPGLMENYLVHQLR	1782.9451	1782.8993	-26						
Tropomyosin-1 alpha chain	Zebrafish	32703	260	18	6	QLEDDLVALQK	1270.6769	1270.641	-28
						SKQLEDDLVALQK	1485.8038	1485.8709	45
						CSELEELKTVTNNMK	1923.8917	1923.8404	-27
Parvalbumin-2	Zebrafish	11615	111	27	3	AFFVIDQDK	1081.5444	1081.5559	11
						IGVDEFALLVK	1202.6911	1202.6588	-27
Parvalbumin beta	Common carp	11429	81	15	2	LFLQNFK	908.512	908.5479	39
Parvalbumin beta	Whiting	11316	81	17	2	AFVVIDQDK	1081.5444	1081.5559	11
Nucleoside diphosphate kinase B	Shallow-water Cape hake	14197	77	23	2	MMLGETNPADSKPGSIR	1802.8655	1802.8434	-12
Parvalbumin beta	Chub mackerel	11538	68	25	3	LFLQNFK	908.512	908.5479	39
						IGIDEFAAMIK	1222.6267	1222.5897	-30
Keratin, type II cytoskeletal 8	Zebrafish	57723	65	3	2	LESLTDEINFLR	1448.7511	1448.7856	24

Echantillon : anchois frais

Extraction C : 7M urée, 2M thiourée, 50mM DTT, 50mM Tris, 4% CHAPS

Protéines de poisson identifiées	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Peptides spécifiques au poisson	Masse théo.	Masse exp.	Δm (ppm)
Myosin heavy chain, fast skeletal muscle	Common carp	221462	903	14	28	DFEISQLLSK	1178.6183	1178.5995	-16
						DAQLHLDEAVR	1265.6364	1265.6711	27
						GGSFQTVSALFR	1268.6514	1268.5907	-48
						KDFEISQLLSK	1306.7132	1306.6496	-49
						KKDFEISQLLSK	1434.8082	1434.8412	23
						IEDEQSLGAQLQK	1457.7362	1457.7567	14
						LAEKDEEMEQIK	1461.7021	1461.7158	9
						LQDAEESIEAVNSK	1531.7365	1531.7755	25
						LEDEEEINAELTAK	1602.7624	1602.8134	32
						LQGEVEDLMIDVER	1644.8029	1644.8371	21
						NSYEEALDHLETLK	1660.7944	1660.7935	-1
						NLTEEMASQDESIK	1664.7563	1664.8025	28
						VLNASVIPEGQFIDNK	1742.9203	1742.9503	17
						NLQQEISDLTEQLGETGK	2001.9855	2001.997	6
Tropomyosin-1 alpha chain	Zebrafish	32703	234	29	10	LVIVEGELER	1155.6499	1155.6318	-16
						QLEDDLVALQK	1270.6769	1270.6302	-37
						KLIVIVEGELER	1283.7449	1283.7182	-21
						SKQLEDDLVALQK	1485.8038	1485.8318	19
						CSELEELKTVTNNMK	1923.8917	1923.8313	-31
Tropomyosin-1 alpha chain	Golden grey mullet	32710	197	31	10	QLEDDLVALQK	1270.6769	1270.6302	-37
						SKQLEDDLVALQK	1485.8038	1485.8318	19
Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform	Grey mullet	13658	109	7	1	GTYYDDYVEGLR	1286.5779	1286.5538	-19
Parvalbumin beta	Chub mackerel	11538	58	25	3	LFLQNFK	908.512	908.5243	14
						IGIDEFAAMIK	1222.6267	1222.5731	-44
Parvalbumin beta	Common carp	11429	52	15	2	LFLQNFK	908.512	908.5243	14
Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform	Grey mullet	20054	48	5	1	AGFEDYVEGLR	1254.5881	1254.554	-27
L-lactate dehydrogenase A chain	White crocodile fish	36160	44	3	1	VIGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.5582	-44
L-lactate dehydrogenase A chain	Patagonian blennie	36286	44	3	1	VLGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.5582	-44

Echantillon : anchois sec

Extraction A : eau acidifiée à 1% d'acide trifluoroacétique

Protéines de poisson identifiées	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Peptides spécifiques au poisson	Masse théo.	Masse exp.	Δm (ppm)
Myosin heavy chain, fast skeletal muscle	Common carp	221462	507	10	20	EALVSQLTR	1015.5662	1015.5809	15
						DFEISQLLSK	1178.6183	1178.6082	-9
						DAQLHLDEAVR	1265.6364	1265.6119	-19
						KKDFEISQLLSK	1434.8082	1434.8483	28
						IEDEQSLGAQLQK	1457.7362	1457.7402	3
						LAEKDEEMEQIK	1461.7021	1461.7537	35
						LQDAEESIEAVNSK	1531.7365	1531.7231	-9
						LEDEEEINAELTAK	1602.7624	1602.747	-10
						VGLLHSQNTSLINTK	1623.8944	1623.8951	0
NLTEEMASQDESIK	1664.7563	1664.7263	-18						
Tropomyosin-1 alpha chain	Zebrafish	32703	383	21	8	LVIVEGELER	1155.6499	1155.6348	-13
						QLEDDLVALQK	1270.6769	1270.6751	-1
						KLIVIVEGELER	1283.7449	1283.7244	-16
						SKQLEDDLVALQK	1485.8038	1485.8354	21
Tropomyosin-1 alpha chain	Golden grey mullet	32710	325	25	9	QLEDDLVALQK	1270.6769	1270.6751	-1
						SKQLEDDLVALQK	1485.8038	1485.8354	21
L-lactate dehydrogenase A chain	White crocodile fish	36160	57	6	2	SAETLWGVQK	1117.5768	1117.5846	7
						VIGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.5869	-19
L-lactate dehydrogenase A chain	Antarctic spiny plunderfish	36157	57	6	2	SAETLWGVQK	1117.5768	1117.5846	7
						VLGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.5869	-19
L-lactate dehydrogenase	Sea lamprey	36409	52	4	1	IVADKDYSVTAGSR	1480.7522	1480.77	12

Echantillon : anchois sec

Extraction B : 1.5M Tris, 50mM DTT, 0.5% SDS

Protéines de poisson identifiées	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Peptides spécifiques au poisson	Masse théo.	Masse exp.	Δm (ppm)
Myosin heavy chain, fast skeletal muscle	Common carp	221462	259	6	12	DFEISQLLSK	1178.6183	1178.5976	-18
						GGSFQTVSALFR	1268.6514	1268.6434	-6
						IEDEQSLGAQLQK	1457.7362	1457.7051	-21
						LEDEEEINAELTAK	1602.7624	1602.6779	-50
Tropomyosin-1 alpha chain	Zebrafish	32703	193	18	5	LVIVEGELER	1155.6499	1155.6906	35
						QLEDDLVALQK	1270.6769	1270.6746	-2
L-lactate dehydrogenase A chain	Common carp	36254	63	6	2	EELPAGPTNK	941.4454	941.4085	-50
						VIGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.6318	18
L-lactate dehydrogenase A chain	Patagonian blennie	36286	63	3	1	VLGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.6318	18
Parvalbumin-2	Zebrafish	11615	50	17	2	AFFVIDQDK	1081.5444	1081.5886	50
Parvalbumin beta	Whiting	11316	50	17	2	AFVVIDQDK	1081.5444	1081.5886	50

Echantillon : anchois sec

Extraction C : 7M urée, 2M thiourée, 50mM DTT, 50mM Tris, 4% CHAPS

Protéines de poisson identifiées	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Peptides spécifiques au poisson	Masse théo.	Masse exp.	Δm (ppm)
Myosin heavy chain, fast skeletal muscle	Common carp	221462	1681	18	34	EALVSQLTR	1015.5662	1015.5913	25
						DFEISQLLSK	1178.6183	1178.6026	-13
						DAQLHLDEAVR	1265.6364	1265.6167	-16
						GGSFQTVSALFR	1268.6514	1268.6166	-28
						KKDFEISQLLSK	1434.8082	1434.8842	50
						IEDEQSLGAQLQK	1457.7362	1457.7342	-1
						LAEKDEEMEQIK	1461.7021	1461.727	17
						ENQSVLITGESGAGK	1488.742	1488.7197	-15
						LQDAEESIEAVNSK	1531.7365	1531.723	-9
						LEDEEEINAELTAK	1602.7624	1602.7547	-5
						VGLLHSQNTSLINTK	1623.8944	1623.9128	11
						LQGEVEDLMIDVER	1644.8029	1644.8017	-1
						NSYEEALDHLETLK	1660.7944	1660.8536	36
						NLTEEMASQDESIK	1664.7563	1664.737	-12
TPGLMENYLVIHQLR	1782.9451	1782.9487	2						
TVSEKSEIQTALAEAEGTLEHEESK	2902.3567	2902.3766	7						
Tropomyosin-1 alpha chain	Zebrafish	32703	351	24	9	LVIVEGELER	1155.6499	1155.6465	-3
						QLEDDLVALQK	1270.6769	1270.6618	-12
						KLIVIVEGELER	1283.7449	1283.7041	-32
						SKQLEDDLVALQK	1485.8038	1485.8684	43
Tropomyosin-1 alpha chain	Golden grey mullet	32710	298	24	9	QLEDDLVALQK	1270.6769	1270.6618	-12
						SKQLEDDLVALQK	1485.8038	1485.8684	43
L-lactate dehydrogenase A chain	Killifish	36311	126	10	3	VIGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.5775	-27
						LKGEAMDQLQHGALFLK	1785.9447	1785.8582	-50
L-lactate dehydrogenase A chain	Eleginops maclovinus (Patagonian blennie)	36286	126	6	2	VLGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.5775	-27
Keratin, type II cytoskeletal 8	Zebrafish	57723	106	5	2	LESLTDEINFLR	1448.7511	1448.8027	36
						LEADLHNMQGLVEDFK	1857.8931	1857.8591	-18
Hemoglobin subunit beta-A	Five-ray yellowtail	16362	97	13	2	LHVDPDNFR	1111.5411	1111.5348	-6
						FLSVVVSALGR	1146.6761	1146.6722	-3
Parvalbumin-2	Zebrafish	11615	90	19	2	IGVDEFALLVK	1202.6911	1202.663	-23
Hemoglobin cathodic subunit alpha	Conger eel	15269	85	8	1	TIMGAVGDAVGK	1117.5802	1117.5942	13
Parvalbumin beta	Chub mackerel	11538	84	25	3	LFLQNFK	908.512	908.5431	34
						IGIDEFAAMIK	1222.6267	1222.6006	-21
Parvalbumin beta	Common carp	11429	74	15	2	LFLQNFK	908.512	908.5431	34
Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform	Grey mullet	20054	67	11	2	AGFEDYVEGLR	1254.5881	1254.5844	-3
						VAYNQIADIMR	1292.6547	1292.6301	-19
L-lactate dehydrogenase	Sea lamprey	36409	60	6	2	IVADKDYSVTAGSR	1480.7522	1480.7707	12

Myosin light chain 3. skeletal muscle isoform	Grey mullet	16358	58	7	1	GTYDDYVEGLR	1286.5779	1286.5797	1
Parvalbumin beta	Atlantic cod	11544	47	10	1	IGVDEFGAMIK	1194.5955	1194.6016	5
Parvalbumin beta	Alaska pollock	11500	47	10	1	IGVDEFAAMVK	1194.5955	1194.6016	5

Echantillon : bonite

Extraction A : eau acidifiée à 1% d'acide trifluoroacétique

Protéines de poisson identifiées	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Peptides spécifiques au poisson	Masse théo.	Masse exp.	Δm (ppm)
Myosin heavy chain. fast skeletal muscle	Common carp	221462	213	6	9	VAEQELVDASER	1344.6521	1344.6643	9
						IEDEQSLGAQLQK	1457.7362	1457.7446	6
						LQDAEESIEAVNSK	1531.7365	1531.7385	1
						LQGEVEDLMIDVER	1644.8029	1644.8027	0
						NLQQEISDLTEQLGETGK	2001.9855	2002.0005	8
Parvalbumin beta	Chub mackerel	11538	93	23	3	LFLQNFK	908.512	908.4971	-16
Parvalbumin alpha	Common carp	11444	65	10	1	IGVDEFAALVK	1160.6441	1160.6416	-2
Parvalbumin beta	Chub	11256	59	20	3	LFLQNFK	908.512	908.4971	-16
Hemoglobin subunit beta	Coelacanth	16861	41	5	1	LHLDEVGR	937.4981	937.4687	-31

Echantillon : bonite
Extraction B : 1.5M Tris, 50mM DTT, 0.5% SDS

Protéines de poisson identifiées	Taxonomic	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Peptides spécifiques au poisson	Masse théo.	Masse exp.	Δm (ppm)
Myosin heavy chain, fast skeletal muscle	Common carp	221462	835	18	36	AGLLGALEEMR	1158.6067	1158.5828	-21
						GGSFQTVSALFR	1268.6514	1268.6455	-5
						VAEQELVDASER	1344.6521	1344.6388	-10
						IEDEQSLGAQLQK	1457.7362	1457.7479	8
						LAEKDEEMEQIK	1461.7021	1461.745	29
						KVAEQELVDASER	1472.7471	1472.7428	-3
						LQDAEESIEAVNSK	1531.7365	1531.7398	2
						LAEKDEEMEQIKR	1617.8032	1617.8019	-1
						VGLLHSQNTSLINTK	1623.8944	1623.8942	0
						LQGEVEDLMIDVER	1644.8029	1644.789	-8
						NLTEEMASQDESIK	1664.7563	1664.738	-11
						VLNASVIPEGQFIDNK	1742.9203	1742.9043	-9
						NLQQEISDLTEQLGETGK	2001.9855	2002.0027	9
						SEIQTALAEAEGTLEHEESK	2229.0284	2229.04	5
LAQESIMDLENEKQQSDEK	2234.0372	2234.0378	0						
ENKNLQQEISDLTEQLGETGK	2373.1659	2373.1672	1						
Actin, alpha skeletal muscle A	Japanese pufferfish	41918	397	50	12	TTGIVLDAGDGVTHNVPVYEGYALPHAIMR	3165.5917	3165.5437	-15
L-lactate dehydrogenase A chain	Blackeye goby	36198	275	17	5	VIGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.6107	1
						IVGDKDYSVTANSR	1523.758	1523.7451	-8
						DLCDELALVDVMEDK	1763.7957	1763.7915	-2
Tropomyosin-1 alpha chain	Golden grey mullet	32710	243	29	9	LATALTKLEEAEK	1415.7871	1415.7924	4
Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform	Grey mullet	13658	225	33	5	IVLSTLGEK	958.5699	958.5746	5
						GTYYDDYVEGLR	1286.5779	1286.5726	-4
						ILGNPSADDMANK	1344.6343	1344.6358	1
						ILGNPSADDMANKR	1500.7354	1500.7418	4
Tropomyosin-1 alpha chain	Zebrafish	32703	193	16	6	LVIVEGELER	1155.6499	1155.6335	-14
						KLVIVEGELER	1283.7449	1283.7449	0
Actin, cytoplasmic 1	Mozambique tilapia	41740	181	18	5	LCYVALDFEQEMGTAASSSSLEK	2535.1509	2535.1728	31
Triosephosphate isomerase	Coelacanth	26715	174	23	5	FGVAAQNCYK	1156.5335	1156.5249	-7
L-lactate dehydrogenase A chain	Patagonian blennie	36286	170	8	3	VLGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.6107	1
Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform	Grey mullet	20054	152	19	3	IVLSTLGEK	958.5699	958.5746	5
						VAYNQIADIMR	1292.6547	1292.6448	-8

L-lactate dehydrogenase B chain	American eel	36452	148	7	2	VIGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.6107	1
						IVADKDYSVSANSR	1523.758	1523.7733	10
Hemoglobin subunit beta	Bluefin tuna	16171	55	17	2	CLIVYPWTQR	1334.6805	1334.6873	5
Parvalbumin beta	Chub mackerel	11538	54	23	3	LFLQNFK	908.512	908.5298	20
						AFAIIDQDK	1019.5287	1019.5263	-2
Creatine kinase, testis isozyme	Rainbow trout	42977	47	3	1	GGDDLDPNYVISSR	1506.6951	1506.7001	3

Echantillon : bonite

Extraction C : 7M urée, 2M thiourée, 50mM DTT, 50mM Tris, 4% CHAPS

Protéines de poisson identifiées	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Peptides spécifiques au poisson	Masse théo.	Masse exp.	Δm (ppm)
Myosin heavy chain, fast skeletal muscle	Common carp	221462	1048	19	35	VTFQLSAER	1049.5506	1049.5475	-3
						AGLLGALEEMR	1158.6067	1158.5991	-7
						VAEQELVDASER	1344.6521	1344.6455	-5
						IEDEQSLGAQLQK	1457.7362	1457.7438	5
						LAEKDEEMEIQIK	1461.7021	1461.7074	4
						KVAEQELVDASER	1472.7471	1472.75	2
						LQDAEESIEAVNSK	1531.7365	1531.7343	-1
						LAEKDEEMEIQIKR	1617.8032	1617.8063	2
						VGLLHSQNTSLINTK	1623.8944	1623.9003	4
						LQGEVEDLMIDVER	1644.8029	1644.7863	-10
						NLTEEMASQDESIK	1664.7563	1664.7361	-12
						VLNASVIPEGQFIDNKK	1871.0152	1871.0243	5
						NLQQEISDLTEQLGETGK	2001.9855	2001.996	5
						SEIQTALAEAEGTLEHEESK	2229.0284	2229.0361	3
LAQESIMDLENEKQQSDEK	2234.0372	2234.0374	0						
ENKNLQQEISDLTEQLGETGK	2373.1659	2373.1766	4						
Actin, alpha skeletal muscle A	Japanese pufferfish	41918	265	47	11	TTGIVLDAGDGVTHNVPVYEGYALPHAIMR	3165.5917	3165.5283	-20
Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform	Grey mullet	13658	224	33	5	IVLSTLGEK	958.5699	958.5798	10
						GTYDDYVEGLR	1286.5779	1286.5834	4
						ILGNPSADDMANK	1344.6343	1344.6346	0
						ILGNPSADDMANKR	1500.7354	1500.7471	8
Tropomyosin-1 alpha chain	Golden grey mullet	32710	182	29	9	LATALTKLEEAEK	1415.7871	1415.7994	9
Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform	Grey mullet	20054	173	19	3	IVLSTLGEK	958.5699	958.5798	10
						VAYNQIADIMR	1292.6547	1292.6659	9
Actin, cytoplasmic 1	Japanese pufferfish	41740	149	15	4	LCYVALDFEQEMGTAASSSSLEK	2535.1509	2535.1482	46
Tropomyosin-1 alpha chain	Zebrafish	32703	141	16	6	LVIVEGELER	1155.6499	1155.6434	-6
						KLVIVEGELER	1283.7449	1283.7444	0
L-lactate dehydrogenase A chain	Blackeye goby	36198	121	15	4	VIGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.6039	-5
						DLCDELALVDVMEK	1763.7957	1763.7797	-9
L-lactate dehydrogenase A chain	Patagonian blennie	36286	110	10	3	VLGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.6039	-5

Triosephosphate isomerase	Coelacanth	26715	105	24	6	FGVAAQNCYK	1156.5335	1156.5298	-3
Myoglobin	Sard	15787	86	32	4	LISEIIVK	913.5848	913.6018	19
						NVMAAVIADLEANYK	1620.8181	1620.8149	-2
						FWGVPVEADYTSHGGLVLR	2104.0378	2104.064	12
Creatine kinase. testis isozyme	Rainbow trout	42977	56	11	3	FEEVLKR	919.5127	919.4927	-22
						GGDDLDPNYVISSR	1506.6951	1506.6958	1
Parvalbumin alpha	Common carp	11444	52	18	2	IGVDEFAALVK	1160.6441	1160.6467	2
						AGDSDGDGKIGVDEFAALVK	1962.9535	1962.9423	-6

Echantillon : céramique imprégnée d'anchois

Extraction : 7M urée, 2M thiourée, 50mM DTT, 50mM Tris, 4% CHAPS

Protéines de poisson identifiées	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Peptides spécifiques au poisson	Masse théo.	Masse exp.	Δm (ppm)
Myosin heavy chain, fast skeletal muscle	Common carp	221462	308	16	29	EALVSQLTR	1015.5662	1015.5919	25
						VTFQLSAER	1049.5506	1049.5675	16
						DFEISQLLSK	1178.6183	1178.5753	-36
						DAQLHLDEAVR	1265.6364	1265.5795	-45
						GGSFQTVSALFR	1268.6514	1268.5915	-47
						KKDFEISQLLSK	1434.8082	1434.8836	50
						IEDEQLGAQLQK	1457.7362	1457.7921	38
						LQDAEESIEAVNSK	1531.7365	1531.7636	18
						IEDEQLGAQLQKK	1585.8311	1585.8682	23
						LAEKDEEMEIQKR	1617.8032	1617.8339	19
						QLEEKEALVSQLTR	1642.889	1642.8915	2
						LQGEVEDLMIDVER	1644.8029	1644.8196	10
						TPGLMENYLVIHQLR	1782.9451	1782.8768	-38
						VLNASVIPEGQFIDNKK	1871.0152	1870.7005	-50
NLQQEISDLTEQLGETGK	2001.9855	2001.941	-22						
ENKNLQQEISDLTEQLGETGK	2373.1659	2373.2033	16						
Actin, cytoplasmic 1	Mozambique tilapia	41740	78	19	7	LCYVALDFEQEMGTAASSSLEK	2535.1509	2535.1756	10
Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform	Grey mullet	13658	77	13	2	IVLSTLGEK	958.5699	958.6164	49
						GTYYDDYVEGLR	1286.5779	1286.5305	-37
Parvalbumin beta	Chub	11256	72	16	3	LFLQNFK	908.512	908.5506	43
						SGFIEEELKFLQNFK	2070.0673	2070.0351	-16
Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform	Grey mullet	20054	72	16	3	IVLSTLGEK	958.5699	958.6164	49
						AGFEDYVEGLR	1254.5881	1254.539	-39
						VAYNQIADIMR	1292.6547	1292.6077	-36
Hemoglobin subunit beta-A	Five-ray yellowtail	16362	63	12	2	VDWTD AER	990.4407	990.4726	32
						FLSVVVSALGR	1146.6761	1146.6544	-19
Tropomyosin-1 alpha chain	Zebrafish	32703	62	38	11	QLEDDLVALQK	1270.6769	1270.6149	-49
						SKQLEDDLVALQK	1485.8038	1485.8417	25
						SKQLEDDLVALQKK	1613.8988	1613.9063	5
						KLIVIVEGELERTEER	1798.9788	1798.9216	-32
						CSELEELKTVTNNMK	1923.8917	1923.794	-50
Tropomyosin-1 alpha chain	Golden grey mullet	32710	62	25	8	QLEDDLVALQK	1270.6769	1270.6149	-49
						SKQLEDDLVALQK	1485.8038	1485.8417	25
						SKQLEDDLVALQKK	1613.8988	1613.9063	5
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	Blue marlin	109176	42	3	2	EIVPGDIVEVSVGDKVPADIR	2206.1845	2206.2617	35

Echantillon : céramique imprégnée de bonite

Extraction : 7M urée, 2M thiourée, 50mM DTT, 50mM Tris, 4% CHAPS

Protéines de poisson identifiées	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Peptides spécifiques au poisson	Masse théo.	Masse exp.	Δm (ppm)
Actin, alpha skeletal muscle A	Japanese pufferfish	41918	527	50	11	TTGIVLDAGDGVTHNVPVYEGYA LPHAIMR	3181.5867	3181.5336	-17
Myosin heavy chain, fast skeletal muscle	Common carp	221462	520	8	14	VTFQLSAER	1049.5506	1049.5624	11
						GGSFQTVSALFR	1268.6514	1268.6259	-20
						IEDEQSLGAQLQK	1457.7362	1457.7917	38
						VLNASVIPEGQFIDNK	1742.9203	1742.9302	6
						TPGLMENYLVIHQLR	1782.9451	1782.9116	-19
NLQQEISDLTEQLGETGK	2001.9855	2001.9108	-37						
Myoglobin	Sard	15787	496	40	5	LISEIIVK	913.5848	913.5863	2
						AGMDAGGQQALR	1189.551	1189.5016	-41
						NVMAAVIADLEANYK	1620.8181	1620.8396	13
						FWGPVEADYTSHGGLVLTR	2104.0378	2104.0434	3
NVMAAVIADLEANYKELGFSG	2211.0881	2211.0893	1						
ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor	Common carp	55247	452	45	16	VLDTGAPIRIPVGPETLGR	1960.1106	1960.0432	-34
						QTAPIHAEPEFTDMSVEQEILVT GIK	2969.4692	2969.5100	14
Actin, cytoplasmic 1	Mozambique tilapia	41740	183	18	5	LCYVALDFEQEMGTAASSSSLEK	2535.1509	2535.2151	25
Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform	Grey mullet	13658	86	13	2	IVLSTLGEK	958.5699	958.5905	22
						GTYYDDYVEGLR	1286.5779	1286.5493	-22
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	Blue marlin	109176	83	3	2	EIVPGDIVEVSVGDKVPADIR	2206.1845	2206.2919	49
Creatine kinase, testis isozyme	Rainbow trout	42977	63	8	3	FEEVLKR	919.5127	919.5065	-7
						GGDDLDPNYVISSR	1506.6951	1506.7203	17
Hemoglobin subunit alpha	Goldfish	15426	49	11	1	TYFSHWSDLSPGSGPVK	1863.8792	1863.8330	-25
Hemoglobin subunit beta	Artedidraco orianae	15628	49	15	2	CLIVYPWTQR	1334.6805	1334.6383	-32
						LLSDCITIVVAAK	1401.7901	1401.8000	7
Hemoglobin subunit beta-1	Freshwater flathead	16394	49	15	2	CLIVYPWTQR	1334.6805	1334.6383	-32
						LLSDCLTIVVAAK	1401.7901	1401.8000	7
ATP synthase subunit a	Bigeye tuna	14982	45	8	1	LLTLQNWFIGR	1359.7663	1359.7478	-14
Citrate synthase, mitochondrial precursor	Skipjack tuna (Bonito)	52207	44	5	2	ALGVLAQLVWSR	1311.7663	1311.7047	-47
						GLVYETSVLDPEEGIR	1775.8941	1775.9219	16

Echantillon : céramique imprégnée de mélange anchois/bonite
Extraction : 7M urée, 2M thiourée, 50 mM DTT, 50mM Tris, 4% CHAPS

Protéines de poisson identifiées	Taxonomie	Poids moléculaire (Da)	Score	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Peptides spécifiques au poisson	Masse théo.	Masse exp.	Δm (ppm)
Myosin heavy chain, fast skeletal muscle	Common carp	221462	951	21	33	VTFQLSAER	1049.5506	1049.5675	16
						AGLLGALEEMR	1158.6067	1158.5707	-31
						DFEISQLLSK	1178.6183	1178.592	-22
						GGSFQTVSALFR	1268.6514	1268.6016	-39
						IEDEQSLGAQLQK	1457.7362	1457.7693	23
						QAYTQQIEELKR	1505.7838	1505.8445	40
						AGLLGALEEMRDEK	1530.7711	1530.8277	37
						LQDAEESIEAVNSK	1531.7365	1531.709	-18
						VGLLHSQNTSLINTK	1623.8944	1623.9148	13
						LQGEVEDLMIDVER	1644.8029	1644.8064	2
						NLTEEMASQDESIK	1664.7563	1664.7228	-20
						VLNASVIPEGQFIDNK	1742.9203	1742.9432	13
						TPGLMENYLVIHQLR	1782.9451	1782.9282	-9
						VLNASVIPEGQFIDNKK	1871.0152	1871.008	-4
						VKNLTEEMASQDESIK	1891.9197	1891.8897	-16
NLQQEISDLTEQLGETGK	2001.9855	2001.9605	-12						
SEIQTALEEAEGTLEHEESK	2229.0284	2229.1058	35						
LAQESIMDLENEKQQSDEK	2234.0372	2234.075	17						
Tropomyosin-1 alpha chain	Zebrafish	32703	190	28	8	LVIVEGELER	1155.6499	1155.6351	-13
						QLEDDLVALQK	1270.6769	1270.6464	-24
						CSELEELKTVTNNMK	1923.8917	1923.8207	-37
Actin, cytoplasmic 1	Mozambique tilapia	41740	178	26	8	EKLCYVALDFEQEMGTAASSSSLEK	2792.2884	2792.2712	-6
Triosephosphate isomerase	Coelacanth	26715	161	29	6	FGVAAQNCYK	1156.5335	1156.5263	-6
Myoglobin	Sard	15787	136	48	4	LISEIIVK	913.5848	913.626	46
						FWGVPVEADYTSHGGLVLTR	2104.0378	2104.0658	13
						NVMAAVIADLEANYKELGFSG	2211.0881	2211.1894	50
						FTGIAQADMAGNAAISAHGATVLK	2314.1739	2314.1866	5
Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform	Grey mullet	16358	118	33	4	IVLSTLGEK	958.5699	958.6111	43
						GTYYDYVEGLR	1286.5779	1286.5697	-6
						ILGNPSADDMANK	1344.6343	1344.6134	-16
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	Blue marlin	109176	104	8	6	EVTGSIELCR	1162.5652	1162.5399	-22
						EIVPGDIVEVSVGDKVPADIR	2206.1845	2206.2706	39
						SASEMVLADDNFSSIVAAVEEGR	2396.1165	2396.1251	4
Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform	Grey mullet	20054	96	25	4	IVLSTLGEK	958.5699	958.6111	43
						AGFEDYVEGLR	1254.5881	1254.5735	-12
						VAYNQIADIMR	1292.6547	1292.6274	-21
L-lactate dehydrogenase A chain	Killifish	36311	76	10	3	VIGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.6239	12
						DLCDELALVDVMDK	1763.7957	1763.782	-8
L-lactate dehydrogenase A chain	Blackeye goby	36198	75	22	5	VIGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.6239	12
						GEVMDLQHGSFLK	1572.797	1572.8262	19
						DLCDELALVDVMDK	1763.7957	1763.782	-8
						YSPNCILMVVSNPVDILTYVAWK	2681.3597	2681.4417	31
Creatine kinase, testis isozyme	Rainbow trout	42977	61	8	3	FEEVLKR	919.5127	919.5182	6
						GGDDLDPNYVISSR	1506.6951	1506.7145	13

L-lactate dehydrogenase A chain	Antarctic eelpout	36269	54	17	4	VIGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.6239	12
						GEVMDLQHGSFLK	1572.797	1572.8262	19
						YSPNCIIMVVSNPVDILTYVAWK	2681.3597	2681.4417	31
L-lactate dehydrogenase A chain	Patagonian blennie	36286	54	17	4	VLGSGTNLDSAR	1188.6099	1188.6239	12
						GEVMDLQHGSFLK	1572.797	1572.8262	19
						YSPNCILMVVSNPVDILTYVAWK	2681.3597	2681.4417	31
Nucleoside diphosphate kinase B	Shallow-water Cape hake	14197	54	23	2	MMLGETNPADSKPGSIR	1802.8655	1802.8555	-6
Hemoglobin subunit beta	Bluefin tuna	16171	47	19	3	CLIVYPWTQR	1334.6805	1334.6609	-15
						YFGAYGDLSTPDAIK	1616.7722	1616.7822	6
						YFGAYGDLSTPDAIKGNAK	1986.9687	1986.934	-17

Dealing with the identification of protein species in ancient amphorae

Sophie Dallongeville · Nicolas Garnier ·
Dario Bernal Casasola · Michel Bonifay ·
Christian Rolando · Caroline Tokarski

Received: 16 July 2010 / Revised: 2 September 2010 / Accepted: 12 September 2010 / Published online: 3 October 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract This manuscript deals with the identification of protein residues in amphorae, including particularly identification of protein species. The work described was performed on fishes, the anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and bonito (*Sarda sarda*) species frequently found in the Mediterranean area. Based on proteomic techniques, the analytical strategy was adapted to analysis of protein residues from tiny ceramic fragments. The major difficulty was to extract proteins and limit their hydrolysis during the sample preparation; consequently, multiple soft extraction

techniques were evaluated. The most valuable results were obtained using a solution containing high amounts of denaturing agents, urea and thiourea, reducing agent, dithiothreitol, and detergent, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate. The analysis using nano liquid chromatography–nano electrospray ionization double quadrupole time-of-flight mass spectrometry resulted in the identification of up to 200 proteins for the anchovy and bonito species, among which 73 peptides were found to be fish-specific. Because bonito and anchovy species are not documented and fully sequenced in genomic databases, the preliminary protein identification was realized via sequence homology to other fish sequenced species. Amino acid substitutions of peptides were assigned on the basis of the interpretation of tandem mass spectrometry spectra using de novo sequencing; these peptides, not reported up to now in databases, constitute species-specific markers. The method developed was finally applied to an archaeological sample replica impregnated with a mixture of fish tissue from both species; this experiment successfully led to the identification of 17 fish proteins, including 33 fish-specific peptides. This work shows that the analytical method developed has great potential for the identification of protein species in complex archaeological samples.

Published in the special issue *Analytical Chemistry for Cultural Heritage* with Guest Editors Rocco Mazzeo, Silvia Prati, and Aldo Roda.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-010-4218-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Dallongeville · C. Rolando · C. Tokarski (✉)
Miniaturisation pour l'Analyse, la Synthèse & la Protéomique
(MSAP), USR CNRS 3290, and Protéomique,
Modifications Post-traductionnelles et Glycobiologie, IFR 147,
Université de Lille 1 Sciences et Technologies,
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France
e-mail: Caroline.Tokarski@univ-lille1.fr

N. Garnier
SARL Laboratoire Nicolas Garnier,
63270 Vic le Comte, France

D. B. Casasola
Facultad de Filosofía y Letras, Depto. Historia,
Geografía y Filosofía, Universidad de Cádiz,
11003 Cádiz, Spain

M. Bonifay
UMR CNRS 6573, Maison Méditerranéenne des Sciences de
l'Homme (MMSH), Centre Camille Jullian,
13094 Aix-en-Provence Cedex, France

Keywords Protein species · Archaeological ceramics ·
Proteomics · Tandem mass spectrometry · Amino acid
substitution

Introduction

Archaeological remains constitute valuable evidence of activities of ancient civilizations. Besides the study of ancient texts, the preservation and the study of such

artifacts contribute to a better understanding of the cultural and socioeconomic context in which our ancestors lived. Ceramics, and more particularly amphorae, are the most abundant objects found during archaeological excavations and can be considered as real witnesses of the uses and habits of the oldest civilizations. These containers constitute a favored tool to evaluate trade exchanges during antiquity in the Mediterranean basin [1–3]. However, even though their typology and their production sites are now well understood [4–9], several questions remain unanswered concerning their content, even leading to false assumptions about the products exchanged (oil, wine, fish sauce, etc.). The traditional approach, consisting in studying the shape, the economic context of the production area, or the workshop situation, does not succeed in solving this problem and the use of analytical chemistry techniques appears essential. However, owing to the small quantities of organic traces preserved and their degradation state, analysis of archaeological objects represents a real challenge. With the intention to establish a relationship between the container shape and its use [10], specific experimental procedures have to be developed to analyze the traces of different organic compounds that may be present in archaeological ceramics.

Because of their hydrophobicity, lipids have a strong capacity to resist natural leaching and therefore these organic compounds [11] have been widely investigated, indicating the presence of oils [12, 13], fats [14, 15] or waxes [16] in ceramics. Studies looking for other classes of organic compounds such as the degraded products from tannins [17] and polyphenols [18], were realized to reveal the vinery content of amphorae. Archaeobotanical methods based on pollen analysis [19] were also considered to highlight the presence of plant-based beverages such as wine and mead in archaeological containers. Regarding marine products such as fish and shells, traces of polyunsaturated fatty acids in archaeological pottery have been described as specific markers [20]. Additionally, encouraging data were obtained from analysis of ancient DNA fragments inside amphorae from a fourth century BC wreck and revealed the presence of olive oil, oregano, and resins of various types commonly added to ancient wine [21, 22]. DNA from fish bone remains were, in particular, analyzed from archaeological sites [23, 24] and recent studies have linked DNA to protein analysis in the case of fossilized bones of a 68-million-year-old dinosaur [25]. In fact, owing to the preservation conditions of archaeological samples which denature the proteins and natural leaching, analysis of proteins in archaeological samples [26] represents one of the most difficult tasks to achieve.

Considering more generally protein analysis techniques applied to cultural heritage samples, different methods have been proposed in the literature, especially concerning

painting samples. First, techniques based on staining methods using Coomassie blue dye [27–29], naphthol blue black dye at different pH values [30, 31], or Ponceau S [32] were proposed with the intention to detect proteins in paint cross sections. At the same time, studies regarding antibody specificity via immunofluorescence experiments [33–35] allowing more specific staining were achieved and both techniques are still in use [36–38]. Less specific than immunofluorescence, techniques based on the determination of the composition of amino acids, resulting from the hydrolysis of the proteins present in the sample, by various analytical methods, such as high-performance liquid chromatography or gas chromatography coupled with UV–vis spectrophotometry or mass spectrometry [39–42], were developed. Although such analytical methods require standard amino acid profiles to achieve protein identification, they have been widely used for cultural heritage sample analysis [26]. Other studies have been undertaken to demonstrate the possibility of pyrolysis coupled with methylation, gas chromatography, and mass spectrometry to characterize proteinaceous binding media [43–45].

All the methods previously described allow the detection or identification of proteins in paintings but they do not provide protein structural information. To solve this problem, proteomic techniques were recently adapted to the analysis of cultural heritage samples. The first application of proteomics in cultural heritage was introduced few years ago with the study of a Renaissance painting and led to the exact identification of egg yolk and egg white proteins in the binding medium [26, 46–48]. Based on these techniques, the use of proteomics in this field developed considerably recently [49–52]. For archaeological vessels, the proteomic approach was applied for the first time on potsherds from Alaska. The analysis was performed on samples without visible residues and, succeeded in identifying proteins from muscles of cetacean, pinniped, and seal species [53].

The current work presents an analytical method that focuses on samples from more damaging environments. In this study, identification of fish protein residues from impregnated ceramics and their species of origin were investigated. More precisely, the analytical method was developed and optimized on anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and bonito (*Sarda sarda*) species, two species largely consumed by past civilizations. The analytical development was firstly investigated on fish tissues and finally applied to a few cubic millimeters of extensively washed ceramics impregnated with fish tissues. The main difficulty of the method proposed here, based on proteomic methodology including protein extraction, enzymatic hydrolysis, and nano electrospray ionization double quadrupole time-of-flight (ESI-Qq-TOF) tandem mass spectrometry (MS/MS) analysis, was to find reliable protein extraction conditions

allowing the identification of the highest number of proteins starting from low sample amounts to highlight the presence of species-specific peptides in the sample. Finally, this study shows that it is possible to discriminate fish species using extensive interpretations of MS/MS spectra resulting from the MS/MS analysis.

Experimental

Chemicals and reagents

Trifluoroacetic acid (TFA), urea, thiourea, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 1,4-dithiothreitol (DTT), Trizma® base (Tris), Trizma® hydrochloride [tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride] (Tris HCl), sodium dodecyl sulfate (SDS), Trizma® hydrochloride, trifluoroethanol (TFE), iodoacetamide, ammonium bicarbonate and ammonium hydroxide solution were obtained from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesnes, France). Trypsin was purchased from Promega (Charbonnières, France). The molecular grinding resin was obtained from Genotech (St Louis, MO, USA). Deionized water was provided by a Milli-Q ultrapure water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Fish samples

Anchovies (*Engraulis encrasicolus*), stored in ice, were freshly bought at the local market (Lille, France). The bonito (*Sarda sarda*), salted according to the traditional Mediterranean method, was locally produced by local fishermen at Ceuta, Spain, and it was bought directly in the production area (El Chorrillo beach).

Ceramic replica

A piece of ceramic, traditionally manufactured, was provided by a local artisan; Ceramica El Colorado, Crta. Cádiz-Málaga, Conil, Cádiz, Spain. To make a replica of an archaeological sample, a piece of this artisanal ceramic was impregnated with fish, i.e., anchovy and/or bonito.

Ceramic impregnation

The impregnation with anchovy was performed by crushing approximately 100 mg of fresh anchovy on the ceramic surface with a pestle, whereas for the impregnation with bonito, approximately 100 mg of dry bonito was crushed in a mortar and a pestle with 100 µl of deionized water to obtain a paste that was then spread on the ceramic surface. The resulting impregnated ceramics were stored at room temperature for 3 months before analysis.

Analytical procedure

The analytical method was divided into four major steps: protein extraction, enzymatic hydrolysis, analysis of the generated peptides using MS/MS, and protein and species identification using specific bioinformatic tools.

Extraction of fish proteins

A sample of 10 mg of fish muscles was finely crushed in 150 µl protein extraction solution using a mortar and a pestle with a single-use synthetic resin (guaranteed free of proteins, RNA, and DNA). Four different solutions were evaluated for protein extraction: (1) acidified water with 1% TFA (solution A) [53], (2) a solution composed of 1.5 M Tris, 50 mM DTT, 0.5% SDS, pH 8.5 (solution B), (3) a solution containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 50 mM DTT, 50 mM Tris, pH 8.5 (solution C), and (4) a solution containing 7 M urea, 2 M thiourea, 0.5% SDS, 50 mM DTT, 50 mM Tris, pH 8.5 (solution D). Each sample was maintained for 1.5 h at room temperature for protein extraction. The supernatant was obtained after centrifugation of the mixture at 12,000 rpm for 10 min at 20 °C (Allegra™ 64 R centrifuge; Beckman Coulter™, Brea, CA, USA). For each sample, the totality of the extraction supernatant was dialyzed against deionized water overnight by using Slide-A-lyzer MINI dialysis units with 3,500 molecular weight cutoff (Pierce, Rockford, IL, USA). The extraction supernatants were concentrated by a vacuum centrifuge (Concentrator 5301; Eppendorf, Hamburg, Germany) and suspended in 50 µl deionized water. The experiment was performed on fresh anchovy, on dried anchovy, and on salted bonito and, finally, on a mixture of both fishes.

Protein extraction from an archaeological replica

Samples of ceramic previously impregnated with fish (anchovy, bonito, and with both fish species) were collected (approximately 4-mm² surface area × 1-mm height each). The surface of the ceramic was scrapped to remove fish residues. Extensive cleaning of the ceramics was performed using deionized water; in detail 500 µl of deionized water was flowed on the ceramics ten times. Samples were crushed in 100 µl extraction solution using a mortar and pestle with a single-use synthetic resin. The protein extraction was performed using the most efficient buffer, i.e., the solution C. Each sample was maintained for 1.5 h at room temperature for protein extraction. After centrifugation of the mixture at 12,000 rpm for 10 min at 20 °C, the supernatants were dialyzed against deionized water overnight. Finally, the samples were concentrated by a vacuum centrifuge and suspended in 5 µl deionized water.

Protein enzymatic hydrolysis

For each sample, the enzymatic hydrolysis was realized on 5 μl extraction supernatant previously desalted and suspended in deionized water. The proteins were denatured using 45 μl denaturing buffer composed of 50 mM Tris, 4 mM DTT and 60% TFE, and the resulting mixtures were incubated at 70 °C for 2 h. After the reaction mixture had been cooled, cysteine thiol groups were alkylated to the stable carbamidomethylcysteine by treating them with 5 μl freshly prepared 50 mM iodoacetamide in the dark at room temperature for 1 h. Then, the samples were diluted with 50 mM ammonium bicarbonate (pH 8.8) and enzymatic hydrolysis was realized by directly adding trypsin (100 ng/ μl in 50 mM ammonium bicarbonate, pH 8.8) to the mixtures. Finally, the samples were incubated at 37 °C overnight. After concentration by a vacuum centrifuge, the samples were suspended in 10 μl of water acidified with 0.1% formic acid.

Analysis of peptides using tandem mass spectrometry and identification of protein/species using bioinformatic tools

The peptide sequence spectra were obtained using nano liquid chromatography (nanoLC; Ultimate LC system, Dionex, LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) online with a Q-star Pulsar mass spectrometer (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA). An LC Packings Famos autosampler aspirated 1 μl of the peptide solution into a 10- μl sample loop using 95:5 water/acetonitrile (ACN), 0.1% formic acid as the transfer reagent. A Switchos pump was used to concentrate and desalt the sample on a C₁₈ nanoprecolumn. The precolumn was connected with a C₁₈ Pepmap column, and peptides were eluted at 200 nl/min using an Ultimate LC system. The elution was performed using a gradient of solvent A (95% H₂O, 5% ACN, 0.1% formic acid) and solvent B (75% ACN, 25% H₂O, 0.1% formic acid): solvent A was run for 5 min, solvent B was increased to 25% in 15 min, increased from 25 to 40% in 60 min, then increased to 100% in 10 min, kept for 5 min at 100%, and finally decreased to 0% in 5 min. The column was allowed to reequilibrate for 15 min before another run. The nanoLC system was online with the nanoESI-Qq-TOF mass spectrometer. Detection was carried out in positive mode with 1.8 kV, and the spectra were acquired in the m/z 300–2,000 range. The data acquisition was controlled by Bioanalyst (Applied Biosystems) with a detection cycle time of 10 s. Fragmentation was triggered for doubly and triply charged species reaching an intensity threshold of 30 counts with a collision energy related to the selected species charge state. Once selected and fragmented, eluted species were excluded from the MS/MS selection for 10 s using 0.3-Da mass window exclusion.

The spectra corresponding to peptide sequences were submitted to Analyst (Applied Biosystems) and protein identifications were realized using a local version of Mascot against the Swiss-Prot database. The generated mass data in Mascot format were postcalibrated using an in-house program before an extensive database search. In detail, a first search was performed using raw data and the most intense peptides identified were used for internal calibration. This calibration was then applied to the whole data set. No restrictions were placed on the species or the mass for the MS/MS experiments. The mass tolerance was set at 50 ppm on precursor ions and 50 mmu on fragment ions. A tolerance of one missed cleavage site was set. Carbamidomethylation and methionine oxidation were entered as variable modifications and the trypsin enzyme was specified. A first identification was performed with the previously detailed parameters and a second one adding the error-tolerant mode to the previous parameters. All MS/MS spectra resulting from the samples and leading to protein identification were manually checked to verify sequence assignments.

Results and discussion

The purpose of this work was to develop an analytical strategy to identify proteins, and more particularly protein species, contained in ancient amphorae starting from limited amounts of denaturated samples. The method presented was performed on fishes, anchovy and bonito; both found frequently in the Mediterranean area and known to have been consumed by past civilizations. Finally, the analytical strategy was applied to ceramics impregnated with fish and a fish mixture, extensively washed before analysis.

Selection of the protein extraction conditions

The first aim of this work was to find the most efficient protein extraction procedure to allow identification of the main fish proteins starting from very low sample amounts. Different extraction solutions were evaluated against 1% TFA acidified water, which had been used to extract proteins from archaeological potsherds in previous studies [53]. This solution was compared with proteomic buffers containing high amounts of denaturing agents (urea, thiourea), reducing agent (DTT), and detergents (CHAPS or SDS). The different protein extraction procedures were firstly applied on ten milligrams of fresh anchovy, dry anchovy, and dry bonito muscle tissues. Samples were finely crushed in the extraction solutions using a mortar and pestle with a single-use synthetic resin [48]. Once the proteins had been extracted, an enzymatic hydrolysis was performed and the resulting peptide mixture was analyzed by nanoLC nanoESI-Qq-TOF MS/MS.

Table 1 Number of proteins identified by Mascot for fish muscle samples and impregnated ceramic samples with the different extraction solutions evaluated. The details of the extraction solution compositions are presented in “Experimental”

Samples	Extraction solutions	Numbers of proteins identified	Numbers of fish proteins identified	Numbers of different fish proteins identified
Fresh anchovy	1% TFA (A)	25	6	3
	DTT/SDS (B)	40	8	4
	Urea/thiourea/DTT/CHAPS (C)	56	10	5
Dry anchovy	1% TFA (A)	40	6	3
	DTT/SDS (B)	23	6	4
	Urea/thiourea/DTT/CHAPS (C)	106	17	7
Dry bonito	1% TFA (A)	22	6	4
	DTT/SDS (B)	102	15	9
	Urea/thiourea/DTT/CHAPS (C)	107	14	9
Ceramic impregnated with anchovy	Urea/thiourea/DTT/CHAPS (C)	52	9	6
Ceramic impregnated with bonito	Urea/thiourea/DTT/CHAPS (C)	143	14	9
Ceramic impregnated with anchovy/bonito mixture	Urea/thiourea/DTT/CHAPS (C)	131	17	11

TFA trifluoroacetic acid, DTT 1,4-dithiothreitol, SDS sodium dodecyl sulfate, CHAPS 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

The protein identification was realized using Mascot without taxonomy restriction. Owing to the lack of fish protein sequences in the proteomic/genomic databases, the protein identification was made using sequence homology to other fish species. As extraction solutions based on CHAPS and SDS detergents (solutions C and D) resulted in similar data, only the results obtained with CHAPS will be presented here. Considering the results presented in Table 1 and focusing on identified fish proteins, it can be noticed that the extraction based on the solution containing high amounts of denaturants, reducing agent, and detergent (solution C) was the most efficient and led to the identification of the largest set of fish proteins compared with the extractions based on the solutions containing acidified water (solution A) or reducing agent and detergent without denaturant (solution B); these results can be explained considering the lipidic environment of proteins

in fish tissues. For example, for the dry anchovy sample, 40 proteins were identified using acidified water solution and 23 using the DTT/SDS solution versus 106 proteins extracted using the proteomic-based solution (solution C). As a consequence, this last extraction solution was evaluated on ceramic samples impregnated with fish to mimic the archaeological environment.

In detail, artisanal ceramic pieces were impregnated with anchovy and/or bonito and kept left in the laboratory at room temperature without any particular care to make the proteins penetrate the clay matrix. After 3 months, the layer containing dried fish on the ceramic surface (Fig. 1a) was removed and the ceramic was extensively washed with deionized water to get rid of the remaining fish residues, as shown in Fig. 1b. A very small sample fragment of 4-mm² surface area×1-mm height of impregnated ceramic was sampled and used for protein extraction, i.e., the sample

Fig. 1 **a** A piece of ceramic impregnated with anchovy tissues; sample size approximately 40 mm×25 mm×10 mm. **b** A fragment of the piece of impregnated ceramic that was extensively washed with deionized water before the protein extraction and analysis were performed; sample size approximately 15 mm×10 mm×10 mm

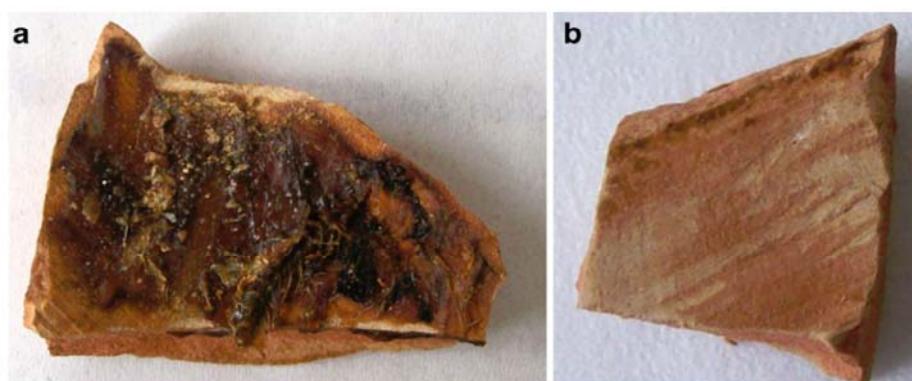


Table 2 Proteins identified by sequence homology to other fish species using Mascot from anchovy and bonito muscle samples and impregnated ceramics with the most efficient extraction solution, i.e., proteomic buffer based on urea, thiourea, DTT, and CHAPS (solution C)

Protein name	Taxonomy	Molecular mass (Da)	Accession number	Fresh anchovy	Dry anchovy	Dry bonito	Ceramics impregnated with anchovy	Ceramics impregnated with bonito	Ceramics impregnated with anchovy/ bonito mixture
Myosin heavy chain, fast skeletal muscle	Common carp	221,462	Q90339	x	x	x	x	x	x
Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform	Grey mullet	20,054	P82159	x	x	x	x		x
Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform	Grey mullet	13,658	P82160	x	x	x	x	x	x
Tropomyosin-1 α chain	Zebrafish	32,703	P13104	x	x	x	x	x	x
	Golden grey mullet	32,710	P84335	x	x	x	x		
Actin, α anomalous	Japanese pufferfish	41,952	P53483	x	x				
Actin, α skeletal muscle A	Japanese pufferfish	41,918	P68140			x		x	x
Actin, cytoplasmic 1	Japanese pufferfish	41,740	P68142			x			
	Mozambique tilapia	41,740	P68143				x	x	x
Parvalbumin α	Common carp	11,444	P09227			x			
Parvalbumin β	Chub mackerel	11,538	P59747	x	x		x		
	Common carp	11,429	P02618	x	x				
	Atlantic cod	11,544	Q90YK9		x				
	Alaska pollock	11,500	Q90YK8		x				
Parvalbumin-2	Zebrafish	11,615	Q9I8V0		x				
L-Lactate dehydrogenase	Sea lamprey	36,409	P33571		x				
L-Lactate dehydrogenase A chain	White crocodile fish	36,160	P69080	x					
	Patagonian blennie	36,286	O93542	x	x	x			x
	Blackeye goby	36,198	O93401			x			x
	Killifish	36,311	Q92055		x				x
	Antarctic eelpout	36,269	Q9PW58						x
Hemoglobin subunit α	Goldfish	15,426	P02018					x	
Hemoglobin cathodic subunit α	Conger eel	15,269	P83479		x				
Hemoglobin subunit beta	Bluefin tuna	16,171	P11749						x
Hemoglobin subunit β -A	Five-ray yellowtail	16,362	Q9PVM2		x		x		
Hemoglobin subunit β -1	Freshwater flathead	16,394	P83624					x	
Myoglobin	Sard	15,787	Q9DGJ0			x		x	x
Creatine kinase, testis isozyme	Rainbow trout	42,977	P24722			x		x	x
Keratin, type II cytoskeletal 8	Zebrafish	57,723	Q6NWF6		x			x	
Troponin C, skeletal muscle	European freshwater eel	18,120	P81660			x			
Triosephosphate isomerase	Coelacanth	26,715	P00941			x			x
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	Blue marlin	109,176	P70083				x	x	x
ATP synthase subunit β , mitochondrial precursor	Common carp	55,247	Q9PTY0					x	x
ATP synthase subunit α	Bigeye tuna	14,982	Q36090					x	
Citrate synthase, mitochondrial precursor	Skipjack tuna (bonito)	52,207	Q6S9V7					x	
Nucleoside diphosphate kinase B	Shallow-water Cape hake	14,207	P85281						x

was crushed in the proteomic-based extraction solution. The aim of this experiment was to estimate the efficiency of the extraction procedure for very low amounts of proteins trapped in ceramics. As for fish muscle samples, no taxonomy restriction was set and protein identification was undertaken in the complete Swiss-Prot database. As result, a total of 52 and 143 proteins were identified for ceramics impregnated with anchovy and bonito, respectively. More interestingly, it can be noticed that myosin and tropomyosin proteins, the main muscle proteins, were identified using proteomic-based extraction solutions in fish tissues but also in the impregnated ceramics despite the very low protein amount estimated to be present in the samples; these two main proteins of fish muscle tissues represent good markers of fish protein detection. The detailed list of fish proteins identified in anchovy and bonito tissues and in the impregnated ceramic samples is presented in Table 2.

This result indicates that the method is well adapted to the analysis of proteins trapped in ceramics and, additionally, is suitable for samples containing limited amounts of proteins.

Identification and sequencing of fish-specific species peptides

Commonly, proteins from different species have a great sequence homology and differ just by a few amino acids in their respective sequence; 97% of sequence homology is found between myosin heavy chain fast skeletal muscle protein from the common carp (*Cyprinus carpio*) and from the silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) as an example (<http://services.uniprot.org/blast>). The consequence of the sequence homology is that only a few peptides are species-specific and can be used as species markers. Concerning fish proteins identified in the muscle samples, the peptide sequences identified by Mascot on the basis of the MS/MS spectra generated show that several peptides are common to a large panel of species. For example, the myosin heavy chain protein identified from the bonito sample was identified by sequence homology to the common carp; in detail, 35 constitutive peptides of the protein were identified, among which 19 are common to multiple species and 16 are specific to fish species. The detailed results of fish-specific peptides from all identified proteins are presented in the [Electronic supplementary material](#) for each sample (fresh/dry anchovy and bonito) and for the different protein extraction solutions evaluated. A total of 36 and 37 fish-specific peptides with different sequences were identified for anchovy and bonito, respectively, using the proteomic-based extraction solution (solution C), these peptides representing a database of fish markers.

Focusing more precisely on the identified fish-marker peptide sequences, one can see that some peptides are common to several fish species; for example, the sequence LFLQNFK (Table S3) identified in the fresh anchovy

sample is a peptide of the parvalbumin β protein expressed in chub mackerel (*Scomber japonicus*) and common carp (*Cyprinus carpio*) species. The identification of this peptide may indicate the presence of a fish product but cannot give accurate and conclusive information regarding the fish species. Investigating more precisely the MS/MS spectra generated for the fish samples analyzed, some peptide sequences differ by one amino acid compared with the sequence assigned by sequence homology to other fish species. Focusing on the myosin heavy chain protein identified by sequence homology to the common carp, we can pointed out that 15 and nine peptides differ by one amino acid in their sequence for the anchovy and bonito

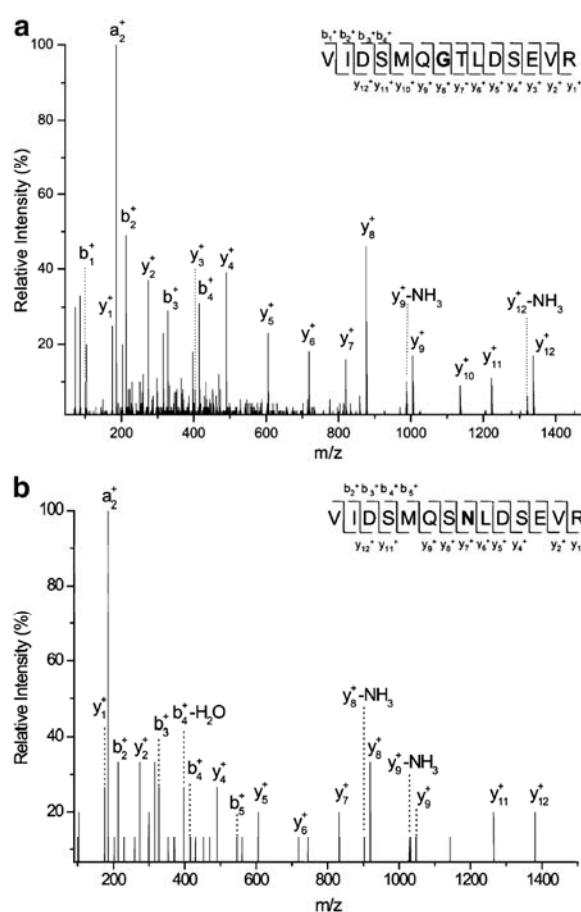


Fig. 2 **a** Tandem mass spectrometry (MS/MS) spectrum of the doubly charged ion at m/z 775.370 ($\Delta m = -12$ ppm) from the hydrolyzed extract of anchovy muscles and showing the y and b fragments of the peptide sequence VIDSMQGTLDSEVR. **b** MS/MS spectrum of the doubly charged ion at m/z 796.872 ($\Delta m = -13$ ppm), from the hydrolyzed extract of bonito muscles and showing the y and b fragments of the peptide sequence VIDSMQSNLDSEVR. Identified peptide sequences differ by one amino acid from the peptide 1594-1607 (VIDSMQSTLDSEVR) of the myosin heavy chain from the common carp

species, respectively. For example, the sequence of the peptide 1594–1607 of the myosin heavy chain is VIDSMQSTLDSEVR for the common carp. The MS/MS spectrum of this peptide obtained for the anchovy sample (Fig. 2a) allows the sequence VIDSMQGTLDSEVR to be identified using the y_1^+ to y_{12}^+ ions and the b_1^+ to b_4^+ ions, highlighting the substitution of the seventh residue, serine, by glycine. The MS/MS spectrum obtained for the bonito sample (Fig. 2b) allowed precise identification of the peptide sequence VIDSMQSNLDSEVR using the y_1^+ , y_2^+ , y_4^+ to y_9^+ , y_{11}^+ , y_{12}^+ , and b_2^+ to b_5^+ ions, proving the substitution of the eighth residue, threonine, by asparagine. The details of the amino acid substitutions regarding the myosin heavy chain peptides are listed in Table 3 for the anchovy and bonito species. As a conclusion, we can affirm that on the basis of MS/MS spectra, exact peptide sequences allowing the discrimination between the

anchovy and bonito species can be assigned despite the lack of proteins/species in the proteomic databases.

Considering the previous results, extensive MS/MS spectra analysis from peptides issued from impregnated ceramic were investigated to sequence such specific peptides. As for the fish samples, most of the peptides identified were common to other species; however, despite the low sample amounts analyzed, 31 and 27 fish-specific peptides were identified from the ceramics impregnated with anchovy and bonito, respectively. The complete list of fish-specific peptides identified for these samples is detailed in the [Electronic supplementary material](#). Focusing on the myosin heavy chain identified by sequence homology to the common carp, 16 and 6 fish-specific peptides were identified from the ceramics impregnated with anchovy and bonito, respectively. The MS/MS spectra obtained for these samples were carefully analyzed, and resulted in the

Table 3 Amino acid substitutions identified using tandem mass spectrometry spectra of fresh/dry anchovies, bonito, and ceramics impregnated with anchovy and/or bonito. The detailed peptide sequences and positions are obtained from the myosin heavy chain protein of the common carp

Peptide sequences	Positions	Amino acid substitutions	Fresh anchovy	Dry anchovy	Bonito	Ceramic impregnated with anchovy	Ceramic impregnated with bonito	Ceramic impregnated with anchovy/bonito mixture
IAYLMGLNSADMLK	386-399	M5→L			x		x	x
TPGLMENYLVIHQLR	681-695	Y8→F		x			x	x
LALLVTMTQALCR	782-794	L3→S		x				
ETNERLEDEEEINAELTAK	922-940	N3→T	x	x				
LEDEEEINAELTAK	927-940	A13→G			x			
NLTEEMASQDESIK	978-992	A14→G	x	x				
NLTEEMASQDESIKLTAK	978-995	A14→G				x		
TKLEQQVDDLEGSLEQEK	1026-1043	T1→A					x	
LAQESIMDLENEKQQSDEK	1062-1080	E12→D	x	x				x
KKDFEISQLLSK	1083-1094	I6→T	x	x				
IEELEEEIEAER	1116-1127	L4→V		x				
MEIDDLTNSMEAVAK	1227-1241	T7→S			x	x		
ANSLAANLDK	1436-1445	S3→A			x			
YEEESQAELEGAQK	1461-1473	S4→G			x			
NSYEEALDHLLETALK	1487-1500	H9→Q	x	x				
NSYEEALDHLLETALKR	1487-1501	H9→Q	x			x		x
SEIQTALEEAEGTLEHEESK	1539-1558	Q9→L		x				
VIDSMQSTLDSEVR	1594-1607	S7→G	x	x		x		
VIDSMQSTLDSEVR	1594-1607	T8→N			x			
DAQLHLDEAVR	1653-1663	E8→D		x	x			
GQEDMKEQVAMVER	1664-1677	E3→D	x	x				
GQEDMKEQVAMVER	1664-1677	Q2→H			x			x
KVAEQELVDASER	1701-1713	A10→V						x
VAEQELVDASER	1702-1713	A9→V	x	x		x		x
LDEAESLAMK	1798-1807	S6→N	x	x	x	x		x
ELEAEVEAEQR	1822-1832	A4→T	x	x				

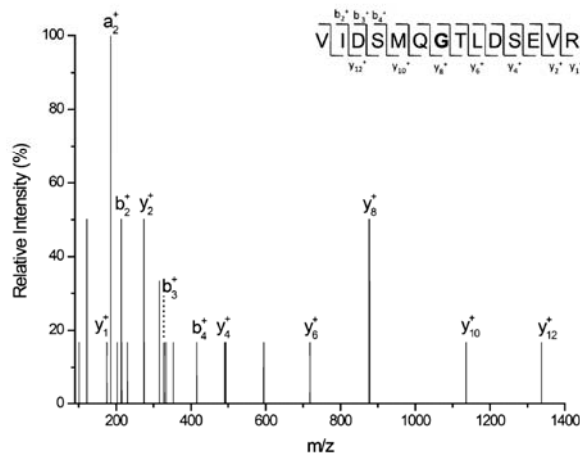


Fig. 3 MS/MS spectrum of the doubly charged ion at m/z 775.390 ($\Delta m=14$ ppm) from the hydrolyzed extract of proteins from ceramics impregnated with anchovy tissue and showing the y and b fragments of the peptide sequence VIDSMQGLDSEVR. Identified peptide sequence differs by one amino acid from peptide 1594-1607 (VIDSMQSTLDSEVR) of the myosin heavy chain identified using sequence homology to the common carp

identification of six and three specific peptides of anchovy and bonito (with amino acid substitution) from the impregnated ceramics (Table 3).

Taking the example of the previously detailed peptide 1594-1607 from the myosin heavy chain identified by sequence homology to the common carp (sequence VIDSMQSTLDSEVR), we can highlight that the MS/MS spectrum resulting from the analysis of ceramics impregnated with anchovy (Fig. 3) allowed identification of the sequence VIDSMQGLDSEVR; this sequence was already identified in the anchovy muscle sample (Fig. 2a). It can be pointed out that despite the very low protein amount analyzed (no visible residues on the extensively washed analyzed ceramics) and despite the low spectrum intensity, the peptide sequence could be successfully identified using a series of y_1^+ , y_2^+ , y_4^+ , y_6^+ , y_8^+ , y_{10}^+ , and y_{12}^+ ions completed by b_2^+ to b_4^+ ions.

Species discrimination in a complex sample

On the basis of the previous methodological development identifying specific peptides of anchovy and bonito species in impregnated ceramics, analysis of a ceramic impregnated with a mixture of both fishes was investigated. The analysis of the resulting peptide mixture with the nanoLC nanoESI-Qq-TOF mass spectrometer succeeded in identifying 131 proteins, with 17 fish proteins, as shown in Table 2; the detailed list of fish-specific peptides identified is given in the Electronic supplementary material. As for previous samples analyzed, i.e., fish muscles and ceramics impregnated

with one fish species, the myosin heavy chain from the common carp was the protein identified in the first hit with the highest score (see the Electronic supplementary material for details). More interestingly, considering in detail the peptides identified for this protein, we identified a total of 33 peptides and among these peptides, 18 were fish-specific.

It has been demonstrated previously that, by assigning the exact peptide sequences to the MS/MS spectra obtained, amino acid substitution can be highlighted, allowing the discrimination between anchovy and bonito. Consequently, the MS/MS spectra obtained from the analysis of the ceramic impregnated with the fish mixture led to the identification of eight peptides with a single amino acid substitution. Among the assigned sequences, two peptides were common to both species and did not allow species discrimination, i.e., peptide 681-695, with the substitution of the eighth amino acid (tyrosine) by phenylalanine, and peptide 1798-1807, with the substitution of the sixth amino acid (serine) by asparagine. More interestingly, several sequences were characteristic of the anchovy and bonito, respectively. As an example, one amino acid substitution was identified in peptide 1702-1713 (VAEQELVDASER) of the myosin heavy chain characterized by sequence homology to the common carp. Using the y_1^+ to y_{11}^+ and b_2^+ to b_5^+ ions obtained from the MS/MS spectrum (Fig. 4), we identified the sequence VAEQELVDVSR in the ceramics impregnated with the fish mixture, showing the substitution of the ninth amino acid (valine) by alanine. This amino acid substitution was previously identified in the anchovy tissues and anchovy-impregnated ceramic.

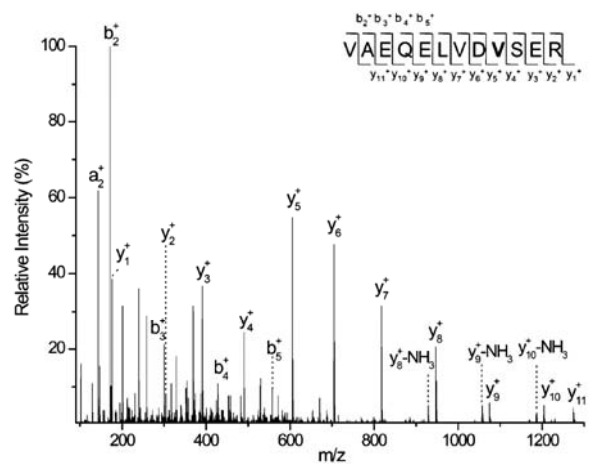


Fig. 4 MS/MS spectrum of the doubly charged ion at m/z 687.342 ($\Delta m=10$ ppm) from the hydrolyzed extract of proteins from ceramics impregnated with a fish mixture and showing the y and b fragments of the peptide sequence VAEQELVDVSR, which is anchovy-specific. Identified peptide sequence differs by one amino acid from peptide 1702-1713 (VAEQELVDASER) of the myosin heavy chain from the common carp

Globally, three specific peptides were identified for anchovy species, the peptides LAQESIMDLENDKQQSDEK, NSYEEALDQLETLKR, and VAEQELVDVSR (as well as peptide KVAEQELVDVSR including one missed cleavage of the trypsin). Concerning bonito-specific peptides, two sequences were identified, i.e., the peptides IAYLLGLN-SADMLK and GHEDMKEQVAMVER. The amino acid substitutions of the peptide sequences obtained from the ceramic impregnated with the fish mixture are summarized in Table 3 (right column); these results highlight the possibility to discriminate between protein species in complex samples.

Conclusion

The method described in the current work was developed with the aim to identify protein residues in archaeological ceramics, and more precisely to assign species to the identified residues. Because of our particular interest in the identification of marine products, the development and the optimization of the proteomic approach were realized on fishes and especially anchovy and bonito. The best protein extraction conditions were achieved with the use of proteomic buffers containing high amounts of denaturant (urea, thiourea), reducing agent (DTT), and detergent (CHAPS). The method developed for fish tissues allowed identification of fish-specific peptides but also specific peptides of the two species studied, anchovy and bonito. In detail, investigation of the peptide sequence assigned for each sample showed that, in some cases, the exact peptide sequence differs by one amino acid compared with the sequence attributed by sequence homology via bioinformatic tools. This difference in the sequence is specific to the fish species and allowed discrimination of, for example, anchovy from bonito. The resulting method was applied to ceramics that had been impregnated with one fish species or a mixture of fish species and extensively washed with deionized water before analysis. The protein extraction from the clay matrix was successful despite the very low protein amount considered, and led to the identification of 31, 27, and 33 fish-specific peptides from ceramics impregnated with anchovy, bonito, and both fishes, respectively. This strategy opens up new research fields related to archaeological samples by providing more precise information about the protein species present.

Acknowledgements This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche ANR-08-JCJC-0082-01. The mass spectrometry facilities used for this study are funded by the European Community (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France), the IBISA (Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie) network, the CNRS, and the Université Lille 1 Sciences et Technologies.

References

1. Reynolds P (2010) *Hispania and the Roman Mediterranean*, AD 100–700, ceramics and trade. Duckworth, Bristol
2. Etienne E, Mayet, F (2007) In: Lagostena L, Bernal D, Arévalo A, Cetariae 2005 (eds) *Salsas y salazones de pescado en occidente durante la antigüedad*. Actas del congreso internacional (Cádiz, 7–9 de noviembre de 2005). British Archaeol Reports Int Ser 1686. UCA/Hedges, Oxford, pp 5–20
3. Slim L, Bonifay M, Piton J, Sternberg M (2007) In: Lagostena L, Bernal D, Arévalo A, Cetariae 2005 (eds) *Salsas y salazones de pescado en occidente durante la antigüedad*. Actas del congreso internacional (Cádiz, 7–9 de noviembre de 2005). British Archaeol Reports Int Ser 1686. UCA/Hedges, Oxford, pp 21–44
4. Keay SJ, Williams D (2005) *Roman amphorae: a digital resource*. University of Southampton
5. Bernal Casasola D, Lagóstena L (2004) *Figlinae baeticae, talleres alfareros y producciones cerámicas en la bética romana* British Archaeol Reports Int Ser 1266. Oxford
6. Bernal Casasola D, Ribera i Laomba A (2008) *Cerámicas hispanorromanas, un estado de la cuestión*. Universidad de Cádiz, Cadix
7. Bonifay M (2004) *Etudes sur la céramique romaine tardive d’afrique*. British Archaeol Reports Int Ser 1301. Archaeopress, Oxford
8. Capelli C, Bonifay M (2007) In: Bonifay M, Trégliá J-C (eds) *Lrew 2, late Roman coarse wares, cooking wares and amphorae in the Mediterranean: archaeology and archaeometry*. British Archaeol Reports Int Ser 1662. Archaeopress, Oxford, pp 551–567
9. Bonifay M, Gamier N (2007) *J Roman Archaeol Suppl* 69:8–32
10. Salvini L, Pecci A, Giorgi G (2008) *J Mass Spectrom* 43(1):108–115
11. Kimpe K, Drybooms C, Schrevels E, Jacobs PA, Degeest R, Waelkens M (2004) *J Archaeol Sci* 31(11):1503–1510
12. Colombini MP, Giachi G, Modugno F, Ribechini E (2005) *Microchem J* 79(1–2):83–90
13. Colombini MP, Modugno F, Ribechini E (2005) *J Mass Spectrom* 40(7):890–898
14. Charters S, Evershed RP, Blinkhorn PW, Denham V (1995) *Archaeometry* 37(1):113–127
15. Gamier N, Rolando C, Højte JM, Tokarski C (2009) *Int J Mass Spectrom* 284(1–3):47–56
16. Gamier N, Cren-Olivé C, Rolando C, Regert M (2002) *Anal Chem* 74(19):4868–4877
17. Petit-Dominguez MD, García-Giménez R, Rucandio MI (2003) *Microchim Acta* 141(1):6–68
18. Gamier N, Richardin P, Cheynier V, Regert M (2003) *Anal Chim Acta* 493(2):137–157
19. Rösch M (2005) *Veg Hist Archaeobot* 14(3):179–188
20. Evershed RP, Copley MS, Dickson L, Hansel FA (2008) *Archaeometry* 50(1):101–113
21. Hansson MC, Foley BP (2008) *J Archaeol Sci* 35:1169–1176
22. Foley BP, Dellaporta K, Sakellariou D, Bingham BS, Camilli R, Eustice RM, Evagelistis D, Ferrini VL, Katsaros K, Kourkoumelis D, Mallios A, Micha P, Mindell DA, Roman C, Singh H, Switzer DS, Theodoulou T (2009) *Hesperia* 78(2):269–305
23. Van Neer W, Lernau O, Friedman R, Mumford G, Poblome J, Waelkens M (2004) *Paleorient* 30(1):101–147
24. Arndt A, Van Neer W, Hellemans B, Robbend J, Volckaerta F, Waelkens M (2003) *J Archaeol Sci* 30(9):1095–1105
25. Asara JM, Schweitzer MH, Freimark LM, Phillips M, Cantley LC (2007) *Science* 316(5822):280–285
26. Tokarski C, Martin E, Cren-Olivé C, Rolando C (2003) *Protein studies in the cultural heritage. Molecular biology and cultural heritage*. Balkema, Exton

27. Wilson CM (1979) *Anal Biochem* 96(2):263–278
28. Wilson CM (1983) *Methods Enzymol* 91:236–247
29. Wilson CM (1992) *Biotech Histochem* 67:224–234
30. Martin E (1977) *Stud Conserv* 22:63–67
31. Cren-Olivé C, Martin E, Rolando C, Vieillescazes C (1999) In: Parisi C, Gagliardi S, Parisi GM, Torcinaro G (eds) *Proceedings of 6th international conference on non-destructive testing and microanalysis for the diagnostics and conservation of the cultural and environmental heritage*. Rome, pp 1193–1206
32. Kohn J (1958) *Clin Chim Acta* 3:450–454
33. Johnson M, Packard E (1971) *Stud Conserv* 16:145–164
34. Kockaert L, Gausset P, Dubi-Rucquoy M (1989) *Stud Conserv* 34:183–188
35. Jones PL (1962) *Stud Conserv* 7:10–16
36. Scott DA, Warmlander S, Mazurek J, Quirke S (2009) *J Archaeol Sci* 36(3):923–932
37. Cartechini L, Vagnini M, Palmieri M, Pitzurra L, Mello T, Mazurek J, Chiari G (2010) *Acc Chem Res* 43(6):867–876
38. Arslanoglu J, Schultz J, Loike J, Peterson K (2010) *J Biosci* 35(1):3–10
39. Halpine SM (1992) *Stud Conserv* 37:22–38
40. Colombini MP, Fuoco R, Giacomelli A, Muscatello B (1998) *Stud Conserv* 43:33–41
41. Castro RM (1997) *J Chromatogr A* 778:373–381
42. Andreotti A, Bonaduce I, Colombini MP, Gautier G, Modugno F, Ribechini E (2006) *Anal Chem* 78(13):4490–4500
43. Chiavari G, Gandini N, Russo P, Fabbri D (1998) *Chromatographia* 47:420–426
44. Carbini M, Stevanato R, Rovea M, Traldi P, Favretto D (1996) *Rapid Commun Mass Spectrom* 10(10):1240–1243
45. Bocchini P, Traldi P (1998) *J Mass Spectrom* 33(11):1053–1062
46. Tokarski C, Martin E, Rolando C, Cren-Olivé C (2003) *Bioforum* 2:2–5
47. Tokarski C, Martin E, Rolando C, Cren-Olivé C (2004) *Biosyst Solut* 11:38–39
48. Tokarski C, Martin E, Rolando C, Cren-Olivé C (2006) *Anal Chem* 78(5):1494–1502
49. Fremout W, Dhaenens M, Saverwyns S, Sanyova J, Vandenaebelle P, Deforce D, Moens L (2010) *Anal Chim Acta* 658(2):156–162
50. Hollemeyer K, Altmeyer W, Heinzle E, Pitra C (2008) *Rapid Commun Mass Spectrom* 22(18):2751–2767
51. Kuckova S, Crhova M, Vankova L, Hnizda A, Hynek R, Kodicek M (2009) *Int J Mass Spectrom* 284(1–3):42–46
52. Chambéry A, Di Maro A, Sanges C, Severino V, Tarantino M, Lamberti A, Parente A, Arcari P (2009) *Anal and Bioanal Chem* 395(7):2281–2291
53. Solazzo C, Fitzhugh WW, Rolando C, Tokarski C (2008) *Anal Chem* 80(12):4590–4597

Conclusion Générale

Conclusion générale

L'objectif principal de ces travaux était le développement de méthodologies permettant l'analyse des protéines dans des échantillons du Patrimoine culturel. Les protéines sont des biomolécules fragiles par nature, qui, de plus, sont dans un état de dénaturation avancées dans ce type d'échantillons ce qui en rend l'étude d'autant plus difficile. La valeur inestimable des échantillons du Patrimoine Culturel nécessitait donc de développer et d'optimiser les méthodes d'analyse sur des échantillons modèles avant de les appliquer sur des échantillons précieux.

Dans les peintures anciennes, la présence d'autres composés tels que pigments, huile, vernis..., mais également le vieillissement ou encore la pollution peuvent entraîner des modifications sur les protéines et rendre l'identification des liants protéiques assez complexe. Ainsi, nous avons développé une méthode d'analyse protéomique basée sur l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF-TOF permettant d'identifier et de localiser les modifications chimiques des protéines des liants de peinture. En parallèle, nous avons utilisé la micro-spectrométrie Raman afin d'obtenir des informations d'ordre structural sur l'ensemble du système modèle étudié. Il serait intéressant de poursuivre ces études sur des échantillons de différentes compositions (autres pigments), et des échantillons exposés à des temps de vieillissement plus longs et à des polluants (NOx, SOx...). D'un point de vue structural, l'analyse par micro-IR permettrait de s'affranchir du problème de fluorescence et pourrait conduire à l'obtention d'informations supplémentaires concernant les molécules organiques.

Une méthode d'analyse permettant l'identification de l'espèce d'origine des colles animales a ensuite été développée. Pour cela, nous avons utilisé la spectrométrie de masse à haute résolution qui permet d'identifier les protéines dans des échantillons complexes sans ambiguïté. Après avoir construit une banque de données de peptides spécifiques à chaque espèce grâce à l'analyse de colles animales commerciales, la méthodologie a été appliquée sur des peintures modèles, ce qui nous a permis de nous assurer de sa validité sur des protéines piégées dans des matricés plus complexes contenant d'autres composés inorganiques et organiques. Cette méthode a ensuite été appliquée avec succès sur un échantillon de dorure datant du 18^{ème} siècle et a permis d'identifier de la colle bovine qui a été utilisée dans la couche d'apprêt et également en tant qu'adhésifs pour les feuilles d'or. Par ailleurs, l'analyse micro-

Raman nous a permis d'identifier les matériaux utilisés pour le support et l'assiette à dorer. Les colles animales sont des substances protéiques qui ont été utilisées abondamment aussi bien en peinture, dorure, polychromie, que pour la réalisation de manuscrits. L'identification de la nature exacte de la colle animale employée dans une œuvre est une information importante en vue de travaux de restauration. Il serait intéressant d'analyser des échantillons de natures différentes afin d'établir une corrélation entre les différents types de colles animales et leur utilisation.

La dernière partie de ces travaux a consisté à mettre en place une méthode analytique permettant l'identification des résidus de protéines dans les céramiques archéologiques afin de déterminer leur contenu. La méthode d'analyse protéomique a été développée sur deux espèces de poissons connues pour avoir été consommées par les civilisations méditerranéennes anciennes : l'anchois et la bonite, une espèce proche du thon. Nous avons identifié des peptides spécifiques au poisson pouvant être utilisé comme marqueurs potentiels de cette nourriture. Un morceau de céramique a été imprégné de chair de poisson et lavé abondamment avant analyse pour le débarrasser de tout résidu visible, de manière à analyser les protéines ayant pénétré la matrice argileuse. De nouveau, des marqueurs peptidiques du poisson ont été identifiés, montrant que la méthodologie développée était adaptée à l'analyse de protéines piégées dans les céramiques et que la présence de nourriture à base de poisson dans les amphores pouvait être identifiée sur la base de peptides spécifiques à ces espèces. Ce développement méthodologique est une étape préliminaire indispensable et l'analyse de tessons d'amphores provenant de sites archéologiques est la prochaine étape de ce travail.

Matériel & méthodes

MATÉRIEL & MÉTHODES

1. PRÉPARATION D'ÉCHANTILLON.....	- 259 -
1.1. FORMULATION DE PEINTURES MODÈLES	- 259 -
1.2. PRÉPARATION DE CÉRAMIQUES IMPRÉGNÉES	- 260 -
2. VIEILLISSEMENT DES ÉCHANTILLONS DE PEINTURE.....	- 260 -
2.1. VIEILLISSEMENT ARTIFICIEL	- 260 -
2.2. VIEILLISSEMENT NATUREL	- 261 -
3. ANALYSE PROTÉOMIQUE.....	- 261 -
3.1. EXTRACTION PROTÉIQUE	- 261 -
3.1.1. <i>Echantillons de peinture et de dorure</i>	- 261 -
3.1.2. <i>Echantillons de poisson et de céramiques (modèles et archéologiques)</i>	- 262 -
3.2. DESSALAGE	- 262 -
3.2.1. <i>Dessalage par dialyse</i>	- 262 -
3.2.2. <i>Dessalage sur zip tip C18</i>	- 263 -
3.3. HYDROLYSE ENZYMATIQUE EN SOLUTION.....	- 263 -
3.4. ANALYSES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE.....	- 264 -
3.4.1. <i>Analyse MALDI-TOF-TOF</i>	- 264 -
3.4.2. <i>Analyse nanoLC, nano ESI-Qq-TOF</i>	- 264 -
3.4.3. <i>Analyse nano LC, nano ESI-Qh-FT-ICR</i>	- 265 -
4. RETRAITEMENT DE DONNÉES À L'AIDE D'OUTILS BIOINFORMATIQUES	- 267 -
4.1. INTERROGATION DE BANQUES DE DONNÉES PROTÉOMIQUES	- 267 -
4.2. RECHERCHE DE PEPTIDES SPÉCIFIQUES.....	- 267 -
4.2.1. <i>BLASTp</i>	- 267 -
4.2.2. <i>Développement d'un programme interne au laboratoire basé sur Biopython</i>	- 268 -
5. ANALYSES MICRO-RAMAN.....	- 269 -

Matériel & méthodes

1. Préparation d'échantillon

1.1. Formulation de peintures modèles

Les peintures modèles utilisées dans le chapitre 2 ont été préparées de la manière suivante :

- pour les peintures blanc de plomb-lysozyme : 100 mg de pigment ont été pesés et 10 μ L d'eau milliQ ont été ajoutés afin d'obtenir une pâte. Enfin, 100 μ L de solution de lysozyme à 10% (p/v) ont été mélangés ce qui a permis d'obtenir une peinture qui a ensuite été étalée en couche suffisamment épaisse sur une lamelle de verre (voir figure 1).
- pour les peintures blanc de plomb-lysozyme-huile de lin: 100 mg de pigment ont été pesés et 10 μ L d'eau milliQ ont été ajoutés afin d'obtenir une pâte. Enfin, un mélange composé de 80 μ L de solution de lysozyme à 10% (p/v) et 20 μ L d'huile de lin a été ajouté à cette pâte ce qui a permis d'obtenir une peinture qui a ensuite été étalée en couche suffisamment épaisse sur une lamelle de verre.

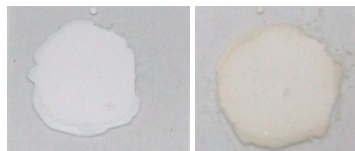


Figure 1: Photographies des peintures modèles sur lame de verre
À gauche : peinture blanc de plomb, lysozyme
À droite : peinture blanc de plomb, lysozyme, huile de lin

Les peintures modèles utilisées dans le chapitre 3 ont été préparées de la manière suivante :

- 500 mg de pigment blanc de plomb ont été pesés et 100 μ L d'eau milliQ ont été ajoutés afin d'obtenir une pâte. Enfin, un mélange composé de 300 μ L de solution de colle animale et 100 μ L d'huile de lin a été ajouté à cette pâte ce qui a permis d'obtenir une peinture qui a ensuite été étalée en couche suffisamment épaisse sur une lamelle de verre.

1.2. Préparation de céramiques imprégnées

Les céramiques imprégnées de poisson utilisées pour le développement méthodologique décrit dans le chapitre 3 ont été préparées de la manière suivante. Un morceau de céramique fabriquée de manière traditionnelle par un artisan espagnol nous a été fourni (voir figure 2 gauche). Un tesson de cette céramique a été imprégné d'anchois en écrasant de l'anchois frais directement sur la surface correspondant à la paroi interne (voir figure 2 au centre). La bonite qui nous a été fournie est séchée et salée, pour imprégner un tesson de céramique avec ce poisson nous avons donc d'abord broyé un morceau de bonite dans de l'eau de manière à obtenir une pâte que nous avons ensuite étalé sur la paroi interne du tesson.



Figure 2 : à gauche : céramique fabriquée de manière traditionnelle
Au centre : céramique imprégnée d'anchois
À droite : céramique lavée et débarrassée de résidu de poisson

2. Vieillissement des échantillons de peinture

2.1. Vieillissement artificiel

Afin de réaliser les expériences de vieillissement artificiel, une chambre de vieillissement a été conçue au laboratoire (voir figure 3). Cette chambre est divisée en deux parties : l'un des deux compartiments est pourvu d'une lampe UV émettant des rayonnements à 365 nm et bénéficie d'une régulation de température et d'humidité alors que dans l'autre compartiment seule la température et l'humidité sont régulées. Ainsi, le rôle joué par les radiations UV peut être évalué. La température est de 25° ($\pm 3^\circ\text{C}$) et le taux d'humidité de 50% ($\pm 5\%$). Les échantillons sont soumis aux rayons UV pendant 12 heures puis sont plongés dans le noir les 12 heures suivantes afin de reproduire un cycle jour/nuit. Cette chambre de vieillissement est également dotée d'un système permettant d'injecter un gaz dans les deux compartiments (débit régulé à l'aide de la valve d'entrée).

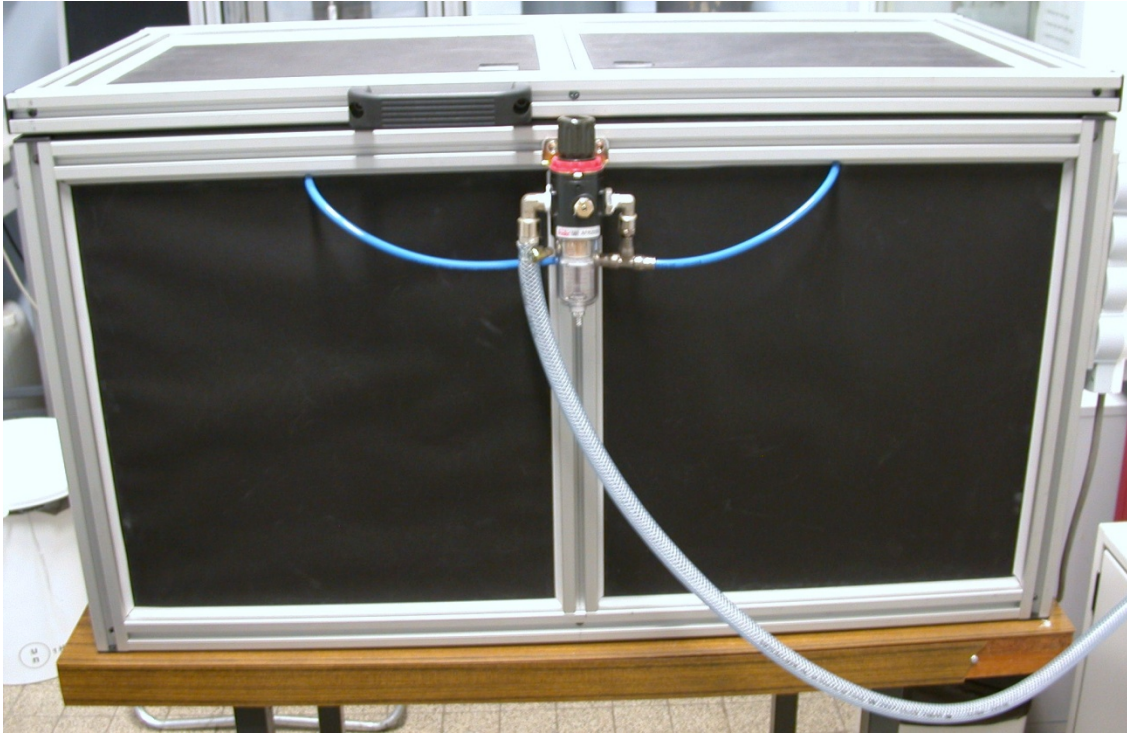


Figure 3: Photographie de la chambre de vieillissement artificiel

2.2. Vieillissement naturel

Un second lot d'échantillons est vieilli de manière naturelle. Pour cela, les échantillons sont laissés au laboratoire à l'air libre, à température ambiante dans des conditions de luminosité naturelle.

3. Analyse protéomique

3.1. Extraction protéique

3.1.1. Echantillons de peinture et de dorure

Pour les échantillons de peinture et de dorure, nous avons utilisé la méthode d'extraction protéique décrite par Tokarski et al. L'échantillon est placé dans un tube épendorf et broyé à l'aide d'un pilon à usage unique dans 100 μ L d'un mélange composé d'une résine de broyage garantie sans contamination d'ADN ni d'ARN contenant des micro-particules abrasives (Genotech, St Louis, MO, USA) et d'eau acidifiée à 1% d'acide trifluoroacétique. Au bout d'1h30, l'échantillon est centrifugé à 10000 tours/min pendant 5 minutes à l'aide d'une

mini-centrifugeuse (minispin, ependorf). Le surnageant contenant les protéines est ainsi récupéré.



Figure 4: Kit de broyage (Genotech, St Louis, Mo, USA)

3.1.2. Echantillons de poisson et céramiques imprégnées

Un échantillon de poisson d'environ 10 mg, placé dans un épendorf de 1.5 mL, auquel on ajoute 150 μ L de solution d'extraction est broyé à l'aide d'un pilon à usage unique pendant une dizaine de minutes. Ensuite, on laisse reposer pendant 1h30 à température ambiante. Une fois ce temps écoulé, l'échantillon est centrifugé à 12000 tours/min pendant 10 min à 20°C. La totalité du surnageant contenant les protéines extraites est récupérée.

La surface de la céramique imprégnée a été minutieusement grattée afin de la débarrasser de tout résidu de poisson visible. Ensuite, la céramique a été nettoyée en laissant couler un flux continu d'eau désionisée sur la surface. Un micro prélèvement de céramique imprégnée (4 mm² de surface x 1 mm de hauteur) a été broyé dans 100 μ L de solution d'extraction à l'aide d'un pilon en téflon pendant une dizaine de minutes et ensuite laissé pendant 1h30 à température ambiante. Une fois ce temps écoulé, l'échantillon a été centrifugé à 12000 tours/min pendant 10 min à 20°C. Finalement, la totalité du surnageant contenant les protéines extraites est récupérée. Pour les céramiques archéologiques on opère de la même façon sauf que l'échantillon n'est pas nettoyé au préalable.

3.2. Dessalage

3.2.1. Dessalage par dialyse

Les dessalages par dialyse ont été effectués sur les extractions protéiques à l'aide de micro-unités de dialyse (Pierce, Rockford, IL, USA) dotées d'un cut-off de 3500 MWCO contre de l'eau milliQ toute une nuit.



Figure 5: Micro-unité de dialyse

3.2.2. Dessalage sur zip tip C18

Les digests tryptiques obtenus pour les échantillons de colle animale ont été dessalés sur zip tip C18 (montré figure 6). La phase est tout d'abord conditionnée par passage de 100 μL d'acétonitrile puis 100 μL d'eau milliQ à 0,1% d'acide formique. Le chargement de la phase se fait par environ 40 pipetages (allers-retours) de 10 μL d'échantillon dilués à 1 pmol/ μL dans de l'eau milliQ à 0,1% d'acide formique. La phase est lavée par 10 μL d'eau milliQ à 0,1% d'acide formique (10 allers-retours) et éluée par 10 μL d'un mélange acétonitrile/eau milliQ à 0,1% d'acide formique (70/30 v/v) (40 allers-retours). Les échantillons sont ensuite évaporés à sec et repris dans 10 μL de tampon A (94,9% d'eau milliQ, 5% d'acétonitrile et 0,1% d'acide formique).



Figure 6: Zip tip C18 pour micropipette

3.3. Hydrolyse enzymatique en solution

L'échantillon protéique est dilué au dixième dans un tampon de dénaturation contenant du Tris HCl à 50 mM, du DTT à 4 mM et du TFE à 60 % et chauffé à 70°C pendant 2 h. Les protéines sont ensuite alkylées avec 5 mM d'iodoacétamide pendant 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'échantillon est enfin dilué au dixième dans un tampon bicarbonate d'ammonium à 50 mM pH 8,8. Pour la digestion enzymatique, le rapport enzyme/protéine est fixé à 1/40. L'échantillon est alors incubé toute la nuit à 37°C. L'échantillon est ensuite évaporé et les peptides sont repris dans 10 μL d'eau milliQ à 0,1% d'acide formique.

3.4. Analyses par spectrométrie de masse

3.4.1. Analyse MALDI-TOF-TOF

Les analyses MALDI-TOF-TOF ont été réalisées sur un ABI 4800 (Applied Biosystems) équipé d'un laser Nd-YAG de longueur d'onde 355 nm. Les analyses de peptides sont réalisées en mode positif réflectron et les analyses de protéines en mode linéaire positif. La matrice utilisée est un mélange contenant de l'HCCA (7 mg/mL) et du citrate d'ammonium (7 ng/mL) mis en solution dans 75% d'acétonitrile, 24,9% d'eau milliQ et 0,1% d'acide formique. L'échantillon et la matrice sont mélangés dans un tube eppendorf avec un rapport (1 : 1). 0,5 µL du mélange est déposé et co-cristallisé sur la cible MALDI par séchage à l'air libre et à température ambiante. L'interprétation des spectres MS et MS² est effectuée avec le logiciel Data Explorer (Applied Biosystems). Toutes les identifications de modifications sont réalisées manuellement.

3.4.2. Analyse nanoLC, nano ESI-Qq-TOF

- nano LC

La séparation des digests protéiques avant analyse a été réalisée sur une chaîne nanoLC (LC Packings, Dionex, Amsterdam). Elle se compose d'un passeur automatique d'échantillon Famos équipée d'une plaque réfrigérée, d'une pompe Switchos et d'une pompe quaternaire Ultimate. La boucle d'injection est de 10 µL et le mode d'injection est le mode pick up permettant de prélever 1 µL d'échantillon, le volume de la boucle étant complété par une phase aqueuse A (94,9% d'eau milliQ, 5% d'acétonitrile et 0,1% d'acide formique). L'échantillon est dessalé et concentré pendant trois minutes à un débit de 10 µL/min sur une colonne de préconcentration C18 possédant une longueur de 5 mm, des pores de 100 Å, et un diamètre interne de 300 µm.

L'élution est réalisée sur la nanocolonne analytique C18 possédant une longueur de 15 cm, des pores de 100 Å et un diamètre interne de 75 µm à un débit de 200 nL/min avec la phase aqueuse A et une phase organique B (24,9% d'eau milliQ, 75% d'acétonitrile et 0,1% d'acide formique) suivant le gradient représenté sur la figure suivante.

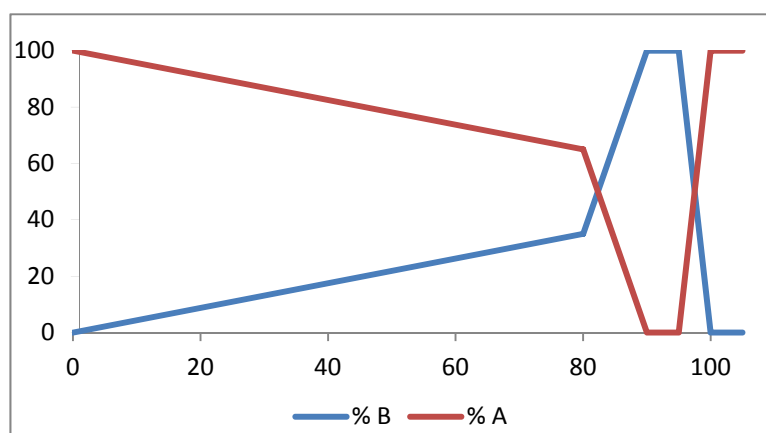


Figure 7: Gradient utilisé pour la séparation chromatographique des peptides par nanoLC pour l'analyse nanoESI-Qq-TOF

- nano ESI-Qq-TOF

Les analyses ont été effectuées sur un spectromètre de masse Q-star (Applied Biosystems, Foster City, Californie). Les analyses ont été réalisées en mode d'ionisation positif. Les aiguilles nanoélectrospray utilisées proviennent de chez New Objective (Woburn, USA). Elles sont recouvertes d'un alliage conducteur et ont un diamètre interne de 20 μm . Une tension de 1.8 kV est appliquée sur l'aiguille pour la formation du spray.

Les paramètres utilisés pour l'analyse de peptides sont décrits ci-après. L'acquisition des données est réalisée alternativement en opérant une analyse MS full-scan entre m/z 300-2000 suivie d'une analyse MS/MS full scan entre m/z 50-2000 de l'ion sélectionné dans un mode dynamique d'exclusion (l'ion le plus intense est sélectionné puis exclu pour une durée de 30s). L'énergie de collision est fixée automatiquement par l'appareil.

Le retraitement de données est effectué avec le logiciel Analyst QS et le script mascot dll. Enfin, l'interrogation de banques de données est réalisée avec l'interface mascot.

3.4.3. Analyse nano LC, nano ESI-Qh-FT-ICR

- nano LC

La séparation des digests protéiques avant analyse par nanoESI-FT-ICR-MS a été réalisée sur une chaîne nanoLC (LC Packings, Dionex). Elle se compose d'un passeur automatique d'échantillon Famos équipée d'une plaque réfrigérée, d'une pompe Switchos et d'une pompe quaternaire Ultimate. La boucle d'injection est de 10 μL et le mode d'injection est le mode pick up permettant de prélever 1 μL d'échantillon, le volume de la boucle étant complété par une phase aqueuse A (94,9% d'eau milliQ, 5% d'acétonitrile et 0,1% d'acide formique).

L'échantillon est dessalé et concentré pendant trois minutes à un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ sur une colonne de préconcentration C18 possédant une longueur de 5 mm, des pores de 100 Å, et un diamètre interne de 300 μm . L'élution est réalisée sur la nanocolonne analytique C18 possédant une longueur de 25 cm, des pores de 100 Å et un diamètre interne de 75 μm à un débit de 170 nL/min avec la phase aqueuse A et une phase organique B (24,9% d'eau milliQ, 75% d'acétonitrile et 0,1% d'acide formique) suivant le gradient représenté sur la figure suivante.

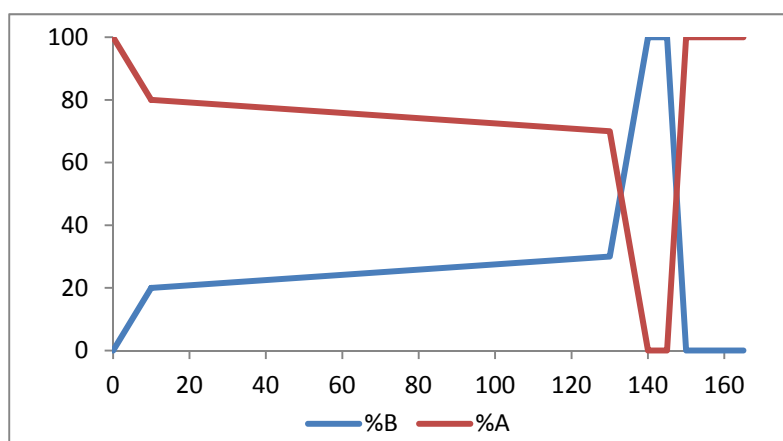


Figure 8: Gradient utilisé pour la séparation chromatographique des peptides par nanoLC pour l'analyse nanoESI-Qh-FT-ICR

- nanoESI-Qh-FT-ICR

Les analyses ont été réalisées sur un spectromètre de masse à transformée de Fourier possédant un aimant de 9,4 T et équipé d'une source nanoélectrospray (ApexQ, Bruker Daltonics). Les analyses ont été réalisées en mode d'ionisation positif. Les aiguilles nanoélectrospray utilisées proviennent de chez New Objective (Woburn, USA). Elles sont recouvertes d'un alliage conducteur et ont un diamètre interne de 20 μm . Une tension de 1650 V est appliquée sur l'aiguille pour la formation du spray. La température du capillaire est fixée à 180°C.

Les paramètres utilisés pour l'analyse de peptides sont décrits ci-après. L'accumulation des ions dans la cellule de collision en mode MS/MS se fait sur une durée de 1 s. La méthode d'acquisition consiste en un full scan MS entre m/z 288-2500 en mode large bande avec 512 k points de données.

Le retraitement de données est effectué avec le logiciel Data Analysis 3.2. Les spectres correspondant aux digests protéiques ont été analysés de deux manières. Tout d'abord la génération des pics monoisotopiques a été réalisée avec le logiciel Automation (Bruker Daltonics) afin d'interroger les banques de données. Ensuite, les spectres ont été interprétés manuellement.

4. Retraitement de données à l'aide d'outils bioinformatiques

4.1. Interrogation de banques de données protéomiques

L'identification des protéines est réalisée à partir de l'interrogation de la banque de données protéomiques Swiss-Prot qui contient les séquences de protéines vérifiées contrairement à la banque de données TrEMBL qui contient en plus les séquences de protéines prédites à partir du génome d'un organisme. L'interrogation de la banque de données s'effectue à partir du logiciel mascot, développé par la société matrix science. Sur cette interface, nous pouvons préciser la taxonomie de l'organisme, l'enzyme qui a été utilisé pour l'hydrolyse enzymatique, le nombre de clivages manqués par cet enzyme, les modifications variables, le spectromètre de masse utilisé pour l'analyse...

4.2. Recherche de peptides spécifiques

Dans les chapitres 3 et 4, nous nous sommes intéressés à l'identification de peptides spécifiques soit d'une espèce en particulier dans le cas des colles animales soit d'une catégorie animale un peu plus générale (le poisson) dans le cas du chapitre 4. Pour cela nous avons utilisé deux méthodes différentes présentées ci-dessous.

4.2.1. BLASTp

BLASTp est un outil bioinformatique disponible en ligne sur le site du ncbi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Lorsqu'on entre une séquence (protéine ou peptide) dans cette interface, le logiciel réalise un alignement entre la séquence entrée et toutes les séquences provenant des différentes banques de données qui lui sont en mémoire. Dans le cas d'un peptide, l'alignement de la séquence entrée avec les séquences des banques de données avec une identité de 100% permet d'identifier les protéines dans lesquelles ce peptide est présent. Ainsi, si le peptide est présent dans une seule protéine alors il est spécifique de cette protéine mais surtout spécifique de l'espèce. Si le peptide est commun à plusieurs protéines mais que ces protéines appartiennent toutes à une catégorie d'espèce, comme les poissons par exemple, le peptide est spécifique à cette catégorie.

L'inconvénient de cette méthode est qu'il faut entrer chaque séquence identifiée par mascot manuellement, ce qui prend un temps non négligeable. Par ailleurs, il faut être vigilant et contrôler chaque alignement car BLASTp ne prend pas en compte les alignements réalisés avec

100% d'identité uniquement. Si seule une partie de la séquence entrée s'aligne avec une autre protéine, ceci est également inclus dans la liste de résultats.

4.2.2. Développement d'un programme interne au laboratoire basé sur Biopython

Nous avons vu précédemment que l'outil BLASTp nous permet d'identifier les peptides spécifiques. Néanmoins, cette méthode nécessite un travail manuel assez long. Un programme permettant de réaliser ce travail de manière automatique a donc été développé. Ce programme a été codé sur Biopython, un logiciel contenant de nombreuses ressources bioinformatiques (banques de données ...) et permettant de développer des outils bioinformatiques. Le programme développé permet de récupérer toutes les séquences de peptides issues de l'identification mascot et les aligne avec les séquences de la banque de donnée choisie. Ainsi, pour chaque peptide, le programme génère la liste des protéines pour lesquelles le peptide est retrouvé, ce qui nous permet de savoir de manière plus rapide si un peptide est présent dans une seule protéine ou plusieurs et de déterminer sa spécificité. Par exemple, sur la figure 9, le résultat obtenu par ce programme pour la séquence GEPGPAGAVGPAGAVGPR est montré. Sous la séquence est indiquée la protéine dans laquelle mascot a identifié la séquence lors de l'interrogation puis les protéines dans lesquelles cette séquence est retrouvé d'abord en effectuant un blast dans la banque de données Swiss-Prot puis dans la banque de données NCBI. Ici, les résultats obtenus montrent que la séquence est spécifique au collagène type I $\alpha 2$ bovin.

```

*****
10 . GEPGPAGAVGPAGAVGPR
*****

Proteins found by Mascot :
3:C01A2_BOVIN

-----

Proteins found in SwissProt fasta :
sp|P02465|C01A2_BOVIN (977)

-----

Proteins found in NCBI-nr fasta :
gi|27806257|ref|NP_776945.1| (977)

```

Figure 9 : Exemple de résultat obtenu avec le programme basé sur Biopython

5. Analyses micro-Raman

Les analyses ont été effectuées à l'aide du micro-spectromètre Raman LabRAM Visible commercialisé par Horiba Jobin-Yvon et implanté au laboratoire LASIR.

La différence entre la microspectrométrie Raman et la spectrométrie Raman conventionnelle est la focalisation du faisceau lumineux incident sur l'échantillon à travers l'objectif d'un microscope. Ainsi, l'intensité de la lumière diffusée reste constante malgré la diminution du volume de l'échantillon. Les deux caractéristiques de ce montage microsonde Raman qui expliquent son efficacité sont : l'éclairement local très intense et un très grand angle de collection de l'objectif. La microspectrométrie Raman permet donc une analyse sans échantillonnage ce qui en fait une technique de choix pour l'analyse d'échantillons précieux.

- **La source excitatrice**

Le microspectromètre LabRAM visible a été exclusivement utilisé avec le laser He-Ne délivrant une radiation à 632.8 nm. La puissance de sortie de ce laser est de 19 mW avant le filtre interférentiel destiné à éliminer les raies parasites du laser. L'appareil est équipé d'un barillet muni de filtres de densité permettant d'atténuer la puissance du faisceau laser incident reçu par l'échantillon. La puissance au niveau de l'échantillon varie de 0,09 à 9 mW.

- **Le microscope**

L'appareil est équipé d'un microscope confocal de marque Olympus doté d'objectifs de différents grossissements : x10, x50 et x100. L'objectif du microscope permet de focaliser la lumière excitatrice sur l'échantillon.

- **L'analyseur**

La diffusion Raman est collectée par l'objectif puis filtrée optiquement par un filtre Super Notch Plus™ qui élimine la lumière excitatrice. L'ouverture de la fente d'entrée permet d'influer sur la résolution spectrale. Cette ouverture est réglable entre 0 et 1000 μm , en général on fixe cette ouverture à 150 μm pour obtenir une résolution correcte sans perte de signal. L'élément dispersif est un réseau holographique dont la position peut être ajustée selon la région spectrale à analyser. Dans ce travail nous avons utilisés le réseau à 1800 tr/mm qui permet l'acquisition de données sur une fenêtre spectrale de 1000 cm^{-1} . La calibration du spectromètre est testée en enregistrant le spectre d'une lame de silicium dont la fréquence Raman doit être centrée sur 520,7 cm^{-1} . Elle doit être vérifiée avant chaque expérience.

- **Le détecteur**

Le détecteur est un détecteur CCD refroidi à l'azote liquide comportant 2048 x 512 pixels. Ce type de détecteur possède un grand rendement quantique ainsi qu'un bruit de sortie faible dû au refroidissement à l'azote. L'inconvénient est la sensibilité aux rayons cosmique retranscrits en pics très fins sur le spectre Raman.

L'analyse d'échantillons du Patrimoine Culturel est primordiale pour des questions de compréhension de technique, de conservation et de restauration. Cependant, ces échantillons sont rares et précieux et l'analyse doit être effectuée sur une faible quantité de matière, ce qui nécessite le développement et l'optimisation de méthodes analytiques appropriées.

L'objectif de ce travail de thèse a donc été de développer des méthodes analytiques dans le but d'étudier les protéines dans des échantillons du Patrimoine Culturel.

Les changements structuraux et les modifications chimiques des protéines des liants de peinture, provoqués par interaction avec les autres composés ou par le vieillissement ont été mis en évidence grâce à l'utilisation de la micro-spectrométrie Raman et de l'analyse protéomique. Les travaux ont ensuite ciblés un type de substance protéique abondamment utilisé en tant qu'adhésif et liant de peinture : la colle animale. Une méthodologie, basée sur l'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution et permettant l'identification de l'espèce d'origine des colles animales est présentée. Elle a été appliquée avec succès sur un échantillon de dorure du 18^{ème} siècle révélant ainsi la nature de la colle animale utilisée pour la préparation de la couche d'apprêt et pour la fixation des feuilles d'or. Enfin, une problématique liée à l'identification du contenu des amphores, qui est à l'heure actuelle un véritable challenge à cause des conditions de conservation des objets archéologiques, a été abordée. Le développement d'une méthode d'analyse protéomique permettant d'identifier les résidus de protéines piégés dans les tessons d'amphores archéologiques est exposée.

Mots clés : Patrimoine Culturel, protéines, micro-Raman, protéomique

The analysis of Cultural Heritage samples brings information on the understanding of a technique and is essential for conservation and restoration issues. However, as these samples are scarce and precious little amount is available for the analysis, which requires the development and the optimization of appropriate analytical methods.

The purpose of this thesis was to develop analytical methods for the study of proteins in Cultural Heritage samples.

Structural changes and chemical modifications of proteins in paint binder, due to the presence of other components or due to ageing have been investigated by using micro-Raman spectrometry and proteomics analysis. The work was then focused on a particular kind of proteinaceous substance frequently used as painting binder and adhesives: the animal glue. A method, based on high resolution mass spectrometry and allowing the identification of the origin species of the glues on the basis of species-specific peptides is presented. It was successfully applied on a gilt sample dating from the 18th century. Bovine glue was identified in the plaster support and as adhesive for the gold leaf. The development of analytical tools for the analysis of archeological samples is also a challenging task owing to the conditions in which such objects have been stored. A proteomics-based method for the identification of protein residues in archaeological ceramics is presented. Here, the work was focused on the identification of fish-specific peptides because analysis of fish amphorae was expected.

Keywords: Cultural Heritage, proteins, micro-Raman, proteomics