



HAL
open science

Imagerie chimique des matériaux biologiques anciens

Sophie Cersoy

► **To cite this version:**

Sophie Cersoy. Imagerie chimique des matériaux biologiques anciens. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. UPMC, 2013. Français. NNT: . tel-01096215

HAL Id: tel-01096215

<https://theses.hal.science/tel-01096215>

Submitted on 17 Dec 2014

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.



Université Paris 6

4 place Jussieu
F-75005 Paris cedex 05



C2RMF-UMR 171 du CNRS

Palais du Louvre, Porte des Lions
14, quai F. Mitterrand
F-75001 Paris



LAMS- UMR 8220 du CNRS

UPMC – site « Le Raphaël »
3, rue Galilée
F-94200 Ivry-sur-Seine

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Physique et Chimie des Matériaux

(Ecole doctorale ED 397)

Présentée par

Mlle Sophie CERSOY

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Imagerie chimique des matériaux biologiques anciens

Soutenue le 15 janvier 2013

devant le jury composé de :

M. Philippe WALTER, directeur de recherche au CNRS

Mme Cathy VIEILLESZAZES, professeur à l'université d'Avignon

M. Arnaud DELCORTE, professeur à l'université de Louvain

M. Richard COLE, professeur à l'université Paris VI

M. Alain BRUNELLE, directeur de recherche au CNRS

M. Vincent MAZEL, maître de conférences à l'université Paris XI

Directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Remerciements

Je souhaite tout d'abord chaleureusement remercier Monsieur Philippe Walter de m'avoir accueillie au sein de l'UMR, dès mon stage de master 2 puis d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Merci pour ta confiance, ton écoute, tes corrections et le temps consacré dans un emploi du temps souvent chargé. Merci également de m'avoir aidée à rejoindre l'Institut Néel.

Je tiens également à exprimer ma gratitude aux membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail ainsi qu'à Monsieur Arnaud Delcorte et Madame Cathy Vieillescazes qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.

Un grand merci à Monsieur Alain Brunelle pour son accueil au sein de l'équipe de spectrométrie de masse de l'ICSN. Merci pour ta bienveillance, ta disponibilité, tes précieux conseils scientifiques comme humains, ton humour et bien sûr nos discussions passionnantes autour du TOF-SIMS.

Au-delà de nos désaccords, merci à Madame Pascale Richardin de m'avoir encadrée dès mon stage de master. Merci pour ta présence quotidienne et tes remarques que je n'oublie pas. Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche et d'avoir patiemment corrigé figures, articles et posters.

Une pensée particulière est adressée à Madame Danielle Jaillard. Je ne sais comment te remercier pour ton enthousiasme sans cesse renouvelé, ta gentillesse et ton dévouement face aux difficultés de préparation de nos échantillons. Merci pour ton accueil au CCME comme à l'ISV.

Merci à Madame Sabine de la Porte. Merci pour ton aide en histologie, ta disponibilité, tes précieuses suggestions et ton aide au début de notre travail sur les peaux de momies.

Mes remerciements chaleureux vont également à tous ceux qui m'ont aidé pour les différentes expériences, à l'ICSN, au C2RMF puis au LAMS. En particulier :

- Merci à Yvan Coquinot pour nos discussions et ses conseils sur les résines d'inclusion, merci à Juliette Langlois pour les manips de GC-MS, à Eric pour ses conseils sur le MEB et à Anne-Solenn Le Hô pour la spectroscopie infrarouge, au C2RMF.

- Un grand merci à Elsa Van Elslande qui a bien voulu répondre patiemment et aimablement à mes nombreuses questions pratiques et participer à la relecture finale de ce manuscrit. Merci aussi pour les bons moments passés au LAMS, pendant la rédaction.

- Merci aux thésards et postdocs de l'équipe de spectrométrie de masse de Gif/Yvette pour leur disponibilité. Merci à Vanessa, Nicolas, Alexandre, Christopher et Claudia pour nos échanges autour du SIMS, mais aussi à Julie, Jessica et Mathieu pour les bons moments passés aux Rencontres du Club Jeune. Merci, par ailleurs, à Vincent Guérineau : merci pour ton accueil, ta bonne humeur, tes bons plans et pour les essais en MALDI.

- Un immense merci à Nathalie Gandolfo qui m'a tant appris et pour son incommensurable gentillesse. Je te souhaite le meilleur.

Je tiens à remercier chaleureusement les membres du C2RMF que j'ai côtoyé pendant ce travail et que je n'aurais pas déjà cités: merci à Christian pour son accueil à la documentation, à Marcelle pour son sourire et nos petites conversations à l'entrée du laboratoire, à Dominique pour son humour, à Caroun pour ses attentions, à Gilles pour ses incroyables imitations et ses invitations à boire le thé, à Abdelkader, Laurent, Brice, Claire, Marie-Renée, Jean-Jacques, Ruven, Daniel, Elisa pour leur gentillesse et les bons moments partagés dans les couloirs, la cafétéria et les sous-sols du C2RMF. Parmi eux, merci à ceux qui nous ont fait vivre des beaux moments de rire et d'émotion lors des représentations de l'atelier théâtre.

Ce travail repose sur l'analyse de micro-échantillons. Aussi merci à tous ceux qui ont permis la réalisation des différentes études en acceptant de donner les échantillons et en particulier à Monsieur Gilles Gomot, responsable de la plateforme de chirurgie expérimentale de Nouzilly pour son accueil et sa prévenance ainsi qu'à Nicolas Bertho, pour ses conseils sur la peau de cochon. Merci à Messieurs Pascal Petit et Frédéric Beauprêtre pour leur gentillesse et leur accueil ainsi qu'à tous les autres restaurateurs du pavillon de Flore. Merci à Monsieur Jean-Paul Humez d'avoir accepté de me confier sa corne de bovidé. Enfin un grand merci à Mademoiselle Pauline Carminati de nous avoir confié les précieux échantillons de la momie andine et pour nos passionnantes discussions autour des momies.

Je me dois également de remercier ceux qui, durant ces trois années, ont partagés avec moi leurs connaissances sur les matériaux si particuliers étudiés. Merci à Monsieur Bernardo Arriazza, Madame Vivien Standen et Monsieur Arthur Aufderheide pour nos passionnantes discussions autour des momies Chinchorros. Un merci tout particulier à Mademoiselle Marcella Sepulveda. Merci pour ton enthousiasme et tes éclairages sur les momies chiliennes.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur Frank Rühli ainsi qu'à son équipe notamment Nathalia Shved. Merci aussi Monsieur Chakib Djedjat du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris. Ils ont tous accepté de répondre à mes questions avec gentillesse et de m'accueillir dans leur laboratoire.

Merci à Monsieur Sautet de l'École Vétérinaire de Toulouse pour ses patientes recherches et ses explications sur l'anatomie de la corne de bovidé.

Merci à Monsieur Christophe Moulherat pour les échantillons de soie, nos discussions sur cette précieuse fibre et pour les bons moments passés sur la route du Périgord Vert.

Merci à Messieurs Patrice Lehuédé et Shrutishagar Havéli pour nos discussions sur la spectrométrie de masse et plus particulièrement la technique SIMS.

Merci à Messieurs Rana Sodhi, Serge Della Negra et François le Naour pour nos échanges autour du TOF-SIMS et pour les bons moments passés au bord du lac de Garde.

Merci à Mademoiselle Anne-Charlotte Saint-Martin pour sa contribution à l'étude de la momie Tarapaca au cours du stage de L3 qu'elle a effectué avec moi.

Merci aux éminents membres du bureau des thésards pour leur soutien, leur aide, les moments partagés, dans la joie comme dans les instants plus difficiles. Merci Chloé, Anita, Carlotta, Marie (la blonde), Matthieu, Julien, Sophia. Et un merci très spécial et appuyé à mes deux « sœurs » de thèse : merci Aurélia et Marie pour votre présence attentive, vos attentions, vos petites cartes, vos blagues, nos échanges, nos discussions sur la thèse, la vie et plein d'autres sujets... Merci d'avoir co-fondé avec moi la « chorale d'après 18h » et merci pour les beaux moments d'amitié partagés en dehors du labo. Plein de courage et le meilleur pour la suite.

Merci à tous les membres du LAMS pour leur extraordinaire soutien lors de la rédaction. Merci Fabienne d'avoir éclairé mon passage au N05, merci pour les magnifiques moments et découvertes partagées. Merci Rémi pour ton aide, ton soutien et tes superbes « rémiades ». Un grand merci à Hélène et Laurence pour leur relecture finale. Merci Jacques et Agnès pour vos encouragements. Merci Muriel et Philippe de nous faire partager vos expériences. Enfin merci à Hector pour l'animation et les éclats de rire provoqués par ses réactions.

Un grand merci aussi aux étudiants du LP104 et à l'équipe pédagogique. Merci Sophie, Christophe, Philippe, Xavier et Nicolas pour cette aventure d'enseignement.

Un immense merci à ma famille, en particulier à mes parents, à Nicole, à Christian et Hannah pour leur soutien moral et logistique tout au long de ce travail. Merci également de tout cœur aux amis pour leur présence précieuse en particulier Michel et Laëtitia, qui ont, en outre, accepté de traquer les fautes d'orthographe et de typographie de ce manuscrit. Merci également à Gaëtan pour ton soutien, tes conseils et tes attentions, même maladroitement...

Enfin, je tiens à remercier les créateurs de cafés Nespresso™ et son représentant Georges C.

Ce travail est dédié à mon frère et ma « petite sœur », partie trop tôt pour voir ce travail achevé et à qui je dois tant.

Liste des abréviations

ACP :	Amorphous carbon phosphate
ACP :	Analyse par composante principale (en anglais PCA)
ADL :	Analyse discriminante linéaire (en anglais LDA)
AMS :	Accelerator Mass Spectrometry
ATP :	Adénosine triphosphate
ATR :	Attenuated Total Reflectance
BSE :	Backscattering electrons
CHCA :	Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
CID :	Collision Induced Dissociation
CT :	Computed tomography
DCPD :	Dicalcium phosphate dihydrate
DHB :	Acide 2,5 dihydroxybenzoïque
DRX :	Diffraction des rayons X
EDX/EDS :	Energy dispersive X-ray / Energy dispersive spectroscopy
ESI :	Electrospray ionization
FAB:	Fast Atom Bombardment
FIB :	Focalised Ion Beam
FT-ICR :	Fourier Transform ion cyclotron resonance
FT-IR :	Fourier Transform Infrared
GC :	Gas chromatography
G-SIMS :	Gentle SIMS
H&E :	Hématoxyline-Éosine
HAP :	Hydroxyapatite
HI :	Histological index
HPLC :	High pressure liquid chromatography
HRP :	Horseradish peroxidase
ICP:	Inductively coupled plasma
IR :	Infrarouge
JDE :	Jonction dermo-épidermique
LABS :	Linear alkylbenzene sulfonate
LMIG :	Liquid metal ion gun
MALDI :	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
MCP :	Microchannel plate
MEB :	Microscopie électronique à balayage
MET :	Microscopie électronique à transmission
MS/MS :	Tandem mass spectrometry
NRA :	Nuclear reaction analysis
OCP :	Octacalcium phosphate
OCT :	Optimal Cutting Temperature
PBS :	Phosphate buffered saline
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PDMS :	Polydiméthylsiloxanes
pI :	Point isoélectrique
PIDD :	Primary ion dose density
PIGE :	Particle-induced gamma-ray emission
PIXE :	Particle-induced X-ray emission
PMMA :	Polymethyl Methacrylate
PSD :	Post source decay
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
ROI :	Region of Interest
SE :	Secondary electrons
SIMS :	Secondary Ion Mass Spectrometry
TCP :	Tricalcium phosphate
TOF :	Time-of-flight

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1 : Tissus anciens et imagerie chimique	3
1 <u>Peau de momie et matériaux biologiques anciens</u>	4
1.1 Matériaux biologiques anciens	4
1.2 La peau : un matériau complexe	6
1.2.1 Structure de la peau humaine	6
1.2.2 Protéines de la peau	8
1.3 Autres tissus biologiques étudiés	13
1.3.1 Tissus biologiques collagéniques	13
1.3.2 Tissus biologiques kératinisés	13
1.3.3 Cas de la soie : une protéine simple, la fibroïne	13
2 <u>Imagerie chimique et structurale</u>	15
2.1 Observations structurales préliminaires	15
2.1.1 Microscopie optique	15
2.1.2 Colorations histologiques	15
2.1.3 Microscopie électronique à balayage	18
2.1.4 Microscopie électronique en transmission	20
2.2 Analyse élémentaire	21
2.2.1 Principe du MEB-EDX	21
2.2.2 Intérêt et limites	21
2.3 Imagerie chimique TOF-SIMS	22
2.3.1 Principe	23
2.3.2 Dispositif expérimental	25
2.3.3 Caractéristique de l'analyse et préparation des échantillons	31
2.3.4 Analyse des données	34
2.3.5 Avantages et inconvénients pour l'étude des matériaux du patrimoine	37
2.4 Choix des échantillons et leur préparation	38
2.4.1 Prélèvements et observations macroscopiques	38
2.4.2 Inclusions et techniques de coupe : critères de choix	41
2.5 Étude des protéines en SIMS	50
2.5.1 Méthodes d'analyse classiques	50
2.5.2 Analyse des acides aminés et des protéines en TOF-SIMS	52
Bibliographie	83
Chapitre 2 : Étude de matériaux kératinisés	101
1 <u>Introduction</u>	102
2 <u>Analyses de cheveux et de poils animaux</u>	103
2.1 Structure d'un cheveu	103
2.1.1 Structure histologique	103

2.1.2	Composition du cheveu	103
2.1.3	Techniques d'étude	104
2.2	Analyses de cheveux	104
2.2.1	Difficultés liées à la préparation des échantillons	104
2.2.2	Présentation des échantillons et caractérisation structurale	105
2.2.3	Analyse TOF-SIMS de cheveux modernes	106
2.2.4	Analyse TOF-SIMS de cheveux anciens	113
2.3	Analyse de poils animaux	115
2.3.1	Analyse de crins de chevaux teintés	115
2.3.2	Comparaison entre laine et soie	117
3	<u>Analyses de cornes</u>	122
3.1	Structure d'une corne de bovidé	122
3.1.1	Anatomie de la corne	122
3.1.2	Kératine de corne	123
3.2	Analyses de cornes de bovidés	124
3.2.1	Corne de bœuf moderne	124
3.2.2	Comparaison avec une corne de bœuf ancienne	136
3.3	Analyses d'une corne de rhinocéros laineux	141
3.3.1	Structure particulière des cornes de rhinocéros	141
3.3.2	Présentation de l'échantillon	141
3.3.3	Caractérisations structurales et élémentaires préliminaires	144
3.3.4	Analyse TOF-SIMS	146
3.3.5	Analyse complémentaire en DRX	151
4	<u>Conclusion</u>	153
	Bibliographie	154

Chapitre 3 : Imagerie chimique et structurale de la peau de momie 161

1	<u>Analyse de la peau moderne en TOF-SIMS</u>	162
1.1	Échantillon de peau de porc	162
1.1.1	Pertinence du modèle	162
1.1.2	Prélèvements	162
1.1.3	Préparation des échantillons	163
1.1.4	Analyses TOF-SIMS	163
1.2	Comparaison avec une peau humaine	166
2	<u>Imagerie chimique de la peau de momie</u>	168
2.1	Momies et momification	168
2.1.1	Qu'est-ce qu'une momie ?	168
2.1.2	Typologie et exemples de momies	168
2.1.3	Modifications post-mortem des tissus et momification naturelle	177
2.1.4	Modification chimique et biologique des corps momifiés	180
2.2	L'étude scientifique des momies	180
2.2.1	Études globales	182
2.2.2	Analyses biologiques des tissus momifiés	185

2.2.3	Analyses chimiques des tissus et baumes de momification	187
2.3	Analyse de la peau de momies naturelles et artificielles	190
2.3.1	Momies naturelles du Taklamakan : difficultés de l'étude	190
2.3.2	Momies artificielles égyptiennes	195
2.3.3	Étude d'une momie andine bien conservée	205
2.3.4	Dégradation moderne de la peau d'une momie Chinchorro	218
2.3.5	Conclusions sur l'étude de la peau des momies naturelles et embaumées	228
	Bibliographie	229
	Conclusion	239
	Liste des figures	247
	Liste des tableaux	257
	Annexes	261
	<u>Annexe 1</u> : Caractéristiques des acides aminés constituant les protéines des tissus animaux et végétaux	263
	<u>Annexe 2</u> : Ions recherchés pour l'analyse des matériaux biologiques anciens en TOF-SIMS	267
	<u>Annexe 3</u> : Fiche signalétique du porc étudié	273
	<u>Annexe 4</u> : Produits de dégradations connus d'acides aminés standards	275

Introduction

Les momies, corps dont les chairs sont conservées exercent depuis plusieurs siècles, une fascination qui ne se dément pas. Les tissus exceptionnellement préservés font parfois l'objet d'études scientifiques, souvent descriptives. La peau, particulièrement fragile et de structure complexe, s'avère souvent délicate à manipuler et difficile à caractériser.

Depuis plusieurs années, le Laboratoire du Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France (CNRS UMR 171¹) a axé une partie de ses activités de recherche sur l'application des techniques d'imagerie chimique à l'étude de microprélèvements complexes issus d'objets du Patrimoine. Ainsi la connaissance, à l'échelle submicrométrique, de matériaux complexes et donc prélevés en très faibles quantités a pu être améliorée grâce aux développements d'outils analytiques tels que la spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol (TOF-SIMS). D'autre part, plusieurs projets nationaux et internationaux ont été engagés par le C2RMF, en partenariat avec d'autres institutions pour l'analyse de tissus biologiques anciens. L'UMR collabore par exemple au projet de recherche lié à la Mission archéologique franco-chinoise au Xinjiang (Chine) co-dirigée par Corinne Debaine-Francfort (CNRS-UMR 7041 « Archéologies et Sciences de l'Antiquité », Equipe « Asie centrale »), dont l'un des objectifs est de développer l'analyse physico-chimique de momies découvertes dans le désert du Taklamakan. De plus, le laboratoire est amené, dans le cadre de la datation au carbone 14, à travailler régulièrement en étroite collaboration avec différents institutions qui confient des tissus biologiques anciens, humains ou animaux, dont l'étude peut apporter un complément d'information intéressant à la datation. La variété de nature et de provenance des échantillons permet, en outre, de disposer d'un panel de tissus conservés dans des conditions environnementales (température et degrés d'humidité) variées.

¹ Le laboratoire du C2RMF, unité mixte de recherche entre le CNRS et le Ministère de la Culture, a fermé le 31 décembre 2011. Un nouveau laboratoire, le Laboratoire d'Archéologie Moléculaire (LAMS), a été créé par le CNRS et l'UPMC. La présente thèse, commencée au sein de l'UMR 171, s'est poursuivie au LAMS (CNRS-UMR 8220).

L'objectif de ce travail était d'étudier les dégradations à long terme, en particulier protéiques, en jeu au sein de la peau de momie et, par extension, d'autres tissus biologiques de nature proche. L'incidence des techniques conservatoires de préparation des corps sur ces dégradations, à l'échelle micrométrique, a aussi été explorée. Pour cela, le recours à des techniques d'imagerie chimique permettant d'identifier et surtout de localiser les molécules biologiques, les minéraux et les substances exogènes issues de l'environnement d'enfouissement, dans la stratigraphie complexe des microprélèvements, était indispensable. L'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS autorise une caractérisation chimique et une localisation précise des composés et de la stratigraphie des échantillons hybrides, mélanges de matière organique et minérale. Bien adaptée à l'étude des composés minéraux et largement développée pour l'étude des lipides au sein des tissus biologiques, la méthode a dû être adaptée à l'étude des protéines. En outre, la préparation des échantillons, indispensables à l'obtention de résultats satisfaisants à cette échelle, a été adaptée au cas des peaux de momie, préalablement caractérisées d'un point de vue structural, à l'aide de différentes techniques microscopiques

Dans un premier temps, nous présentons les différents types de tissus étudiés, leur composition chimique et biologique ainsi que la particularité des tissus anciens. Les techniques expérimentales d'imagerie chimique et structurale employées pour notre étude seront également présentées. Nous rappellerons brièvement le principe physique sous-jacent, la nature des informations recueillies et les limites d'application. Le cas de l'imagerie par spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol sera plus particulièrement détaillé et illustré sur plusieurs exemples introductifs (Chapitre 1).

L'analyse de matériaux kératinisés, comme la surface de la peau, permet ensuite de préciser les difficultés d'étude de cette protéine en TOF-SIMS et d'envisager les dégradations auxquelles est exposée cette catégorie de tissus (Chapitre 2).

Enfin, après quelques rappels sur les momies (définition, typologies, techniques d'étude), les analyses de la peau de momies de provenances différentes et leurs dégradations sont présentées. Le cas de peaux modernes donne un élément de comparaison important (Chapitre 3).

Chapitre 1 : Tissus anciens et imagerie chimique



1	Peau de momie et matériaux biologiques anciens	4
1.1	Matériaux biologiques anciens _____	4
1.2	La peau : un matériau complexe _____	6
1.3	Autres tissus biologiques étudiés _____	13
2	Imagerie chimique et structurale _____	15
2.1	Observations structurales préliminaires _____	15
2.2	Analyse élémentaire _____	21
2.3	Imagerie chimique TOF-SIMS _____	22
2.4	Choix des échantillons et leur préparation _____	38
2.5	Étude des protéines en SIMS _____	50
	Bibliographie _____	83

Tout d'abord, je définirai ce qu'est un matériau biologique ancien et quelles sont ses spécificités. Puis je présenterai les différents tissus étudiés, en l'absence d'altération, et plus particulièrement la peau.

Dans un second temps, je détaillerai les techniques utilisées pour caractériser chimiquement et structurellement ces matériaux, en soulignant l'importance et les difficultés de la préparation des échantillons. J'expliquerai plus en détails le principe et la mise en œuvre de la technique d'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS, principalement utilisée dans cette thèse.

J'illustrerai enfin l'analyse de spectres et d'images TOF-SIMS sur le cas d'acides aminés, de protéines et de tissus osseux ancien et moderne.

1 Peau de momie et matériaux biologiques anciens

1.1 Matériaux biologiques anciens

Un certain nombre d'objets du patrimoine, archéologiques et d'œuvres d'art contiennent des protéines comme constituant chimique (Mills, 1999) :

- Matériaux du patrimoine contenant du collagène : colles de peau (préparation des toiles de tableaux), cuirs, parchemins, objets à base d'os, d'ivoire, de bois auxquels s'ajoutent les restes humains¹ tels que l'os ou le derme de la peau des momies.

- Matériaux du patrimoine à base de kératine : textiles en laine, cheveux de momies, cornes à boire et matériaux divers en corne, écailles (mobilier, éventails), plumes (poncho), pics teintés.

- Matériaux du patrimoine à base de soie : textiles en soie (bombyx ou araignée), supports d'écriture et de dessin, fils et des filets de pêche, pansements (Zhang, 2011).

Par rapport au tissu biologique d'origine, un matériau biologique ancien se distingue par les modifications structurales et chimiques qu'il a pu subir. Celles-ci peuvent être d'ordre divers et commencent à partir du décès de l'individu ou de l'animal dont provient le tissu. Chronologiquement, on peut répertorier les modifications éventuelles suivantes :

- mesures, intentionnelles ou non, limitant ou inhibant la putréfaction : tannage du cuir, embaumement ou préparation dessiccative de la peau (à l'aide de sable ou de sel par exemple)...

- modifications liées à l'esthétique, aux rites, à l'utilisation d'un objet : teinture des cheveux, des plumes ou des textiles, tatouages et peintures corporelles, taille des objets en corne ou en métal et adjonction de pièces en métal ou en bois, décreusage et tissage de la soie, chauffage, préparation de colle de peau...

¹ Si les questions éthiques liées à l'étude de restes humains ne sont pas abordées dans ce travail, nous sommes néanmoins conscients de la particularité de cette recherche sur des objets de musée.

- modifications mécaniques liées à l'utilisation et à l'exposition à l'environnement : usure mécanique, décollement de certaines parties fragiles, incorporation de substances issues du milieu d'enfouissement...

- dégradations chimiques et biologiques (attaques de champignons et bactéries) au cours du temps : disparition ou modification de la matière organique, minéralisations.

- mesures de conservation (musée) : exposition à des produits fongicides et parasitocides, vernissage, restaurations à l'aide de produits chimiques, présentation muséographique...

Sans négliger l'histoire des tissus lorsque celle-ci est connue, donc éventuellement les modifications qu'ils ont encourues, je me suis plus particulièrement intéressée aux modifications (bio) chimiques qu'ils ont pu subir. Plus spécifiquement, j'ai cherché à évaluer le degré de modification des protéines dans ces tissus.

La dégradation des protéines peut être repérée par des marqueurs chimiques issus de la rupture des liaisons assurant la cohésion des structures à différentes échelles. Ainsi en médecine le dosage de l'hydroxyproline ou de la pyridinoline dans les urines constitue un moyen d'évaluation du stade de dégradation des os du patient (dans le cas de la maladie de Paget par exemple). Dans le cas de la kératine, l'étude des procédés de teinture des cheveux par exemple pourrait apporter des pistes sur les dégradations possibles de la cystéine, composant majoritaire de la kératine. Ainsi on sait que dans l'Antiquité, les colorations au plomb, destinées à noircir les cheveux, étaient précédées par un traitement à la chaux destiné à rompre les ponts disulfures de la cystine en milieu basique. Un des produits de cette dégradation est la lanthionine. Il pourrait s'agir d'un marqueur intéressant de la dégradation de la kératine au cours du temps.

Outre la rupture des liaisons faibles puis des liaisons peptidiques, les radicaux des acides aminés des protéines peuvent aussi subir des modifications chimiques. Une des plus connues est la racémisation. Il a été montré que la racémisation des acides aminés, c'est-à-dire l'évolution vers un état où la proportion des acides lévogyre et dextrogyre s'équilibrerait, commence à la mort de l'individu et permet ainsi de dater celle-ci dans un environnement donné (Bada, 1975). Ces modifications dépendent en effet fortement des conditions environnementales d'enfouissement de l'objet puis de conservation de celui-ci.

Pour l'étude de la peau, j'étudierai aussi la présence et la dégradation éventuelles du cholestérol et des lipides de l'hypoderme.

Après avoir présenté la particularité des tissus biologiques anciens, intéressons nous plus en détail à la nature des matériaux de ce type, sans altération.

1.2 La peau : un matériau complexe

1.2.1 Structure de la peau humaine

La peau constitue 10% de la masse d'un corps humain et recouvre 2 m² sur 1,4 mm d'épaisseur en moyenne. Il s'agit d'un tissu souple, résistant et protecteur assurant également un rôle de régulation thermique et comportant de nombreux capteurs sensoriels (Perchec, 1994).

Trois couches principales, d'épaisseurs variables selon les zones du corps considérées, constituent ce tissu complexe stratifié (Figure 1-1). Chacune de ces couches possède une structure et une composition spécifique associées à des fonctions particulières (El Maghraby, 2008).

De la couche la plus externe à la plus interne, on dénombre :

- l'épiderme, couche stratifiée d'épaisseur variant de 50 à 200 µm : 100 µm en moyenne mais jusqu'à 600 µm au niveau des paumes de main et de la plante des pieds (Odland, 1971),
- le derme, de 1 à 5 mm d'épaisseur,
- et l'hypoderme (Prost-Squarcioni, 2006).

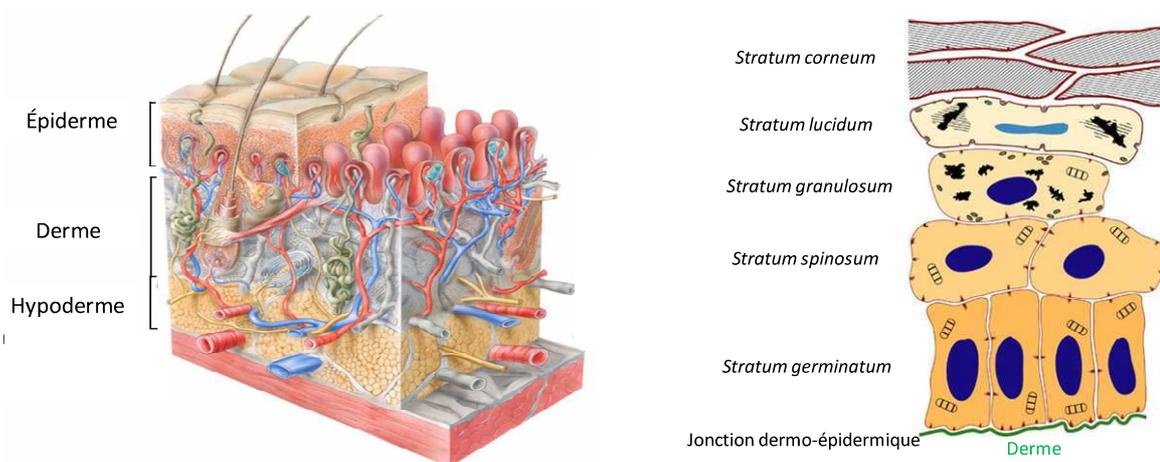


Figure 1-1 : Structure de la peau humaine et des couches kératinisées de l'épiderme. D'après (Delalleau, 2007).

L'**épiderme** est un tissu épithélial constitué essentiellement de cellules appelées kératinocytes qui assurent la fabrication de kératine molle (par opposition à la kératine dure des phanères : ongles, cheveux, plumes, becs, cornes, sabots, griffes, pics de porc-épic). Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, il s'agit d'une protéine fibreuse insoluble dans l'eau dont la composition est riche en soufre (Fraser, 1972).

Lors du processus de kératinisation, les cellules épidermiques, appelées kératinocytes, migrent vers la surface, s'écrasent, s'enrichissent en kératine, s'entourent d'un film hydrolipidique puis meurent lors d'un processus appelé desquamation. Comme illustré Figure 1-1, cinq couches fonctionnelles composent l'épiderme avec de la plus interne à la plus externe (Swanson, 1996) :

- le *stratum germinatum* : c'est le lieu de régénération des kératinocytes par mitose. Dans cette couche les kératinocytes ont une forme de cuboïde et un noyau rond. Cette couche est séparée du derme par une fine couche de collagène spécialisé, en suspension dans une matrice contenant des protéoglycanes et des glycoprotéines, appelée membrane basale ou jonction dermo-épidermique (JDE).

- le *stratum spinosum* : les kératinocytes y prennent une forme polyédrique et sont plus aplaties. Des cellules immunitaires dites de Langerhans sont présentes en insertion dans cette couche. Enfin on y trouve également des cellules dendritiques appelées mélanocytes qui produisent la mélanine, pigment naturel brun responsable de la couleur de la peau (les albinos n'en possèdent pas) qui se développe sous l'effet des rayons du soleil (bronzage). La mélanine dérive d'un acide aminé particulier appelé tyrosine. Deux voies de synthèse, catalysées par la présence d'une enzyme dite tyrosinase conduisent à la formation des pigments de phéomélanine (jaune) ou d'eumélanine (marron). Les mélanocytes se distinguent des kératinocytes par leur taille plus importante, la pâleur de leur cytoplasme et la présence de granules (ce qui les distingue aussi des cellules de Langerhans). La densité de mélanocytes dans le *stratum spinosum* varie peu d'un individu à l'autre mais diffère selon les zones du corps. Le cuir chevelu en compte environ 1000 par m² tandis qu'on en dénombre environ 2000 par mm² au niveau du visage (Fraser, 1972).

- le *stratum granulosum* : il contient des lipides formant une barrière imperméable à l'eau et prévenant les pertes fluidiques. Le film hydrolipidique créé au niveau de cette couche, autour des kératinocytes est constitué d'acides gras libres, de céramides et de sulfate de cholestérol (Proksch, 2006). Les kératinocytes y sont encore plus aplaties, présentent une membrane épaisse et leur noyau commence à se fragmenter.

-le *stratum lucidum* n'est visible que sur certaines parties du corps où l'épiderme est épais comme les dessous de pieds ou les paumes de mains. Les kératinocytes y sont anucléés.

-le *stratum corneum* est le lieu d'élimination des cellules kératinocytiques, mortes après 25 à 45 jours de migration depuis la base de l'épiderme. Les cellules visibles dans cette couche, appelées cornéocytes, sont anucléées, très aplaties, densément réparties et possède un cytoplasme entièrement rempli de kératine.

Le **derme**, tissu de nature conjonctive assure la cohésion de la peau et l'alimentation en nutriments de l'épiderme non vascularisé. Il contient au contraire de nombreux vaisseaux lymphatiques et sanguins ainsi que des terminaisons nerveuses, les bulbes des poils et les glandes sudorales et sébacées. Ces dernières assurant la fabrication du sébum, substance acide et grasseuse permettant la lubrification de la peau et la protection contre les bactéries. Le derme est composé de deux couches :

- la couche papillaire (1/5 de l'épaisseur environ) qui contient les terminaisons nerveuses, les vaisseaux et de nombreux fibroblastes qui synthétisent les composants macromoléculaires de la matrice extracellulaire. On trouve essentiellement du collagène de type I et de l'élastine en fibres fines. Ces deux protéines fibrillaires expliquent respectivement la résistance mécanique et l'élasticité de la peau (Kanitakis, 2002).

- la couche réticulaire, tissu conjonctif dense et irrégulier, pauvre en cellules, constitué d'un réseau de fibres de collagène de type III (leur diamètre varie de 2 à 15 µm) et plus épaisses d'élastine. Celles-ci confèrent à la peau sa souplesse. On y trouve également des glycoprotéines et des protéoglycanes qui constituent une matrice amorphe. Cette couche a la particularité de varier en épaisseur de manière importante sur les différentes zones du corps (épaisse sur le dos, elle est très fine sur les paupières).

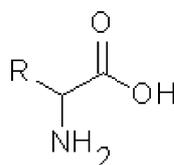
- Enfin, l'**hypoderme** est un tissu conjonctif grasseux lâche séparant le derme des os ou des tissus musculaires. Il joue le rôle d'isolant thermique et de réserve énergétique. Il est constitué de cellules grasses arrondies appelées adipocytes, groupées en lobules. Leur cytoplasme apparaît dépourvu de structures internes, sous le microscope optique. L'organisation des lobules d'adipocytes au sein de l'hypoderme diffère entre hommes et femmes. En outre la composition en triglycérides dépend de nombreux facteurs comme la génétique, le régime alimentaire et le sexe de l'individu. Le triglycéride majoritaire est POO suivi de PLO et OOO où P désigne l'acide palmitique, O l'acide oléique et L l'acide linoléique (Mayer, 1997).

1.2.2 Protéines de la peau

Parmi les molécules chimiques présentes dans la peau, j'ai choisi de m'intéresser plus particulièrement aux protéines dont l'état de dégradation, dans le cas des tissus anciens est mal connu.

Les protéines (du grec *prôtos*, premier) constituent une famille importante de macromolécules dans les tissus biologiques. Elles assurent en effet des fonctions essentielles aussi diverses que le transport de nutriments et d'informations, la mobilité et la contraction des tissus, leur structuration et leur protection ainsi que la catalyse de certaines réactions biochimiques (enzymes) et la régulation des organes (hormones). Une description détaillée de leurs fonctions biologiques est donnée dans le traité de biochimie de Rawn (Rawn, 1990).

L'unité de base de ces macromolécules est appelée **résidu acide aminé**. Un résidu acide aminé est caractérisé par la présence d'une fonction amine NH_2 et d'une fonction acide carboxylique COOH :



(R représente ici un groupe variable selon chaque acide aminé). Cette structure fait apparaître la présence d'un carbone asymétrique portant la fonction amine NH_2 (sauf dans le cas de la glycine où ce radical est un atome d'hydrogène). Chaque acide aminé possède ainsi au moins deux isomères optiques et il s'agit d'énantiomères. On parle donc d'acides aminés R ou S. Il est important de noter que dans la nature, les acides aminés non dégradés sont tous S sauf chez certains mollusques et certaines bactéries.

Vingt acides aminés standards (dits protéinogènes) interviennent dans les protéines des animaux et végétaux. Leur structure, leur nom, l'abréviation employée pour les désigner ainsi que les propriétés chimiques associées et leur masse moléculaire sont indiquées dans l'annexe 1. Tous les acides aminés n'interviennent pas nécessairement dans tous les peptides et toutes les protéines. D'autres acides aminés, dérivés des acides aminés standards peuvent intervenir dans la composition de protéines spécifiques. Ainsi le collagène, présent notamment dans la peau et les os, est souvent caractérisé par la présence d'un acide aminé spécifique, dérivé de la proline, appelé hydroxyproline. Cet acide aminé a une masse moléculaire de 131.13 Da, très proche de celles de la leucine et de l'isoleucine. A titre d'exemple, la composition en acides aminés de trois protéines (le collagène, la kératine et la fibroïne) est donnée dans le Tableau 1-1.

	Ala	Arg	Asp	Cys	Glu	Gly	His	Leu/Ileu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	OH-Pro	OH-Lys
Collagène	11.4	4.1	4.7	0.0	6.8	36.5	0.4	3.9	2.4	0.5	1.2	11.6	3.9	1.8	0.0	0.5	2.0	7.7	0.6
Kératine	6.9	7.2	9.2	7.5	16.6	5.2	0.7	13.9	3.5	0.4	2.0	3.8	9.0	5.5	0.0	2.5	6.1	0.0	0.0
Fibroïne	28.8	0.5	1.3	0.2	1.0	43.7	0.2	1.2	0.3	0.1	0.6	0.5	11.9	0.9	0.3	5.1	2.2	0.0	0.0

Tableau 1-1 : Comparaison de la composition en acides aminés du collagène de derme bovin (Bowes, 1955), de la kératine issue du cheveu (Akhtar, 1997) et de la fibroïne de soie (Saravanan, 2006). La composition est donnée en % de l'acide aminé dans la séquence de chaque protéine.² Les nombres indiqués en gras correspondent aux acides aminés majoritaires dans la séquence, ceux en italique correspondent aux acides aminés caractéristiques de la protéine.

On constate que les compositions en acides aminés du collagène, de la kératine et de la fibroïne sont assez différentes. Un moyen de les distinguer chimiquement sur un tissu biologique sera donc d'identifier les acides aminés qui sont spécifiques. On constate en effet qu'ils possèdent des acides aminés que l'on ne retrouve pas voire peu dans la plupart des autres protéines. Ainsi le collagène est la

² Les acides aminés sont désignés par leur abréviation, mentionnée dans l'annexe 1. Glu désigne ici à la fois l'acide glutamique et la glutamine et Asp l'acide aspartique et l'asparagine. Cys désigne la cystéine et la cystine. La leucine et l'isoleucine sont comptabilisées ensemble car il est impossible de distinguer ces isomères de position en TOF-SIMS.

seule protéine à contenir naturellement de l'hydroxyproline et de l'hydroxylysine. La kératine du cheveu contient quant à elle beaucoup de cystine (totalement absente dans le collagène) et la fibroïne, beaucoup d'alanine et de sérine.

Dans une protéine, comme dans tout peptide, chaque acide aminé est relié au suivant par une liaison covalente appelée liaison peptidique. Celle-ci relie la fonction amine du premier acide aminé à la fonction acide du second (une molécule d'eau est alors éliminée).

D'un point de vue structural, les protéines s'organisent dans l'espace d'une façon spécifique qui permet de les distinguer. Leur arrangement spatial dépend de l'enchaînement des acides aminés dans la chaîne car leurs propriétés physico-chimiques ainsi que leur encombrement stérique vont engendrer l'établissement ou non de liaisons supplémentaires entre deux acides aminés non successifs de la chaîne. On parlera alors de structure secondaire, tertiaire et quaternaire des protéines. L'enchaînement des acides aminés ou séquence, avec parfois la répétition d'un motif, constitue ainsi la **structure primaire** déterminante des structures supérieures.

La **structure secondaire** d'une protéine (ou d'un peptide) correspond au repliement de la chaîne d'acides aminés sur elle-même. La cohésion de cette structure est souvent assurée par l'établissement de liaisons hydrogènes entre un atome d'hydrogène de la fonction amine du premier acide aminé et l'atome d'oxygène de la fonction carbonyle C=O d'un autre acide aminé de la séquence. Parmi les structures possibles, deux sont particulièrement importantes : l'hélice alpha et le feuillet bêta (Pauling, 1951).

L'hélice alpha est un enroulement d'une chaîne ou d'une partie de la chaîne d'acides aminés en forme d'hélice droite, d'un pas de 0.52 nm et de 0.46 nm de diamètre. La kératine du cheveu, par exemple, possède cette structure secondaire dans sa partie centrale.

Le feuillet bêta est constitué par plusieurs parties de chaîne (ou brins bêta), plissées du fait des liaisons hydrogènes existant régulièrement entre elles (voir Figure 1-2). Les différents brins sont repliés les uns sur les autres. Cette structure se retrouve dans la fibroïne de soie (Hennen, 2001).

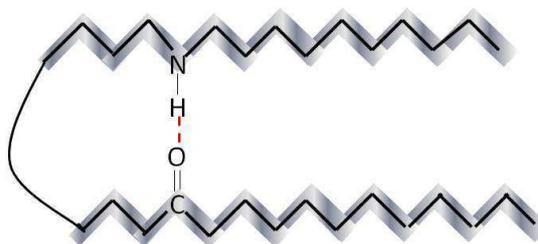


Figure 1-2 : Schéma de la structure secondaire en feuillet bêta. A titre d'exemple, une liaison hydrogène entre les deux brins plissés de la chaîne est indiquée par des pointillés rouges. Le trait noir matérialise le squelette polypeptidique.

Dans le cas du collagène, une autre structure secondaire existe : l'hélice C, hélice gauche de pas 0.94 nm (Baltimore, 2000).

La **structure tertiaire** d'une protéine correspond à un repliement supplémentaire qui minimise le rapport surface sur volume rendant ainsi la molécule plus compacte et moins exposée aux agents dénaturants. La configuration préférentielle correspondra toujours à un minimum d'énergie libre. Dans le cas des protéines fibrillaires étudiées, il s'agit, dans la plupart des cas, d'un assemblage particulier des structures secondaires hélicoïdales, en double hélice par exemple.

Lorsque la protéine est composée de plusieurs chaînes polypeptidiques, les différentes structures tertiaires s'arrangent en une **structure** supérieure dite **quaternaire**. Ce cas correspond à des protéines lourdes (de masse moléculaire supérieure à 100 kDa). Dans le cas du collagène, par exemple, les microfibrilles, de 50 nm de diamètre, sont constituées de molécules de tropocollagènes décalées les unes par rapport aux autres de 32 nm grâce à l'établissement de ponts covalents entre les résidus lysine des différentes chaînes. Cette particularité permet de reconnaître les fibres de collagène au sein d'un tissu en microscopie électronique à transmission.

Afin de clarifier notre propos, les caractéristiques des protéines structurales étudiées dans cette thèse sont présentées, pour chaque niveau de structure, dans le Tableau 1-2.

Niveau structural	<u>Collagène I</u> (M=285 kDa)	<u>Kératine du cheveu</u> (M=50 kDa)	<u>Fibroïne de soie</u> (M=350 kDa)
Acides aminé majoritaires	Gly, Ala, Pro, Hyp	Cys, Glu, Leu, Ser	Gly, Ser, Ala
Particularités de la structure primaire	Motif : Gly-Pro-Hyp	Heptades	Motif : Ser-Gly-Ala-Gly
Structure secondaire majoritaire	Hélice C gauche = procollagène	Hélice alpha droite	Feuillets bêta antiparallèles
Structure tertiaire	Superhélice triple droite = tropocollagène	Superhélice double gauche	Empilement de feuillets = nanofibrilles (5 nm de diamètre)
Structure quaternaire	Microfibrilles = assemblage de superhélices avec un décalage de 32 nm	Protofibrilles = torsade de deux superhélices	Faisceaux de nanofibrilles (100 nm de diamètre)
Structures histologiques	- Fibrilles (500 nm de diamètre) - Fibres (1 à 10 µm)	- Filament intermédiaire = hélice inclinée, de 6 à 10 protofibrilles (8 nm de diamètre) - Macrofibrilles (de 1 à 4 µm)	Brins de fibroïne de soie (triangulaire, de 5 à 10 µm de large)

Tableau 1-2: Structures hiérarchiques du collagène de type I (peau, os, tendon), de la kératine du cheveu et de la fibroïne de soie.

1.3 Autres tissus biologiques étudiés

Afin de mieux comprendre la composition et la dégradation de la kératine et du collagène au cours du temps, j'ai étudié d'autres matériaux contenant l'une ou l'autre de ces protéines. Dans la plupart des cas, une partie de chaque échantillon a initialement été utilisée pour la datation carbone 14 et ils sont donc tous datés précisément. Des échantillons modernes ont été pris pour référence.

J'ai limité mon étude au cas des tissus : le cas des fluides biologiques (sang, urine...) ne sera donc pas abordé.

1.3.1 Tissus biologiques collagéniques

Le collagène (du grec *kolla* qui signifie colle) est présent dans de nombreux tissus biologiques structuraux. Outre le derme de la peau, il est présent dans la paroi des vaisseaux sanguins, la matrice osseuse ainsi que les dents et les défenses mais aussi la cornée. Il existe en réalité 23 types de collagène qui se différencient notamment par leur teneur en hydroxyproline et hydroxylysine. Dans le cas de la peau, seuls les collagènes de type I et III nous intéressent. Le collagène de type I se retrouve dans le derme mais également les os et la cornée.

Cette protéine est stabilisée, thermiquement et mécaniquement (Kronick, 1996), par l'interaction avec des minéraux de type phosphates de calcium (hydroxyapatite de l'os ou fluoroapatite des dents) ou avec des composés organiques (cas des produits de tannage du cuir ancien et des parchemins).

A titre d'exemple, le cas de l'os sera traité à la fin de ce chapitre (paragraphe 2.5.2.3).

1.3.2 Tissus biologiques kératinisés

Outre l'épiderme, la kératine est présente dans de nombreux phanères (tissus dérivés de l'épiderme) tels que les poils (cheveux, laine, moustaches, sourcils, cils, vibrisses des félins et des rongeurs...), les cornes, les plumes, les becs, les pics (de porc-épic par exemple), les écailles, les griffes (ongles, sabots, serres) et les fanons des cétacés (Fraser, 1972).

Dans ces différents tissus, la kératine peut être présente sous forme de fibres ou non.

L'étude des tissus biologiques kératinisés sera détaillée dans le chapitre 2.

1.3.3 Cas de la soie : une protéine simple, la fibroïne

La soie, comme la laine, est une fibre textile naturelle d'origine animale. Produite par différents insectes (papillons, frelons, araignées, chenilles), elle leur permet de constituer leur toile ou leur cocon. Pour le textile, on utilise principalement la soie produite par les vers à soie. Les larves du vers à soie *Bombyx Mori* sont élevées pour produire de la soie et se nourrissent exclusivement de feuilles de mûrier tandis que

les vers à soie sauvages se nourrissent de feuilles de chêne (Schroeder, 1955) et produisent une soie de structure et de composition protéique légèrement différente (Marsh, 1955).

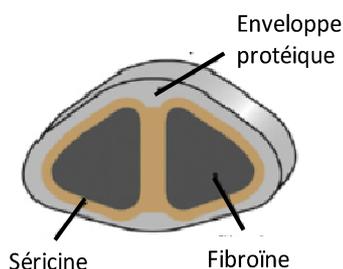


Figure 1-3: Schéma de la section d'un filament de soie Bombyx Mori (d'après Hardy, 2010)

La soie est particulièrement appréciée pour sa couleur brillante et ses reflets, son toucher mais aussi sa résistance. La soie domestique est transparente tandis que la soie sauvage est brune. L'élevage du vers à soie ou sériculture a débuté en Chine dès 5000 ans av. J.-C. Hormis le textile, elle est aujourd'hui également utilisée dans l'industrie cosmétique (Jauzein, 2009).

Le fil de soie est un fil continu qui peut faire plus d'un kilomètre de long sans interruption (Sotton, 1985). Le cocon récolté est étuvé pour tuer la chrysalide qui se trouve à l'intérieur. Puis le fil est dévidé après avoir été plongé dans l'eau chaude pour assouplir le cocon et séparer les fils collés. Le fil de soie grège est constitué à partir des fils de plusieurs cocons. Plusieurs opérations sont encore nécessaires pour obtenir un fil propre au tissage et éventuellement le colorer.

Chaque fil de soie, de 25 à 30 μm de large, est extrudé par le vers, à température ambiante, sous la forme d'un gel protéique.

Ceci explique qu'une section de filament de soie se présente sous la forme de 2 brins en forme de triangles équilatéraux arrondis (brins issus des 2 glandes de la larve) de 5 à 10 μm de large. Ces brins sont constitués d'une protéine, la fibroïne. Ils sont entourés et maintenus ensemble par une colle constituée d'une autre protéine : la séricine. Celle-ci protégerait la fibre, entre autres, contre les dégradations que peut occasionner une exposition à la lumière. La soie sauvage présente des brins plus allongés et des fibres plus épaisses (jusqu'à 65 μm). Les protéines recouvrant l'ensemble fibroïne/séricine protègent le cocon des bactéries et des prédateurs (Hardy, 2010).

La composition de la soie est particulièrement simple puisque la séquence de la fibroïne comprend seulement 3 acides aminés majoritaires (glycine, alanine et sérine) et celle de la séricine quatre (sérine, asparagine, thréonine, glycine). En outre, les proportions différentes en acides aminés principaux peuvent permettre de différencier les deux protéines. L'asparagine semble un bon marqueur de la présence de séricine (donc de grès dans la soie) et la présence de cystéine, proline et leucine doit permettre de différencier chimiquement une fibre de laine d'une fibre de soie.

L'étude de la soie peut ainsi permettre de comprendre la signature, en TOF-SIMS d'une protéine de composition particulièrement simple. En effet, contrairement à la kératine et au collagène, les protéines de soie sont majoritairement constituées de trois acides aminés seulement.

Après avoir présenté les différents tissus biologiques étudiés, je vais détailler les techniques expérimentales utilisées pour les étudier. Je montrerai plus particulièrement, sur l'exemple des protéines étudiées et de l'os, les spécificités de l'analyse TOF-SIMS.

2 Imagerie chimique et structurale

2.1 Observations structurales préliminaires

2.1.1 Microscopie optique

Après l'examen à la loupe binoculaire, la microscopie permet de regarder le prélèvement à une échelle suffisamment petite pour pouvoir l'orienter comme souhaité.

Elle est aussi utilisée pour contrôler l'état des coupes obtenues en ultramicrotomie : la coupe contient-elle l'ensemble du matériel à analyser ? L'orientation est-elle conforme à ce qui était envisagé ? La coupe présente-t-elle des plis, des trous, des stries ? Cette observation, consciencieuse et répétée permet de choisir par exemple d'arrêter de couper si le matériel est présent en totalité et/ou si la surface est fragilisée, de changer d'échantillon, de modifier la fenêtre de coupe...

Elle permet également de repérer les structures biologiques et ainsi de prévoir ce qui doit être vu ensuite en analyse. C'est la technique la plus couramment utilisée lors de l'étude des tissus, du fait de sa simplicité de mise en œuvre.

Pour ce travail, le microscope utilisé est un Nikon Labophot-2 équipé de lentilles x5 à x50, muni d'un appareil photo Nikon digital sight DS-Fi1. Le logiciel utilisé est Nikon NIS-Elements (Nikon, Tokyo, Japon).

2.1.2 Colorations histologiques

L'histologie est l'étude de l'anatomie microscopique des cellules et des tissus des plantes et des animaux. Elle est très utile en médecine et en biologie. Elle consiste en l'examen de coupes fines de tissus au microscope optique et/ou électronique en accentuant certaines structures à l'aide d'un colorant, naturel ou artificiel (du genre de ceux utilisés dans l'industrie du textile), pour les différencier.

Cette technique est largement utilisée pour l'étude des tissus momifiés. Ainsi, le stratum corneum, souvent lâche par rapport au reste de la peau, peut être visualisé s'il est encore présent (Boano, 2009), les fibres de collagène du derme peuvent être mises en évidence (Bereuter, 1996) ainsi que les tissus musculaires striés (Pääbo, 1985) de même que les adipocytes de l'hypoderme (Mekota, 2005), dans les momies égyptiennes embaumées comme dans la momie des glaces Ötzi. Certaines colorations soulignent la présence de champignons ou de parasites caractéristiques d'une pathologie (Mekota, 2005).

Le premier à pratiquer l'histologie sur des tissus de momies fut Ruffer en 1921. Une fois obtenus (à l'aide d'une endoscopie par exemple) les tissus sont en principe réhydratés puis fixés avant l'application du ou des colorants sélectifs d'un type de structure biologiques (David, 1997).

Parmi la multitude de colorants possibles, on utilise fréquemment en biologie des tissus le couplage H&E (coloration hématoxyline-éosine) et la coloration trichrome de Masson. Les autres colorants (dits signalétiques) sont plus spécifiques. La durée d'immersion dans les bains varie selon les colorants, les tissus et les techniques de quelques dizaines de secondes à quelques dizaines de minutes. Durigon, qui a notamment étudié les tissus de Ramsès II, précise qu'il faut doubler ces temps dans le cas des tissus momifiés par rapport aux temps indiqués pour les tissus biologiques frais (Durigon, 1985).

Les colorations classiques utilisent un protocole similaire :

- réhydratation des coupes (car les colorants sont en solution aqueuse) : bains d'alcools de degrés décroissants puis eau par exemple
- fixation des coupes de tissus sur la lame de verre (à l'aide de formaldéhyde, de formol ou de réactif de Bouin par exemple)
- colorations
- déshydratations dans des bains d'alcools de degrés croissant puis dans du toluène/xylène (attention ces substances sont cancérigènes et font fondre le plastique !)
- montage anhydre à l'aide d'une résine (d'indice de réfraction voisin de celui du verre) entre lame et lamelle (meilleure conservation et protection des tissus)
- séchage et évaporation du toluène/xylène

Les préparations microscopiques (ou « lames ») ainsi réalisées peuvent être conservées à température ambiante, à l'abri de la lumière pendant plusieurs années.

L'interprétation est souvent difficile dans le cas des tissus momifiés et plusieurs examens sont parfois nécessaires (Durigon, 1985).

L'histologie peut cependant s'avérer délicate à mettre en œuvre sur des tissus anciens car elle nécessite une bonne adhérence des coupes de tissu sur la lame de verre trempée successivement dans différents bains de colorants. Nos essais sur des coupes de peau de momie très sèches du désert du Taklamakan n'ont pas permis de visualiser clairement les structures. Cette technique a été mise en œuvre au NBCM (Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, Gif/Yvette), grâce à l'aide de Sabine de la Porte.

Nous avons effectué une première coloration classique hématoxyline-éosine (Figure 2-1 a). Les noyaux doivent apparaître en bleu/violet (affinité avec l'hématéine basique), les cytoplasmes des cellules en rose, les cellules du sang en rouge orangé et les fibres élastiques, réticulaires et de collagène en rose-orangé/rouge clair (affinité avec l'éosine acide). Les adipocytes apparaissent en clair, sans coloration particulière.

Une seconde coloration au Trichrome de Masson a été utilisée. Celle-ci sert à repérer la présence de tissu conjonctif³. En effet les fibres de collagène se colorent en

³ Sabine de la Porte, communication privée

bleu, la kératine en rouge et les noyaux des cellules en noir. L'image Figure 2-1 b indique la présence des deux protéines dans la peau de momie étudiée mais révèle aussi la désorganisation de la coupe probablement liée à l'échantillon autant qu'au protocole de préparation (prélèvement, réhydratation, enrobage dans l'OCT et coupe en cryomicrotomie).

Une dernière coloration, moins conventionnelle et jamais employée auparavant pour l'étude des peaux de momies a été utilisée : la coloration au rouge de Nil. Le protocole de cette coloration spécifique est moins lourd mais les lames doivent être observées sous un microscope à fluorescence et ne peuvent être conservées qu'à -20°C et pendant quelques semaines seulement. On dépose deux gouttes de solution de colorant avant de poser la lamelle et de sceller à l'aide de vernis. Ce colorant spécifique permet l'étude des gouttelettes lipidiques présentes dans les cellules car il est lipophile. En revanche aucune information sur la classe des lipides présents ne peut être obtenue. La Figure 2-1 c révèle la présence de lipides en fine couche d'un côté de la coupe (épiderme ?) et en amas de taille plus importante dans une couche plus profonde (hypoderme ?).

La coloration des coupes à l'aide d'un colorant peut aussi être utilisée lors des séances de préparation d'échantillon en ultramicrotomie. Ainsi nous avons pu confirmer la présence de fibres dans certaines coupes fines (Figure 2-1 d) où celles-ci, en l'absence de colorant (ici du bleu de méthylène), avaient la même apparence que des trous.

Des essais prometteurs d'imagerie TOF-SIMS (des lipides en particulier) et d'histologie (coloration hématoxyline & éosine), sur les mêmes coupes de tissu frais (cerveau de rat), ont été réalisés (Bich, 2012) mais la technique doit être développée pour les tissus anciens.

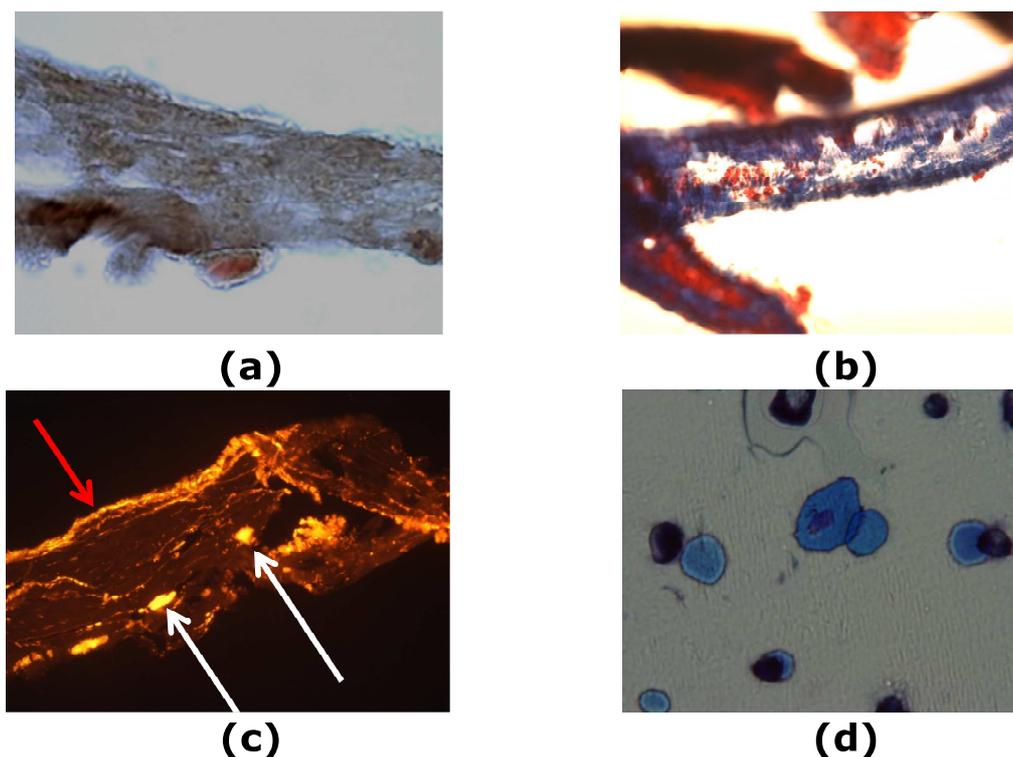


Figure 2-1 : Images au microscope optique de coupes histologiques (a-c) de peaux de momies chinoises enrobées dans l'OCT et préparées en cryomicrotomie, colorées (a) à l'H&E, (b) au Trichrome de Masson et (c) au rouge de Nile. Les flèches blanches désignent les gouttelettes lipidiques et la flèche rouge une zone enrichie en lipides. (d) Coupe de fibres de laine moderne colorée au bleu de méthylène.

2.1.3 *Microscopie électronique à balayage*

Si le degré de détails obtenus pour l'étude effectuée n'est pas suffisant, on peut réaliser une étude au microscope électronique. On utilise alors un faisceau d'électrons plutôt que la lumière visible et on passe ainsi typiquement d'un pouvoir séparateur de 0,2 micromètres à une dizaine de nanomètres.

Une étude MEB (microscopie électronique à balayage) permet par exemple d'identifier les insectes présents dans les tissus momifiés. Dans notre cas, il permet également de contrôler la qualité de la préparation de l'échantillon (retrait, déplacement de matière, fissures...).

2.1.3.1 *Principe physique*

Un faisceau d'électrons d'une énergie de 5 à 30 keV est envoyé sur la surface de l'échantillon. L'impact provoque différents phénomènes parmi lesquels :

- la rétrodiffusion de certains électrons incidents (rétrodiffusion de type Rutherford)
- l'éjection d'électrons issus des atomes situés à l'ultrasurface (dix premiers nanomètres)

- l'émission de rayons X liés à l'excitation des atomes proches de la surface, par le faisceau électronique incident

Ces trois phénomènes sont exploités dans le microscope électronique pour obtenir des informations à la fois chimiques et topographiques sur l'échantillon (Brisset, 2008).

2.1.3.2 Instrumentation

Les analyses en microscopie électronique à balayage sont, en principe, réalisées sous un vide poussé (de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-6} hPa). Ceci permet de limiter les interactions entre les électrons (incidents, rétrodiffusés et secondaires) et les molécules de gaz résiduel dans la chambre d'analyse.

Le caractère isolant des échantillons biologiques, en particulier inclus en résine provoque l'accumulation d'électrons à la surface de l'échantillon, susceptibles de perturber l'analyse. Ce problème ne se pose pas si la surface est conductrice. C'est pourquoi, on recouvre, le plus souvent, la surface des matériaux isolants, d'une couche fine d'or ou de carbone. C'est, par exemple, ce que Williams a fait pour étudier la peau de la momie Ötzi (Williams, 1995). Cette opération empêche toute analyse ultérieure de l'échantillon.

Pour pallier cet inconvénient, il est possible de travailler en mode dit « à pression variable ». L'idée consiste à augmenter légèrement la pression dans la chambre d'ionisation de 0.1 à 1 hPa. Le libre parcours moyen varie alors entre 700 et 70 μm ce qui signifie que les interactions ne sont plus négligeables. Il en résulte, entre autres, l'ionisation des molécules du gaz résiduel qui permettent la décharge de la surface à analyser. Le choix de la pression doit être optimisé, comme l'a montré Vincent Mazel dans sa thèse (Mazel, 2006b)

2.1.3.3 Caractéristiques de l'analyse

Pour l'acquisition d'images en MEB, deux modes sont possibles :

- si l'on utilise la détection des ions secondaires, c'est le mode SE (pour Secondary Electrons) et l'on accède essentiellement à une information de nature topographique

- si l'on s'intéresse à la détection des électrons rétrodiffusés, c'est le mode BSE (pour Backscattering Electrons). La section efficace de diffusion des électrons étant proportionnelle au numéro atomique Z au carré, le nombre d'électrons rétrodiffusés sera plus important pour les éléments lourds. On accède ainsi à une information de contraste chimique.

En effectuant alors un balayage de la surface analysée, on peut obtenir des cartes de la topographie de l'échantillon (mode SE) ou des cartes de contraste chimique (mode BSE). Sur chaque image-carte, les caractéristiques de l'analyse (tension d'accélération des électrons, pression choisie et échelle) sont indiquées.

La résolution spatiale du MEB est de l'ordre de dix nanomètres et la profondeur effectivement analysée est de quelques nm en mode SE mais de l'ordre du micron en mode BSE.

Dans cette thèse, j'ai utilisé un microscope électronique à balayage XL 30 CP ESEM (Philips Co., Pays-Bas), le plus souvent en mode « pression variable ».

L'utilisation du mode BSE est la seule possible en mode « pression variable » sur le microscope électronique du C2RMF.

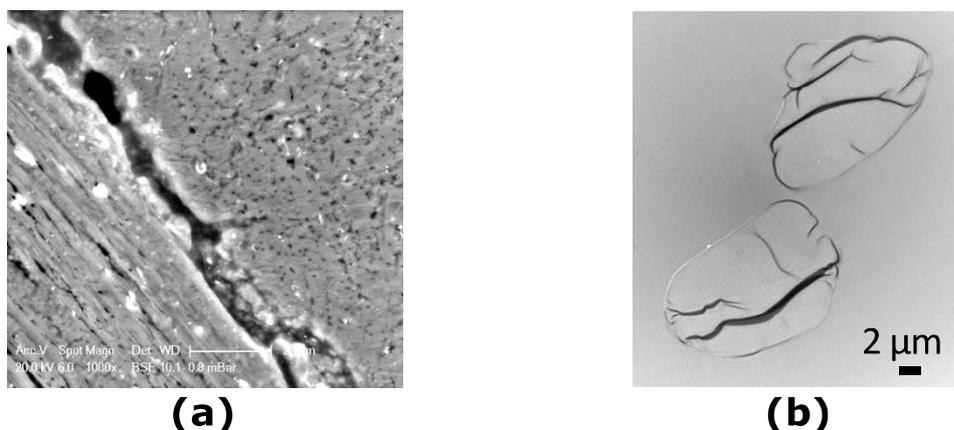


Figure 2-2 : Exemple d'image de microscopie électronique. (a) Image MEB-BSE en mode "pression variable" d'une peau de momie du Pérou. Zoom sur la jonction entre le derme (fibres de collagène à gauche de l'image) et l'épiderme (à droite). (b) Image MET d'une coupe de fil de soie moderne. Tension d'accélération : 80 kV. Grossissement : x2800.

2.1.4 Microscopie électronique en transmission

La microscopie électronique en transmission consiste, comme le MEB, à bombarder la surface d'une lame mince à l'aide d'un faisceau d'électrons accélérés et focalisés. L'image observée en transmission à travers la lame mince indique les différences de densité dans l'échantillon. En pratique, cette technique est très utilisée en biologie pour identifier et repérer les structures d'un tissu à l'échelle nanométrique. Elle permet, par exemple, de visualiser les grains de mélanine du cheveu, de mesurer le diamètre des fibrilles de collagène du derme (Stücker, 2001 ; Shin, 2003).

Cette technique de haute résolution spatiale nécessite cependant de pouvoir préparer des lames minces de l'échantillon. Ces coupes ultrafines (de l'ordre de quelques dizaines de nm) peuvent être réalisées en ultramicrotomie à l'aide d'un couteau diamant adapté. Cette opération n'est pas toujours réalisable sur les tissus biologiques anciens. En outre, la qualité des images est fortement améliorée par l'emploi d'un contrastant préalablement à l'inclusion, comme l'acétate d'uranyle. Cette étape n'a pas été réalisée lors de la plupart de nos études, afin que le même échantillon puisse être utilisé pour effectuer des coupes semi-fines pour l'imagerie TOF-SIMS et le MEB d'une part, et ultrafines pour le MET d'autre part.

L'autre difficulté réside dans l'interprétation des images : elle nécessite en effet de bien connaître le tissu étudié et de pouvoir se repérer dans son organisation structurale à l'échelle des images obtenues.

Les images de MET présentées dans cette thèse ont été acquises avec Danielle Jaillard au Centre Commun de Microscopie Électronique (UMR 8080) à Orsay. Le MET utilisé est un Philips EM208 équipé d'une caméra d'acquisition CCD grand champ AMT.

Deux exemples d'images obtenues en microscopie électronique sont présentées sur la Figure 2-2.

2.2 Analyse élémentaire

2.2.1 Principe du MEB-EDX

Le principe de l'analyse élémentaire par MEB-EDX repose sur l'émission de rayons X liés à l'excitation des atomes proches de la surface, par le faisceau d'électrons du MEB. Ce rayonnement est en effet caractéristique des atomes de l'échantillon qui est excité. Ainsi le couplage du MEB avec un spectromètre à dispersion d'énergie (ou EDX pour Energy Dispersive X-Ray) permet d'effectuer une analyse chimique élémentaire de la surface de l'échantillon.

L'information est recueillie sous la forme d'un spectre représentant l'intensité des photons X en fonction de l'énergie des raies correspondantes. En balayant toute la surface, il est possible d'obtenir une carte de répartition des éléments chimiques de l'échantillon.

2.2.2 Intérêt et limites

L'analyse élémentaire par MEB-EDX permet d'obtenir une répartition spatiale des éléments minéraux, de manière fiable et rapide. La mise en œuvre est relativement aisée mais il est préférable de travailler sur les échantillons plans.

Le choix de la tension d'accélération des électrons doit être optimisé : trop élevée, elle risque d'endommager l'échantillon, trop faible, elle ne permet pas d'exciter les atomes correspondant à des raies d'émission X de haute énergie. On choisit en général une tension d'accélération correspondant à 1,5 fois l'énergie de la raie X la plus énergétique que l'on souhaite observer.

Un exemple d'analyse MEB-EDX est présenté Figure 2-3.

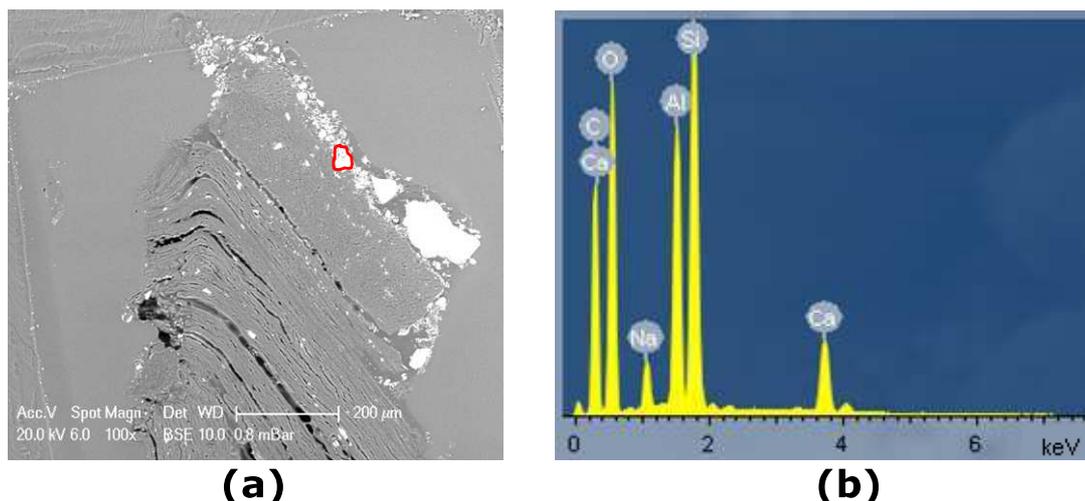


Figure 2-3 : Exemple d'analyse élémentaire en MEB-EDX. (a) Image MEB-BSE d'une peau de momie du Pérou sur laquelle est délimitée la zone étudiée et (b) spectre EDX de cette zone.

Ponctuellement, d'autres techniques d'analyses ont été utilisées (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et diffraction des rayons X). Leur principe et l'intérêt de leur utilisation sera rapidement précisé lors de la présentation des études correspondantes.

2.3 Imagerie chimique TOF-SIMS

L'analyse par spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol (TOF-SIMS pour *Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry*) peut être appliquée à tout matériau que l'on peut soumettre à un vide poussé. Ainsi, une grande variété de matériaux et de composés ont déjà été étudiés avec cette technique : semi-conducteurs (Hopstaken, 2012), polymères (Möller, 2003), papier (Fardim, 2005 ; Benetti, 2011), bois (Goacher, 2011), verre (Lehuede, 1987 ; Duckworth, 2012), tissus biologiques, pour des applications biomédicales par exemple (Brunelle, 2005 ; Touboul, 2006), peintures (Keune, 2009, Richardin, 2011a et Sanyova, 2011) métaux (Ayoub, 2012), roches (Dickinson, 2006 et Siljeström, 2011), biominéraux (Dauphin, 2010 ; Farre, 2011) ou encore tissus végétaux (Tokareva, 2007 ; Seyer, 2010).

Selon les matériaux et les informations recherchées, ces analyses se limitent en profondeur aux 5 à 10 premiers nanomètres (mode dit « statique ») ou concernent successivement plusieurs monocouches atomiques pour l'obtention de profils ioniques sur quelques microns d'épaisseur (mode dit « dynamique »). On recueille ainsi des informations sur la nature chimique élémentaire et moléculaire de la surface de l'échantillon pour des éléments allant de l'hydrogène (m/z 1) à des composés ayant un rapport masse sur charge de 1500.

Les spectres de masse recueillis sont l'empreinte digitale de la surface du matériau et permettent la détection des principales fonctions chimiques en vue de l'identification des molécules de surface.

2.3.1 Principe

2.3.1.1 Interaction ions primaires/matière

Lorsqu'un ion frappe une surface avec une énergie de quelques dizaines de keV (Figure 2-4), diverses particules sont émises (photons, électrons, atomes et molécules neutres, ions secondaires positifs ou négatifs).

L'ion primaire qui impacte la surface du solide, pénètre en volume jusqu'à une certaine profondeur⁴ déposant de l'énergie sur son passage. L'énergie mise en jeu étant de l'ordre de 20 keV, le dépôt d'énergie s'effectue par collisions nucléaires (Brunelle, 2005). L'énergie déposée par interaction du faisceau d'ions-projectiles avec les noyaux des atomes du solide entraîne une cascade de collisions. Ce phénomène se produit sur une profondeur variant selon la nature du substrat et des ions primaires. Celui-ci est très court (de 10^{-11} à 10^{-12} s) et produit l'énergie nécessaire à la pulvérisation de la cible sous forme d'ions secondaires (Benninghoven, 1993).

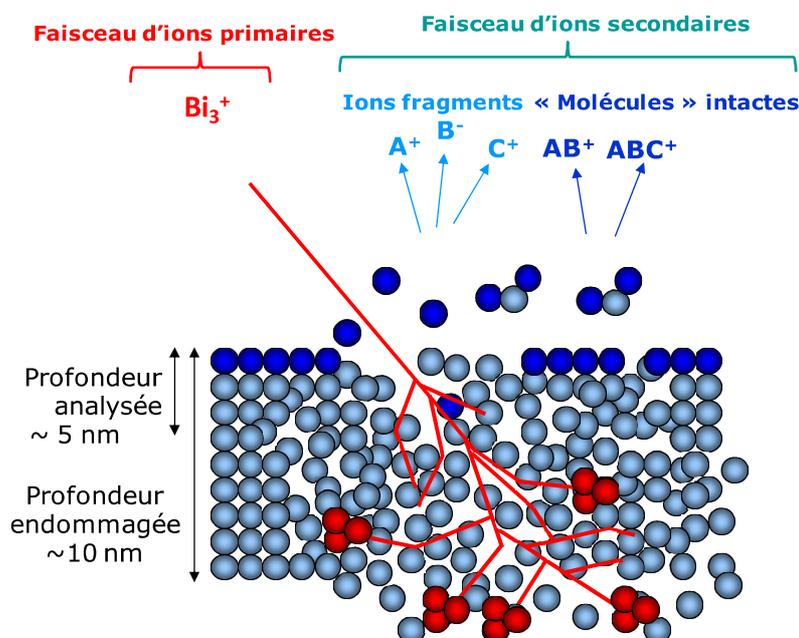


Figure 2-4 : Principe d'émission des ions secondaires

Des atomes sont en effet mis en mouvement en volume. Si l'énergie déposée à un endroit donné est supérieure à l'énergie de liaison des atomes et molécules, des liaisons sont brisées près du point d'impact et des éléments, des fragments, ou plus rarement des ions moléculaires intègres, sont émis (Sodhi, 2004). Plus on s'éloigne de la zone d'impact, moins les liaisons sont brisées. Si l'énergie déposée est en outre supérieure à l'énergie de surface de l'échantillon, des molécules intactes sont émises (Belu, 2003). 99,99% des fragments ainsi éjectés sont neutres. Le reste est constitué d'ions fragments positifs ou négatifs, appelés ions secondaires, qui sont les

⁴ Cette profondeur de pénétration a été estimée, par simulation, pour des agrégats de type Bi_3^+ , à 25 keV, dans le cas d'un tissu adipeux, à 30 nm (Debois, 2007).

fragments analysés par la technique TOF-SIMS. Les ions émis nous renseignent sur la nature et la structure des molécules présentes au sein de l'échantillon.

Ils sont ensuite séparés en fonction du rapport de leur masse sur leur charge m/z dans un analyseur à temps de vol (Vickerman, 2001).

2.3.1.2 Nature des ions secondaires

Les ions secondaires émis par le processus décrit au paragraphe précédent peuvent être de plusieurs natures :

- Ions « simples » : Na^+ , K^+ , F^- ...
- Ions moléculaires et adduits $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$
- Ions composés tels que des agrégats métalliques ou des ions composés (carboxylates métalliques, hydroxydes....)
- Fragments

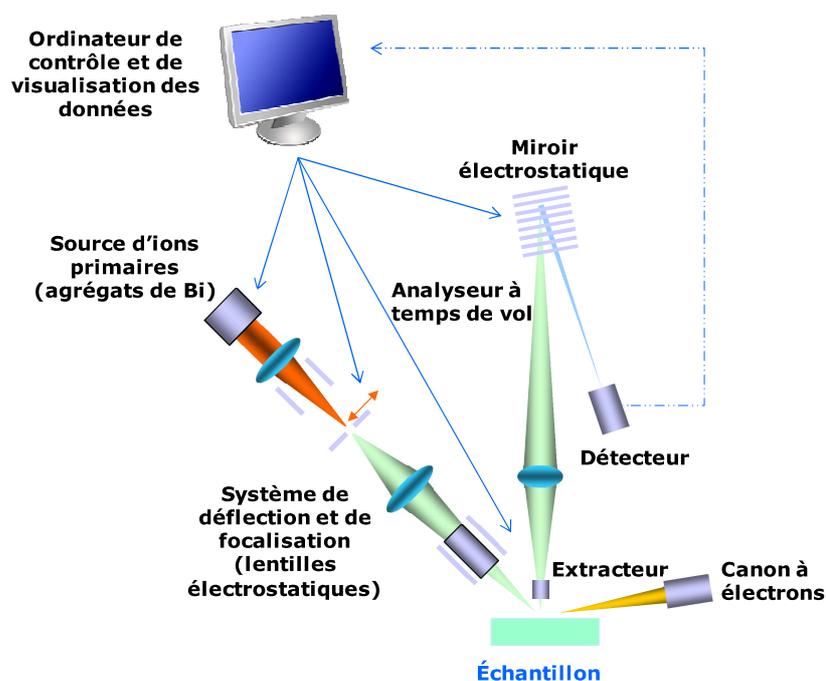


Figure 2-5 : Schéma du dispositif d'analyse TOF-SIMS (d'après <http://www.ion-tof.com/>).

En général, les éléments électropositifs, tels que le sodium ou le calcium, donnent des ions simples positifs : ils seront donc détectés préférentiellement en mode d'ionisation positif. A l'inverse, les éléments électronégatifs (fluor, soufre par exemple) donnent des ions secondaires négatifs donc détectables en mode d'ionisation négatif.

Enfin, il faut être conscient, lors des analyses, que le taux d'ionisation d'une molécule donnée varie en fonction de l'environnement dans lequel elle se trouve (tissu, substrat particulier...).

2.3.2 *Dispositif expérimental*

Le dispositif expérimental utilisé dans cette thèse est présenté schématiquement Figure 2-5. L'ensemble des expériences présentées a été réalisé à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif-sur-Yvette, dans l'équipe d'Alain Brunelle, sur un appareil TOF-SIMS IV de la société ION-TOF (GmbH, Münster). Le logiciel d'acquisition et de traitement des données utilisé depuis avril 2010 est Surface Lab 6.1 (ION-TOF GmbH, Münster, Allemagne).⁵

2.3.2.1 *Source d'ions primaires*

La surface est bombardée par des impulsions très courtes d'ions primaires (1 à 30 ns). Les sources d'ions utilisées sont souvent comme ici des sources à pointe métallique liquide (en anglais LMIG pour *liquid metal ion gun*), car celles-ci sont brillantes, stables et peuvent produire des faisceaux d'ions submicroniques. Le principe d'émission est le suivant : l'alliage de bismuth solide est chauffé jusqu'à son point de fusion. Il mouille alors une pointe placée au voisinage d'un extracteur. Sous l'effet du champ électrique intense produit au niveau de l'extracteur, la pointe émet des ions en phase gazeuse en ayant formé un cône de liquide conducteur appelé cône de Taylor.

L'utilisation d'agrégats, de bismuth Bi dans notre cas, donnant des faisceaux plus intenses que les agrégats d'or (Touboul 2005 ; Winograd, 2005), permet d'augmenter l'émission d'ions secondaires en particulier sur les échantillons organiques. En effet, un agrégat composé de plusieurs atomes possède, à énergie totale fixée, une énergie par atome et une vitesse plus faible qu'un projectile (Kollmer, 2004). De plus, l'énergie déposée étant alors très élevée, il y a recouvrement des cascades de collisions et l'effet d'augmentation de l'émission ionique secondaire n'est pas linéaire par rapport aux nombres d'atomes constituant l'agrégat-projectile (Benguerba, 1991). Ainsi, une plus grande partie de l'énergie peut-être déposée dans les premières couches de l'échantillon solide, juste en dessous de la surface. Ceci se révèle particulièrement intéressant sachant que 90% de l'émission d'ions secondaires provient des dix premiers nanomètres sous la surface (Bolbach, 1992). L'analyse est ainsi réalisée sur une profondeur de 5 à 10 nm et l'échantillon est endommagé sur une profondeur maximale allant de 10 à 50 nm.

Comme la source émet des ions divers (Bi^+ , Bi_2^+ , Bi_3^+ , Bi_3^{2+} , ..., Bi_7^+), on opère une sélection en masse après extraction des ions primaires. On sélectionne alors un ion offrant une résolution latérale suffisante et une bonne désorption des molécules organiques en particulier des lipides (dans notre cas Bi_3^+).

Deux types d'analyse sont possibles en SIMS selon l'intensité du faisceau :

- le régime « dynamique » : une fluence⁶ élevée d'ions primaires (supérieure à 10^{16} ions.cm⁻²) provoque une abrasion importante de l'échantillon (plus de 10 μm par heure). Il permet d'accéder aux profils de concentrations des espèces en fonction de la profondeur d'investigation dans le substrat ;

⁵ Auparavant, les logiciels IonSpec, pour les spectres et IonImage (ION-TOF GmbH, Münster, Allemagne), pour les images, étaient utilisés. Les données acquises avec ces logiciels ont pu être converties pour être lues et retraitées, si nécessaire, à l'aide du logiciel Surface Lab 6.1.

⁶ La fluence correspond au nombre d'ions primaires bombardant l'échantillon par unité de surface (voir paragraphe 2.3.3).

- le régime « statique » : la fluence est faible (inférieure à 10^{13} ions.cm⁻²) et la pulvérisation réduite (0,1 nm par heure). La couche superficielle n'est que partiellement endommagée. Chaque impact peut être considéré comme indépendant et isolé et la fragmentation est faible.

Je n'ai employé que le régime statique, car je me suis intéressée à l'étude de la proche surface. De plus, on endommage au minimum l'échantillon qui reste ainsi disponible pour d'autres analyses complémentaires (en FT-IR ou en MALDI par exemple).

Enfin, l'utilisation de ce mode dans le cas de la matière organique permet de limiter le phénomène de fragmentation qui, dans de trop grandes proportions, pourrait rendre l'identification difficile.

2.3.2.2 Balayage de la surface de l'échantillon et focalisation

La zone étudiée à la surface de l'échantillon (de quelques cm² au maximum et découpée en pixels) est ajustée optiquement, grâce à des diaphragmes amovibles et des lentilles électrostatiques. Le faisceau d'ions focalisé irradie un pixel donné et on enregistre le spectre avec ses coordonnées spatiales. Puis, le faisceau est déplacé vers un autre pixel par un déflecteur électrostatique. Dans le cas des échantillons de plus grande taille, celui-ci peut être lui-même déplacé devant le faisceau d'ions (on parlera de mode « stage scan »).

On choisit, en fonction de l'objectif recherché, entre deux modes de focalisation :

- un mode de basse résolution (spatiale), où le faisceau d'ions est focalisé à 2 µm. On obtient alors une bonne résolution en masse (de l'ordre de 3500 à 5000 pour des ions de rapport m/z 500, dans le cas de l'analyse d'une coupe de tissu),

- un mode de haute résolution (spatiale), où le faisceau d'ions peut être focalisé à 400 nm. On obtient alors une excellente résolution spatiale mais la résolution en masse est détériorée. En effet, il est nécessaire d'allonger la durée de l'impulsion (jusqu'à 30 ns) pour avoir une intensité de faisceau suffisante dans ce cas, ce qui détériore $\frac{m}{\Delta m}$, qui est alors de l'ordre de l'unité (Figure 2-6).

Afin d'augmenter la résolution en masse dans ce dernier mode, l'extraction retardée des ions secondaires a été utilisée dans certains cas. Ceci augmente la résolution en masse mais réduit aussi la transmission des ions dans l'analyseur ce qui fait décroître l'intensité du signal détecté. J'ai cherché, pour chaque expérience et dans chaque mode d'ionisation, à optimiser le retard afin d'obtenir à la fois un signal suffisant (de l'ordre de 25 000 coups par seconde au moins) et une bonne résolution en masse pour l'exploitation des données (au moins 1000 à m/z 120).

2.3.2.3 Extracteur

Il s'agit d'un élément qui permet, par application d'une différence de potentiel élevée (typiquement 2kV) entre l'échantillon et l'analyseur, de capter les ions secondaires émis par la surface afin de les focaliser dans le temps de vol.

En fonction de la polarité de la tension appliquée, on extrait, parmi les ions secondaires émis, les anions (on parle de mode d'ionisation négatif) ou les cations (mode d'ionisation positif).

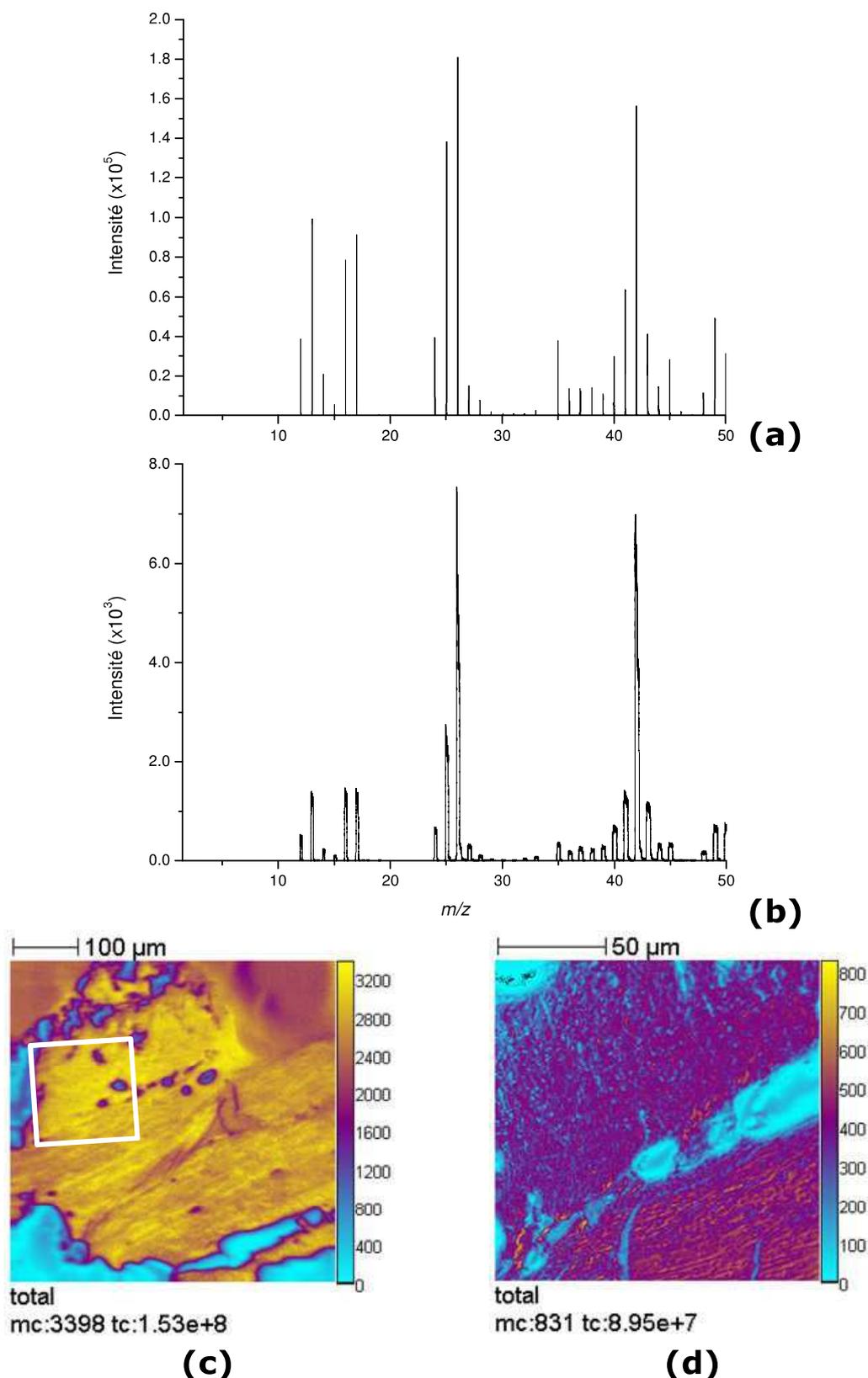


Figure 2-6 : Comparaison des modes haute et basse résolution spatiale. (a-b) Spectres de masse en basse (a) et haute (b) résolution spatiale (peau de momie du Pérou, mode d'ionisation négatif). (c-d) Courants ioniques totaux en basse (c) et haute (d) résolution spatiale (même échantillon en mode d'ionisation négatif). Le carré blanc correspond à la zone bombardée en haute résolution spatiale.

2.3.2.4 Analyseur par temps de vol

L'analyseur par temps de vol (*Time of Flight* en anglais, abrégé TOF) est un tube vide de champ où les ions captés sont libres de se mouvoir.

Il permet une transmission efficace des ions secondaires jusqu'au détecteur. Les ions secondaires émis sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge. Ceux-ci traversent librement une région sans champ de longueur L après avoir acquis une énergie cinétique E_c à la sortie de l'extracteur placé au potentiel V .

La conservation de l'énergie cinétique s'écrit :

$$E_c = zV = \frac{1}{2}mv^2$$

où v est la vitesse de l'ion secondaire dans l'analyseur (on néglige la vitesse thermique initiale des ions, de l'ordre de $k_B T$) soit :

$$v = \frac{L}{t}$$

où t est le temps de vol défini comme le temps entre la sortie de l'extracteur et l'arrivée sur le détecteur. D'où un temps de vol de :

$$t = L \sqrt{\frac{m/z}{2eV}} \quad (1)$$

Ainsi, le temps de parcours des ions est proportionnel à $(m/z)^{1/2}$: la mesure du temps t pour chaque ion secondaire détecté peut-être relié à son rapport m/z .

En pratique, le début de l'impulsion d'ions primaires est pris comme origine des temps et la dépendance est linéaire. On détermine la constante par un étalonnage interne (voir 2.3.4.3).

Les temps d'impact sur le détecteur sont ensuite attribués aux différentes masses : puisque les ions sont accélérés avec la même énergie avant de pénétrer dans l'analyseur, les masses les plus élevées correspondent aux temps de vol, dans le tube, les plus longs car leur vitesse (à énergie fixée) est plus faible. Notons que le temps mis par l'ion secondaire émis pour atteindre la grille d'extraction s'ajoute au temps de vol de l'ion jusqu'au détecteur. On montre, à l'aide de la deuxième loi de Newton, que l'expression de ce temps est similaire à celle du temps de vol t .

Comme peu d'ions secondaires sont émis, il est nécessaire d'avoir un analyseur de bonne transmission et une détection suffisamment sensible. L'analyseur TOF remplit mieux ces critères que les secteurs magnétiques ou les quadripôles.

On peut déduire de l'équation (1), l'expression théorique de la résolution en masse :

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

En pratique, le calcul de Δt ne devrait pas prendre en compte uniquement la résolution en temps de l'analyseur mais aussi la longueur de l'impulsion d'ions primaires et l'incertitude électronique (temps de montée de certains composants électroniques par exemple).

On peut également relier le temps de vol à la fréquence maximale nécessaire pour les impulsions d'ions primaires. Le paramètre de réglage est en réalité la durée totale τ d'un cycle émission d'un ion primaire-ionisation-temps d'accélération-temps de vol-détection des ions secondaires jusqu'à un certain rapport m/z – émission d'une deuxième impulsion (cycle time en anglais). Pour une tension d'accélération $V=2$ kV, un rapport $m/z=1500$ Da (soit environ $2,5 \cdot 10^{-24}$ kg) et un tube de vol de longueur $L=2$ m, on obtient un temps de vol de l'ordre de $125 \mu s$. Si l'on néglige la distance d'accélération des ions secondaires jusqu'à la grille d'extraction devant la longueur L du tube de vol et la durée d'une impulsion d'ion primaire devant le temps de vol t , on en déduit la fréquence maximale des impulsions d'ions primaires pour détecter des ions jusqu'à $m/z=1500$ Da :

$$f = \frac{1}{\tau} \approx \frac{1}{t} = 8 \text{ kHz}$$

2.3.2.5 Miroir électrostatique (ou reflectron)

Au sommet du tube de vol se trouve un miroir électrostatique en réflexion, qui en renvoyant les ions vers le détecteur, augmente la résolution en masse $\frac{m}{\Delta m}$ de l'analyseur, malgré une large distribution initiale en énergie cinétique et une large distribution angulaire des ions secondaires.

En effet, il faut refocaliser le faisceau d'ions pour que les éléments de même rapport m/z arrivent bien en même temps sur le détecteur. Le miroir électrostatique ou *reflectron* est constitué d'une série d'électrodes portées à des potentiels croissants et formant un champ électrique uniforme qui va repousser les ions. L'ion pénétrera d'autant plus profondément dans le *reflectron* que son énergie cinétique sera grande : les fragments plus rapides iront plus loin dans cette chambre et ce ralentissement temporaire rétablira l'égalité des temps de parcours.

2.3.2.6 Système de détection

Afin d'être détecté efficacement, les ions secondaires doivent être accélérés à la sortie du temps de vol. C'est pourquoi, une tension de l'ordre de quelques kV est appliquée juste avant le détecteur. Cette tension doit être d'autant plus importante pour les ions de rapport m/z importants (Gilmore, 2000b).

La détection d'ions secondaires est réalisée par des matrices multiplicatrices d'électrons. La réception d'un ion secondaire sur des galettes de microcanaux (en anglais MCP pour *microchannel plate*) génère une cascade d'électrons, qui sont ensuite accélérés par un champ électrique grâce à une différence de potentiel appliquée aux plaques (même principe qu'un photomultiplicateur).

Les canaux sont inclinés pour s'assurer que les ions toucheront les parois des microcanaux. Ainsi on transforme le signal ionique en signal électrique.

On déclenche les impulsions du détecteur à l'aide d'un convertisseur à fraction constante puis un convertisseur temps/numérique transforme le signal électrique reçu en signal numérique envoyé vers un ordinateur. Celui-ci permet de contrôler l'ensemble du dispositif, de visualiser les spectres et d'enregistrer l'ensemble des données en vue d'une analyse ultérieure.

A la fin du processus, on reconstruit, pixel par pixel, une image ionique correspondant à la surface totale analysée.

Remarque : L'ajustement des paramètres doit être fait avec soin (et en étant conscient qu'ils conditionnent le résultat des analyses de façon importante). Les paramètres de focalisation, le courant d'ions primaires et la durée de l'impulsion en particulier sont interdépendants. Il faudra préférer une courte durée de impulsion pour obtenir une bonne résolution en masse au dépend de la résolution spatiale liée à la focalisation, tandis que pour obtenir une bonne résolution spatiale, on focalise davantage le faisceau d'ions primaires mais la durée des impulsions est plus longue donc la distribution en énergie cinétique des ions secondaires dans le TOF plus large et la résolution en masse moins importante. C'est pourquoi je préciserai pour chaque expérience les choix qui ont été faits.

2.3.2.7 Canon à électrons

Pour éviter l'accumulation de charges électriques, l'analyse se fait en balayant la surface aléatoirement.

Mais pour les surfaces isolantes, on neutralise en plus les charges accumulées par un flux d'électrons de faible énergie ou canon à électrons pulsé (Lehuede, 1984). Il s'agit en fait d'un canon à électrons, pulsé entre les paquets d'ions. En effet, sur les surfaces irradiées non conductrices (les matériaux organiques en général), l'arrivée d'ions primaires et l'extraction vont rapidement charger la surface et perturber voir annihiler l'émission d'ions secondaires (Cazaux, 1992).

Un régime pulsé d'ions primaires permet dans ce cas d'opérer la neutralisation après chaque bombardement : on alterne tirs d'électrons et tirs d'ions. L'énergie de ces électrons est faible (de l'ordre de 10 eV) et la dose réduite, ce qui permet de rendre les dommages occasionnés faibles et négligeables tant que le temps d'acquisition est court (Gilmore, 2002).

2.3.2.8 Système de mise sous vide

Comme dans le cas du microscope électronique à balayage, afin de limiter les collisions (ici entre ions secondaires) qui pourraient perturber la détection, le système est placé sous un vide poussé (10^{-7} hPa). Cette valeur de pression correspond à un libre parcours moyen des ions de plusieurs centaines de mètres. Cette distance étant très supérieure à la longueur de l'analyseur, les collisions entre ions sont bien négligeables.

De plus, il faut diminuer la pression pour une seconde raison : la source mettant en jeu des hautes tensions, il faut éviter les décharges.

2.3.3 Caractéristique de l'analyse et préparation des échantillons

2.3.3.1 Sensibilité

Quelques centaines d'atomes suffisent pour détecter la présence d'un élément, si celui-ci est présent à l'extrême surface. Pour information, la limite de détection du cholestérol en TOF-SIMS a été "évaluée", dans le cadre de l'expérience sur la maladie d'Alzheimer, à la picomole (environ 6.10^{11} molécules)⁷.

Une analyse moléculaire est possible en TOF-SIMS, car les spectres de masse obtenus présentent des ions liés à des fragments caractéristiques et sensibles à la structure des molécules, tant pour les phases organiques que pour les phases inorganiques. Les facteurs de sensibilité varient cependant d'un facteur 10^4 selon l'élément étudié et des variations plus faibles sont observées selon la nature du substrat, les effets de matrice, les phases ... De plus, il faut aussi être conscient que le rendement d'ionisation varie fortement selon un grand nombre de paramètres de réglage et selon l'échantillon.

Le nombre d'ions détectés à un rapport m/z donné en fonction du temps dépend de la densité de doses d'ions primaires (*PIDD* pour *Primary Ion Dose Density*) ou fluence et de l'aire endommagée par le bombardement d'un ion primaire. Le PIDD est défini par :

$$PIDD = \frac{i T}{q A}$$

où i est le courant d'ions primaires ; T le temps d'analyse ; q la charge de l'ion primaire choisi et A l'aire bombardée. Il s'exprime en ions/cm².

⁷ Alain Brunelle, Charles Duyckaerts, communication privée

Plusieurs contraintes liées à la fois à la technique, à l'appareillage et à la nature des échantillons sont à prendre en compte lors de la préparation et de la manipulation des échantillons. Pour le protocole, deux contraintes s'imposent :

- Il faut avoir une surface de bombardement plane : comme l'appareil utilisé a une faible profondeur de champ et que la production d'ions secondaires est liée aux réactions chimiques du faisceau d'ions primaires avec les couches atomiques superficielles, l'état de surface est essentiel. On maintient une distance constante entre la tête de mesure et l'échantillon pour s'affranchir des irrégularités de surface (topographie) et la préparation de l'échantillon doit être soignée. Le recours à l'ultramicrotomie, comme l'a montré Vincent Mazel dans sa thèse (Mazel, 2006b), est souvent indispensable et le polissage (Keune, 2004b) ou la microtomie (Saito, 2008) ne peuvent suffire. Cette technique de préparation des échantillons sera décrite au 2.4.2.4.1.

- En outre, comme nous étudions la proche surface, toute pollution doit être évitée.

2.3.3.2 Pollution

On détecte souvent dans les spectres TOF-SIMS des traces de pollution dues à l'utilisation de récipients en polymère (polydiméthylsiloxanes ou PDMS). Cette technique y est particulièrement sensible (Mazel, 2006b ; 2009). Les ions caractéristiques correspondants (Delcorte, 2004), dont la colocalisation permet l'identification formelle de la pollution, sont indiqués dans l'annexe 2. Un exemple de pollution au PDMS est présenté Figure 2-7a.

Un autre type de pollution peut apparaître dans les spectres TOF-SIMS : les alkylesbenzènesulfonates linéaires (ou LABS). Il s'agit de tensio-actifs dont la présence est difficile à expliquer dans notre cas. Les fragments (Nishikawa, 2003 ; Mazel, 2006b), dont la colocalisation permet la détection de ce type de pollution, sont répertoriés dans l'annexe 2. Un exemple de pollution LABS est donné Figure 2-7 b.

Afin de limiter ces pollutions, des précautions sont prises pour toute manipulation des échantillons préparés (utilisation de pinces très propres, protection des échantillons dans des contenants exempts de polymères,...).

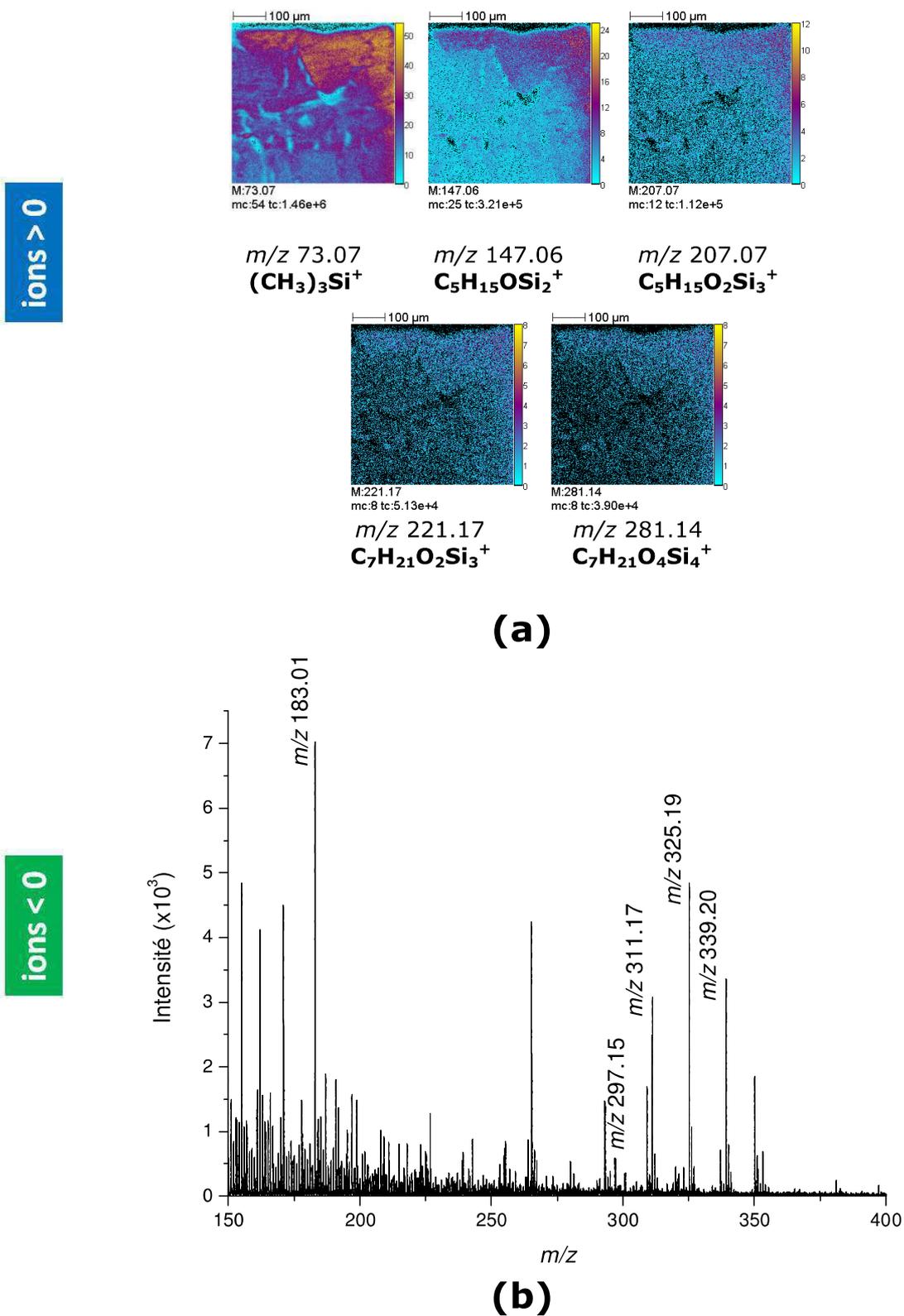


Figure 2-7 : Pollutions en TOF-SIMS. (a) Images ioniques correspondant à une pollution liée à la présence de PDMS. Mode d'ionisation positif. (Coupe d'os moderne). (b) Exemple de spectre TOF-SIMS où l'on détecte une pollution de type LABS (os ancien). Mode d'ionisation négatif.

2.3.3.3 Endommagement

Il a été démontré que le PIDD maximal admissible pour ne pas endommager la surface était de 10^{13} ions/cm², dans le cas de projectiles monoatomiques (Vickerman, 2001). Notons que, dans le cas des agrégats, l'endommagement étant plus important, il est nécessaire de choisir une dose plus faible (Touboul, 2005). J'ai respecté ce critère dans l'ensemble des analyses. En basse résolution spatiale, la dose envoyée sur l'échantillon était toujours de l'ordre de $3 \cdot 10^{11}$ ions/cm², en haute résolution spatiale de l'ordre de 10^{12} ions/cm².

2.3.3.4 Durée de l'analyse

La durée T de l'analyse, pour chacun des deux modes d'ionisation, peut être calculée à partir du nombre N de balayages effectués, du nombre p de pixels demandés par côté et de la durée entre deux impulsions d'ions primaires (ou cycle time) conditionnant la gamme de masse accessible. En effet, un spectre de masse est acquis pour chacun des p pixels, N fois et la durée d'acquisition d'un spectre correspond au cycle time τ :

$$T = N\tau p^2$$

Ainsi, pour une image carrée de 256x256 pixels, un nombre de balayage (ou scans) de N=40 et un cycle time de 120 μ s, le temps d'acquisition théorique est de 5 minutes environ. A celui-ci s'ajoutent les temps morts liés à l'électronique du système d'acquisition et, dans le cas du mode « stage scan », le temps nécessaire au déplacement de l'échantillon.

2.3.4 Analyse des données

2.3.4.1 Nature des données obtenues

L'analyse de la surface aboutit à la constitution d'un fichier informatique contenant trois types d'informations pour chaque pixel de la zone d'étude : deux correspondent aux coordonnées spatiales de bombardement de l'échantillon (x, y), la distance source d'ions primaires/échantillon étant fixée au départ (z) pour optimiser la mesure (en particulier avec le *reflectron*), et une troisième information concerne le spectre de masse lui-même. On peut alors réaliser une carte de densité ionique pour chaque pic du spectre.

2.3.4.2 Spectres et images

On représente le spectre de masse correspondant à l'échantillon sous la forme d'un graphique comportant en abscisse le rapport masse sur charge m/z de l'ion où la masse est exprimé en Dalton, la charge en unité de charge élémentaire e ($e=1,6 \cdot 10^{-19}$ C et $q = z \cdot e$), le rapport global s'exprimant en Thomson (Th) - unité souvent omise - et en ordonnée une « intensité ionique », qui correspond au nombre de fois où l'ion a été détecté au cours de l'expérience (nombre de coups).

Les images, réalisées à partir des spectres acquis, constituent une représentation en 2 dimensions des données. En effet, elles représentent en échelle de teinte

l'intensité ionique d'un élément en chaque pixel de la surface bombardée (Figure 2-8). Il s'agit d'une reconstruction des données, celles-ci étant acquises par balayage aléatoire. L'échelle de teinte choisie pour nos cartographies ioniques est présentée à droite de chaque image : le jaune correspond aux zones d'intensités les plus élevées, tandis que le bleu ciel correspond aux plus faibles. De plus, sur chaque image sont précisées l'échelle, la taille de la zone bombardée, la valeur du rapport m/z correspondant à l'ion dont on réalise la cartographie ainsi que la valeur des deux paramètres « mc » (nombre maximal de coups par pixel) et « tc » (nombre total de coups dans l'image).

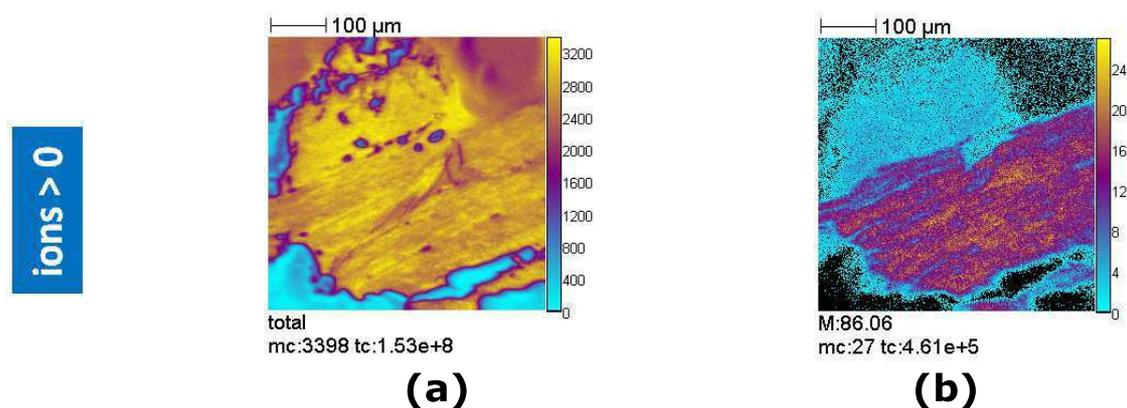


Figure 2-8 : Exemple d'images ioniques (en mode d'ionisation positif) : (a) Image ionique totale et (b) image ionique correspondant uniquement à l'ion-fragment $C_4H_8NO^+$ (m/z 86.06).

2.3.4.3 Exploitation des données

2.3.4.3.1 Étalonage en masse

La distribution en énergie cinétique des ions secondaires restant faible, on peut considérer la relation (1) comme vérifiée sur toute la gamme de masse étudiée. Cela permet d'effectuer un étalonage interne en ne considérant que des ions fragments légers, toujours présents dans les spectres.

Ce sont :

- H^+ (m/z 1.01), H_2^+ (m/z 2.02), H_3^+ (m/z 3.02), C^+ (m/z 12.00), CH^+ (m/z 13.01), CH_2^+ (m/z 14.02), CH_3^+ (m/z 15.02) et $C_2H_5^+$ (m/z 29.04) en mode d'ionisation positif ;
- H^- (m/z 1.01), C^- (m/z 12.00), CH^- (m/z 13.01), CH_2^- (m/z 14.02), C_2^- (m/z 24.00), C_3^- (m/z 36.00), C_4^- (m/z 48.00) en mode négatif.

On peut vérifier la qualité de l'étalonage par la comparaison des distributions isotopiques avec la théorie, la parité de la valeur de m/z indiquant le nombre d'atomes d'azote (règle de l'azote) et l'analyse des différences de masse entre groupes de pics.

En mode de haute résolution spatiale, l'étalonnage peut s'avérer plus délicat, en raison de la mauvaise résolution des pics de basse masse. Néanmoins trois pics suffisent.

2.3.4.3.2 Lecture des spectres

Les informations recueillies dans les spectres de masse correspondent souvent à des fragments des molécules présentes dans l'échantillon et du fait de la grande diversité des molécules présentes dans les matériaux du patrimoine, les spectres peuvent s'avérer très complexes, en particulier pour les faibles rapports m/z .

En mode positif, on détectera toujours les ions électropositifs dominants Na^+ à m/z 22,99 et K^+ à m/z 39,96 (et parfois Li^+) qui recouvrent souvent les échantillons et migrent facilement. De plus, le TOF-SIMS est particulièrement sensible pour ces deux ions. En mode négatif, on trouvera souvent F^- , Cl^- et O^- .

Pour les matériaux organiques, l'identification se fait grâce à la fragmentation spécifique et dans certains cas à des ions moléculaires.

On observera en mode positif, les ions non fragmentés correspondant à la molécule protonée $[\text{M}+\text{H}]^+$ et souvent les adduits des ions sodium et potassium $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et $[\text{M}+\text{K}]^+$. Les ions fragmentés peuvent notamment correspondre à des ruptures de liaisons simples ou successives ou à la perte d'une molécule d'eau $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$. En mode négatif, les espèces sont généralement sous forme déprotonées $[\text{M}-\text{H}]^-$. Notons que des fragments classiques connus par d'autres méthodes d'ionisation apparaissent aux faibles rapports m/z et aident à l'identification.

Je détaillerai, au paragraphe 2.5, les ions secondaires identifiables dans les spectres des protéines.

2.3.4.3.3 Etude d'une zone d'intérêt

Les spectres étant souvent complexes (pics nombreux aux faibles rapports m/z), du fait de la fragmentation élevée en TOF-SIMS, l'interprétation des données est souvent délicate. L'imagerie permet de visualiser la localisation des différents fragments d'un composé, leur colocalisation indiquant la présence effective du composé.

Dans l'échantillon, la présence d'un mélange accroît la difficulté et le recours à l'image devient essentiel. Ainsi, la séparation au sein du mélange ne sera plus physique, mais virtuelle et spatiale. On identifie une zone intéressante (intensité importante jaune ou au contraire très faible bleu) sur une image ionique (répartition spatiale d'un ion) et on recalcule le spectre de cette zone d'intérêt (*ROI* ou *Region Of Interest* en anglais) afin d'identifier précisément les ions qu'elle contient. On répète ce va-et-vient entre spectre et image un nombre suffisant de fois pour l'identification avec une bonne précision et la localisation avec un bon contraste des constituants. La puissance de la technique apparaît ici : le SIMS constitue un véritable microscope chimique à l'échelle du micron !

2.3.4.3.4 Colocalisation / anti-localisation

Un aspect intéressant de cette méthode est qu'elle permet une étude spatiale précise. En effet, une fois les ions identifiés, il est possible de sommer les images correspondant à des ions moléculaires et fragmentés issus de la même espèce ce qui augmente le contraste et permet de localiser précisément les espèces. On peut ainsi circonscrire la zone où est présente une espèce.

L'étape ultime est la superposition sur une même carte, des images correspondant aux différentes espèces. Cela permet de mettre en évidence une même localisation de certaines espèces (on parlera de colocalisation) ou au contraire des localisations complémentaires (antilocalisation) et l'on peut ainsi envisager des processus d'interaction entre composés.

Un exemple est présenté Figure 2-9 : il s'agit d'un crin de cheval blanc teinté à l'aide d'une coloration à l'ancienne, à base de plomb. Les crins ont été préparés en 2009 par Marie Radepont. Cette étude sera développée dans le deuxième chapitre (paragraphe 1.3.1).

Cet outil s'avère très puissant bien que très chronophage en termes d'exploitation et d'interprétation des données

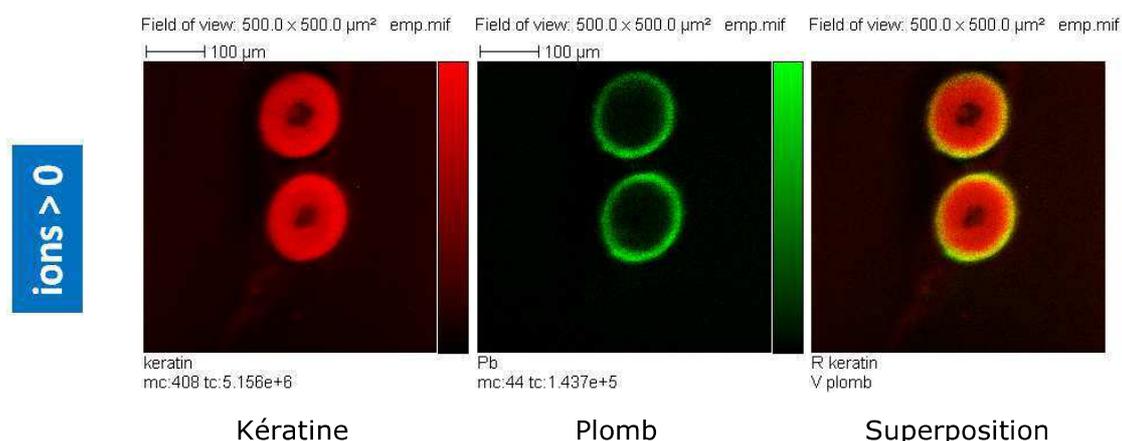


Figure 2-9 : Image ionique résultant de l'addition des fragments de la kératine et du plomb. Puis superposition de ces images : en rouge la kératine et en vert le plomb. La couleur jaune (vert + rouge) indique une colocalisation de la kératine (rouge) et du plomb (vert), au niveau de la partie périphérique du crin de cheval.

2.3.5 Avantages et inconvénients pour l'étude des matériaux du patrimoine

2.3.5.1 Avantages

Tous les composés d'éléments existants de rapport m/z entre 1 et 1500 environ peuvent être détectés s'ils sont ionisables. De plus, la résolution en masse obtenue permet d'accéder à la distribution isotopique ce qui conforte les identifications.

En dehors de l'étude des tissus biologiques, le TOF-SIMS possède de larges domaines d'application dans le domaine du patrimoine : produits polymères utilisés en conservation/restauration (Torrissi, 2008), œuvres d'art parmi lesquelles des

peintures dont on étudie les liants (Keune, 2004a), les pigments (Boon, 2001 ; Van Ham, 2005 et Richardin, 2011 a), l'interaction liant/pigment (Keune, 2005 ; 2007), la présence d'amidon dans la couche de préparation du tableau (Sanyova, 2011), mais aussi des patines de statuettes africains Dogons (Mazel, 2006a) et à cette occasion des fluides biologiques sur objets d'intérêt ethnologique (Mazel, 2010) tels que l'urine, des colorants comme l'indigo ou la garance, même si certains sont difficiles à désorber comme par exemple la purpurine (Sanyova, 2001) avec leurs agents fixateurs (mordants) y compris directement sur le textile (Lee, 2008). Cette technique a aussi été employée pour différencier le duramen de l'aubier du bois pour aider l'étude en dendrochronologie (Saito, 2008). On peut également citer une étude des dents (Dowsett, 2004) et une étude de la patine de corrosion de bronzes (Constantinides, 2001).

Sa grande sensibilité et la profondeur d'endommagement limité lors de l'analyse permet en outre d'analyser de fines couches de matière, contrairement au MEB. La résolution spatiale latérale offerte en imagerie moléculaire, pouvant atteindre 300 nm, est particulièrement intéressante.

La bonne résolution en masse permet de différencier les composés avec peu d'ambiguïté et les analyses isotopiques sont possibles.

2.3.5.2 Inconvénients

L'inconvénient majeur est la nécessité de disposer d'un prélèvement. Mais cet inconvénient est contrebalancé par le fait que l'échantillon peut être analysé à l'aide d'autres techniques complémentaires après l'étude en TOF-SIMS.

D'autres difficultés demeurent à ce jour :

- La complexité des spectres qui parfois l'interprétation des spectres délicate.
- L'impossibilité d'accéder à une quantification absolue des composés chimiques en mélange. Les quantifications relatives sont cependant possibles, dans le cas de composés désorbés et détectés avec la même efficacité, et fiables car la détection des ions secondaires se fait par comptage (Touboul, 2011).
- le coût relativement élevé des analyses (de l'ordre d'1k€/jour), par rapport à une analyse MEB-EDX par exemple (0.2 à 0.4 k€/jour).

2.4 Choix des échantillons et leur préparation

L'idée principale est de choisir des échantillons de petite taille, représentatifs du tissu ou de l'objet étudié, et de les préparer à l'aide d'une procédure simple, rapide et modifiant peu l'échantillon dans son état natif. A l'issue de celle-ci, l'échantillon doit répondre aux exigences des différentes techniques d'analyse utilisées (lames fines ou ultrafines, planéité des surfaces analysées, absence de pollutions...).

2.4.1 Prélèvements et observations macroscopiques

Pour la plupart des échantillons anciens (cheveux de momie, corne, plume, cuir, peau de momies provenant du site d'Antinoë), un premier prélèvement, directement sur le tissu a été effectué dans un but de datation, directement dans le lieu de dépôt. Ces prélèvements ont été réalisés par Pascale Richardin et Nathalie Gandolfo. Pour chacun d'entre eux, le rapport de datation réalisé par leur soin présente une photo de la zone où le prélèvement a été effectué.

Pour les échantillons modernes, les dimensions des prélèvements excédaient rarement quelques centimètres et de petits échantillons ont été soigneusement découpés.

Pour éviter toute pollution extérieure, en particulier due à la manipulation, et dommageable pour les études en TOF-SIMS (voir paragraphe 2.3), ces échantillons ont été manipulés avec des gants et découpés, dans des boîtes de Pétri soigneusement lavées, à l'aide d'un scalpel à lame jetable. Cette procédure, qui a été appliquée également pendant les phases de préparation des échantillons et de manipulation de ceux-ci ou des coupes obtenues, se justifie également par la nature de notre étude. En effet, la kératine est considérée, en spectrométrie de masse et en particulier en protéomique (étude des protéines liées à l'activité cellulaire), comme un contaminant (Podtelejnikov, 2002). La présence de kératine, issue des cheveux ou de la peau des mains, peut masquer des signaux correspondants à d'autres protéines, présentes dans le tissu ou la solution étudiée, en moindre abondance (Xu, 2011).

Deux règles importantes ont été respectées pour effectuer les prélèvements :

- limiter la taille de l'échantillon afin de rendre d'autres analyses possibles,
- choisir une zone intéressante et représentative de l'échantillon.

Les échantillons à analyser, de quelques millimètres d'épaisseur, sont découpés et observés soigneusement sous loupe binoculaire, afin de repérer la stratigraphie à analyser.

Certains matériaux particulièrement durs (corne, écaille) ont nécessité l'emploi d'une scie à ruban et/ou d'une fraiseuse dentaire. L'analyse est ensuite menée le plus loin possible des zones coupées susceptibles d'avoir chauffé. Sauf mention contraire, aucun nettoyage préalable des échantillons n'a été effectué. Ainsi l'ensemble des dépôts de surface sont conservés et la matière organique ne risque pas d'être altérée par l'utilisation d'un solvant. Cela permet également de ne pas introduire de signaux chimiques supplémentaires dans les analyses. L'échantillon est ainsi analysé dans un état « natif ».

Échantillon	Origine	Analyse	Préparation de l'échantillon	
			Agent enrobant	Technique de coupe
Os moderne	Humain, Ouzbékistan	Chap.1.- § 2.5.2.3	Aucun	Ultramicrotomie
Os ancien	De porc, "Mary Rose ship"	Chap.1.- §2.5.2.4		
Cheveux modernes	C2RMF	Chap. 2.- § 1.2.3	Résine polyester (Sody 33)	Ultramicrotomie
Cheveux anciens	Momie Tarapacá (Andes)	Chap. 2.- § 1.2.4		
Crins modernes	cheval	Chap. 2.- § 1.3.1		
Laine moderne	mouton	Chap. 2.- § 1.3.2		
Soie moderne	ver à soie Bombyx Mori	Chap. 2.- § 1.3.2		
Corne moderne	bœuf	Chap. 2.- § 2.2.1		
Cornes anciennes	Auroch (corne à boire, musée Vert du Mans)	Chap. 2.- § 2.2.2		
	Rhinocéros laineux (Institut de Paléontologie Humaine)	Chap. 2.- § 2.3.4		
Peau moderne	Cochon (INRA Nouzilly)	Chap. 3.- § 1.1.4	O.C.T	Cryomicrotomie
	Chinoise (Djoumboulak Kum, Chine)	Chap. 3.- § 2.3.1		
Peaux de momies	Égyptienne (musée d'Athènes)	Chap. 3.- § 2.3.2.1	Résine acrylique (LR-White Medium)	Ultramicrotomie
	Egyptiennes (Antinoë, dépôts musée du Louvre)	Chap. 3.- § 2.3.2.2		
	Chinchorro (Chili)	Chap. 3.- § 2.3.4		
	Tarapacá (Andes)	Chap. 3.- § 2.3.3	Résine polyester (Sody 33)	

Tableau 2-1 : Échantillons étudiés et leur mode de préparation

2.4.2 Inclusions et techniques de coupe : critères de choix

La plupart des matériaux étudiés sont durs et fragiles. Ceci rend difficile leur manipulation et est incompatible avec la réalisation de lames minces en microtomie.

2.4.2.1 Principes généraux : critères de choix

Souvent utilisée pour stabiliser des tissus frais (après les avoir éventuellement fixés), l'étape d'inclusion a pour but, dans le cadre de l'étude des objets du patrimoine, de préserver l'intégrité de l'échantillon. Celle-ci est donc maintenue à l'aide d'agents enrobants. Notons que dans le cas des os, cet enrobage peut parfois être évité (Reiche, 2010).

Le **choix de l'agent enrobant** obéit à un grand nombre de critères dont l'importance dépend de la nature de l'échantillon, de l'analyse que l'on souhaite effectuer et des informations chimiques recherchées (Ayache, 2007). Dans tous les cas, l'orientation de l'échantillon doit être bien choisie, afin que la stratigraphie à étudier soit placée sous la surface du futur bloc d'inclusion.

L'inclusion se fait en général dans un agent liquide qui se solidifie sous l'effet d'un refroidissement (lent dans le cas de la paraffine ou rapide dans le cas de la colle OCT solidifiant à -20°C) ou grâce à une réaction chimique exothermique de polymérisation (la solidification de la résine peut alors prendre 24h à quelques jours). Le choix de l'agent enrobant dépend des caractéristiques de souplesse de l'échantillon et on préférera ainsi l'OCT ou une résine plus tendre pour les peaux réhydratées. Notons cependant que l'OCT présente l'inconvénient en tant que polymère organique d'interférer éventuellement avec les signaux correspondant à l'échantillon (c'est le cas en spectroscopie infrarouge et en spectrométrie de masse MALDI). De plus, il peut se déposer sur une partie de la coupe lors du retour à température ambiante puisqu'il est alors liquide. Dans tous les cas, l'agent choisi doit être suffisamment visqueux pour la mise en place de l'échantillon et son orientation (Cotte, 2004).

Dans la mesure du possible, nous avons voulu éviter les résines d'inclusion contenant des solvants agressifs pour la matière organique ainsi que celles dont la polymérisation nécessitait un chauffage. Nous étions cependant conscients que la polymérisation dite « à froid » de certaines résines est en réalité une réaction exothermique. La dissolution de certains composés de surface (acide 18-méthyleicosanoïque de la laine, vernis des coupes de peinture...) déjà constatée lors de certaines inclusions d'échantillons du patrimoine m'a également incitée à une grande vigilance : les échantillons ont été observés avant l'inclusion et j'ai été attentive aux éventuels changements de couleur de la résine lors de la mise en contact avec l'échantillon, indice éventuel de la dissolution d'une partie de l'échantillon. Enfin, un autre problème s'est parfois posé lors de l'inclusion : la réhydratation des tissus ou l'imprégnation de tissus poreux (comme l'os ancien) entraîne un important dégazage lors de l'inclusion. Si la polymérisation se produit sans que les bulles créées au sein du bloc d'inclusion n'aient été évacuées, celles-ci restent piégées et forment des trous dans les blocs et les coupes. Il est alors nécessaire de réaliser une imprégnation sous vide, de passer le moule aux ultrasons au début de la polymérisation ou d'utiliser une résine fluide à polymérisation lente.

Le Tableau 2-1 présente les différents échantillons dont l'étude est présentée dans cette thèse, leur origine, le paragraphe correspondant ainsi que la façon dont ils ont été préparés (agent enrobant et technique de coupe).

2.4.2.2 *Quatre types de matériaux*

Quatre types de matériaux sont à distinguer pour le choix de l'agent enrobant et du type de coupe :

- Les **tissus très durs et résistants** comme l'os : ils ne nécessitent pas d'inclusion,

- Les tissus durs mais friables ou très souples comme les cheveux et les **fibres** textiles : une inclusion dans une résine dure est nécessaire pour réaliser la coupe de façon aisée,

- Les **tissus mous** comme la peau moderne : la congélation puis l'enrobage dans une colle de maintien (OCT) pour la coupe à froid ont été réalisées,

- Les **tissus hétérogènes fragiles** comme la plupart des peaux de momie ou le système corne/zone de transition/os de la corne moderne de bovidé : les différences de dureté au sein de l'échantillon rendent difficile le choix de l'agent enrobant, pourtant indispensable pour maintenir l'intégrité de la stratigraphie du tissu complexe.

Pour chaque cas énoncé ci-dessus, je préciserai les techniques d'inclusion et de coupe associées ainsi que les cas d'emploi répertoriés dans la littérature pour l'étude de matériaux anciens.

2.4.2.3 *Cas particulier de l'os*

Pour l'os, aucun enrobage préalable n'est réalisé si le tissu présente un état de conservation suffisant. La dureté et la résistance du matériau rendent possible la réalisation de coupes directes, sans inclusion. Ceci permet de s'affranchir, lors des analyses, d'éventuels signaux de résine. Comme l'a montré Céline Chadefaux (Reiche, 2010) pour l'étude d'os en microspectrométrie IR en transmission sur la ligne synchrotron IRIS (Bessy II, Berlin, Allemagne), des coupes semi-fines (0.5 à 2 μm) et ultrafines (quelques dizaines de nm pour l'observation en microscopie électronique en transmission) peuvent être obtenues en ultramicrotomie. Dans un premier temps, la surface choisie est taillée en forme de pyramide tronquée (pour avoir une faible surface à couper donc de faibles contraintes mécaniques limitant ainsi les vibrations mécaniques). Puis, des coupes de 0,9 à 1 μm sont réalisées à l'aide d'un couteau diamant Diatome (inclinaison 45°, largeur de coupe 6 mm) et déposées sur différents supports (sur une plaque de silicium pour l'analyse en spectrométrie de masse TOF-SIMS, sur un plot en inox pour l'analyse en microscopie électronique à balayage, sur des lames de verre pour le contrôle immédiat de la qualité des coupes après séchage). De plus, en raison de la dureté de l'os, il est nécessaire de réduire préalablement la taille de coupe.

Les opérations d'ultramicrotomie décrites dans cette thèse, délicates, ont été effectuées par Danielle Jaillard au Centre Commun de Microscopie Électronique (UMR 8080) à Orsay puis à l'Institut des Sciences du Végétal (UPR 2355) à Gif/Yvette.

Pour les échantillons osseux mal conservés ou fragiles (os poreux et/ou cassants), il est possible d'inclure en résine PMMA (Lebon, 2011).

2.4.2.4 Deux techniques classiques d'enrobage

Lorsque l'enrobage s'avère nécessaire, deux techniques classiques peuvent être utilisées : l'inclusion dans une résine ou le maintien dans une colle visqueuse solidifiant à basse température.

2.4.2.4.1 Inclusion en résine

2.4.2.4.1.1 *Cas général*

La technique couramment employée pour l'étude des coupes de peinture convenait à la plupart des échantillons biologiques étudiés, en particulier les phanères, composés de kératine dure. Cette inclusion a aussi pu être employée pour l'étude de la peau de la momie Tarapacá (voir chapitre 3).

Décrite en détail par Vincent Mazel (Mazel, 2006a et 2009), cette méthode, spécifique mais classique pour l'analyse de la stratigraphie des objets du patrimoine, consiste à inclure un petit échantillon (moins d'1 mm dans une dimension, moins de 5 et 7 mm respectivement dans les 2 autres dimensions-voir schéma Figure 2-10) dans une résine dure (Plesters, 1956), visqueuse et transparente, à polymérisation rapide, de type polyester (Derrick, 1994). La résine polyester Sody 33 (E.S.C.I.L, Chassieu, France), utilisée au C2RMF depuis 2010⁸, est une résine à 2 composantes : la résine elle-même et le catalyseur Luperox K1 (Elf Atochem, Paris, France) contenant notamment des peroxydes de méthyléthylcétone, des phtalates de diisobutyle et du 4-hydroxy-4-méthylpentan-2-one. Hydrophobe, cette résine ne convient pas pour l'inclusion des tissus hydratés.

Après 1 semaine de polymérisation et séchage, on taille le bloc d'inclusion aux dimensions du porte-échantillon du TOF-SIMS. Les blocs de résines sont ensuite meulés et fraisés puis taillés en pyramide tronquée et des coupes de 0,5 à 1 µm sont réalisées, sur cette surface réduite, au couteau diamant (ultramicrotomie). On réalise ainsi des blocs de résines parfaitement plans et non pollués et des coupes transverses fines que l'on récupère en surface d'un film d'eau ultra pure à l'aide d'un cil ou d'un anneau.

Les pyramides taillées et coupées sont transportées dans des boîtes en laiton, régulièrement nettoyées à l'éthanol et aux ultrasons. L'analyse peut ensuite être réalisée en réflexion sur les blocs.

⁸ Auparavant, la résine polyester H59 (Sodemi, Hardclear, France), présentant des caractéristiques identiques, était utilisée.

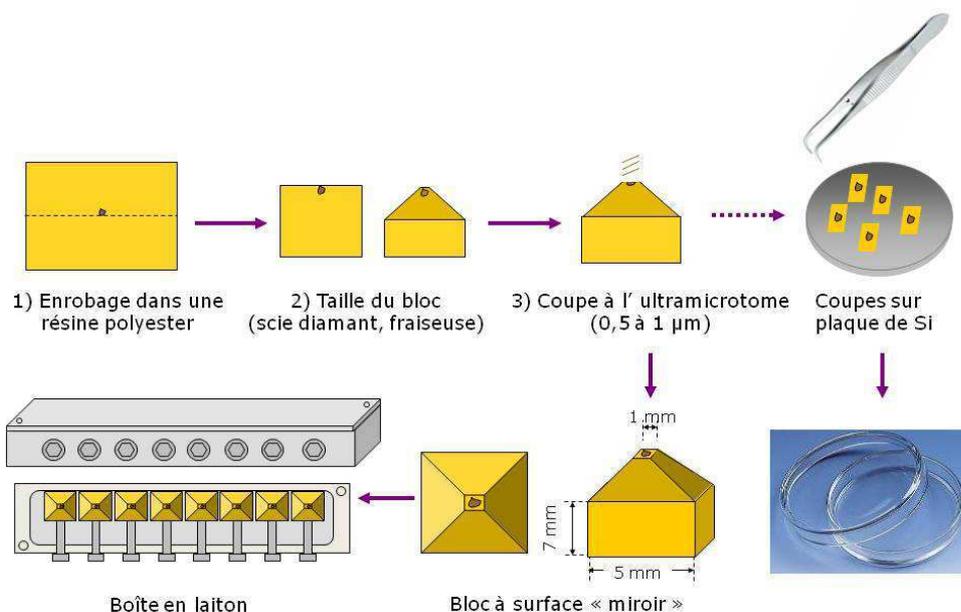


Figure 2-10 : Préparation des tissus biologiques en ultramicrotomie : inclusion en résine polyester, fraisage et meulage du bloc, coupes en ultramicrotomie à l'aide d'un couteau diamant.

Cependant, dans le cas des fibres (cheveux surtout), des problèmes de rétraction de l'échantillon sont apparus pendant et après la coupe, ne permettant pas d'obtenir des surfaces et des coupes suffisamment planes pour des analyses submicroniques. L'utilisation de protocoles tels que celui mis au point par l'Institut Textile de France (inclusion dans la résine très tendre Norsodyne S 807, à polymérisation rapide, coulée dans une gaine en Téflon et coupe au microtome à main) pour l'étude des fils de soie, préserve les fibres pour leurs observations en coupe transverse en microscopie électronique mais ne permet pas d'obtenir des coupes d'épaisseur inférieure à 15 μm (Moulherat, 2001), ce qui ne suffit pas pour obtenir de bons résultats en imagerie TOF-SIMS. La planéité de la surface exigée pour les analyses TOF-SIMS nécessite d'effectuer des coupes de 2 μm au maximum.

Une autre limitation tient à la composition de l'échantillon : la présence de matériaux très durs, comme le quartz ou les cristaux d'hydroxyapatite, est susceptible d'endommager le couteau diamant. L'usure de la lame du couteau provoque ensuite la formation de stries sur les coupes et empêche ainsi la bonne lisibilité des images obtenues en TOF-SIMS.

Deux exemples de préparation de ce type sont présentés Figure 2-11 (a et c) : le bloc surfacé pour l'analyse de la peau d'une momie péruvienne (Cersoy, 2012) et une coupe de fils de soie moderne.

2.4.2.4.1.2 Problème des tissus hétérogènes

Certains tissus présentent une structure hétérogène dont l'intégrité était maintenue par des contraintes mécaniques dans les structures anatomiques étudiées mais qui sont fragilisés par leur vieillissement et/ou l'échantillonnage et la coupe. Deux tissus rentrent dans ce cas : une corne moderne de bovidé encore accrochée sur son os interne et la plupart des peaux de momie, particulièrement desséchées.

Cette méthode de préparation est une variante où la résine d'inclusion est plus fluide et préparée selon un protocole différent.

Étude de la zone de transition os/corne sur une corne de bovidé moderne

Une corne de bœuf contenant encore son os support interne (appelé cornillon) a été étudiée (la structure anatomique d'une corne de bovidé est détaillée dans le chapitre 2 avant la présentation de l'étude). La différence de dureté entre la corne, l'os et surtout la zone de transition molle entre ces deux tissus a rendu l'inclusion et la coupe délicates. Ce problème est proche de celui rencontré par Palmquist pour l'étude de l'interface os/implant osseux (Palmquist, 2012).

Deux résines d'inclusion plus fluides que la résine polyester Sody 33, et de dureté intermédiaire, époxy, ont donc été choisies : la résine Araldite 2020 (Huntsman Advanced Materials, Everberg, Belgique) et la résine EMS-Grilonit (EMS-Chemie AG, Domat, Suisse)⁹. La première s'est révélée trop tendre par rapport à l'échantillon et pas assez transparente pour repérer l'échantillon et orienter la coupe. La seconde, transparente, a bien consolidé l'échantillon tout en évitant de créer des contraintes trop fortes susceptibles d'entraîner des plis dans les coupes. Notons, cependant, que cette résine, très fluide et de dureté moyenne, polymérise à 50°C.

Étude de peaux de momie

Le cas de la peau de momie est plus problématique. En effet, comme nous le verrons en détail dans le chapitre 3, les peaux de momie présentent des textures et des états de conservation très variables. Le plus souvent, les tissus momifiés sont durs, secs, légers et cassants. De nombreux auteurs le notent (Rabino-Massa, 1981) et expliquent que les tissus sont aussi friables comme dans le cas de la momie de Ramsès II (Durigon, 1985). Les plis sont nombreux, les couches de la peau se détachent ou adhèrent aux os sous-jacents (cas de la momie d'un indien mort de déshydratation en 1985 (Jit, 2001)). Conlogue décrit des problèmes similaires pour les momies égyptiennes embaumées (Conlogue, 2008). Ainsi, dès le prélèvement, la découpe d'un petit échantillon s'avère délicate.

L'état de sécheresse atteint nécessite parfois de réhydrater précautionneusement la peau, afin de « regonfler » les cellules (Guillot, 2005). Je traiterai cette question en détail dans le chapitre 3.

Pour notre étude, nous avons inclus des échantillons de peau de momie en résine LR-White Medium (EMS-Chemie AG, Domat, Suisse). Il s'agit d'une résine acrylique très fluide, polymérisant à froid (moins de risque de dégradation des protéines). La réaction de polymérisation doit, cependant, être activée sous UV. La très faible viscosité de la résine LR-White (de l'ordre de quelques mPa.s soit la viscosité d'un café crème) permet de consolider efficacement les tissus fragilisés en les imprégnant. Son utilisation dans le domaine du patrimoine est connue depuis les années 80 (Newman, 1987). L'imprégnation (plutôt que l'enrobage ou l'inclusion) a été

⁹ Merci à Yvan Coquinot pour ses conseils sur les résines d'inclusion.

employée avec succès lors de l'étude de la peau de la momie des glaces Ötzi (Williams, 1995). Notons que lors de cette étude, Williams a utilisé un couteau diamant pour les coupes en ultramicrotomie après avoir cassé plusieurs couteaux de verre.

Le protocole est identique à celui décrit au 2.4.2.4.1.1 mais les moules utilisés sont des gélules fermées en gélatine permettant la polymérisation anaérobie. Un fond plat est préalablement préparé afin de faciliter la mise en place des échantillons et leur orientation. Une première imprégnation est réalisée, sous vide (pour évacuer d'éventuelles bulles de dégazage) dans la résine pendant 20 minutes à température ambiante. Puis l'échantillon ainsi imprégné est placé dans la gélule à fond plat et la résine, mélangé à son catalyseur, est coulée. La polymérisation est réalisée à -20°C sous une lampe UV, pendant 24h.

Le détail d'une coupe de peau de momie égyptienne préparée selon ce protocole est présenté Figure 2-11 e.

Aucun retrait n'a été observé pour les échantillons inclus selon ce protocole et celui-ci est compatible avec l'étude de tissus hydratés (frais) ou réhydratés puisque la résine d'inclusion est hydrophile.

Remarques :

- Parmi les autres résines d'inclusions utilisées, notamment en biologie, on peut citer l'Epon. Cette résine, utilisée en microscopie électronique à transmission présente des caractéristiques similaires à celles de la résine LR-White Medium.
- Parmi les autres techniques de préparation, le choix de la technique de coupe par faisceau d'ions focalisés (Focused Ion Beam en anglais ou FIB) a été discuté. Cette technique coûteuse ne nous a pas paru adaptée pour l'étude de tissus biologiques fragiles tels que la peau, le risque étant d'endommager la matière organique du fait de l'énergie du faisceau.

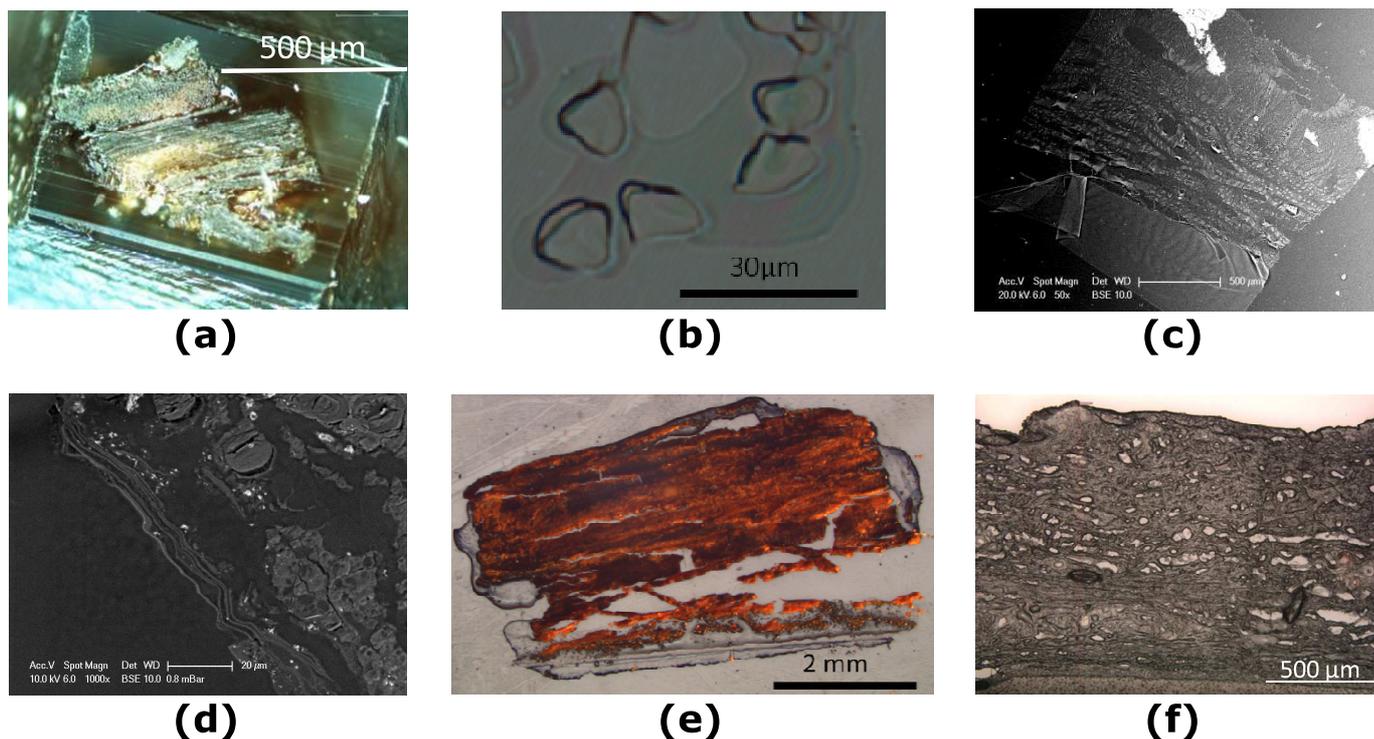


Figure 2-11 : Exemples de préparation de tissus biologiques pour l'analyse en imagerie TOF-SIMS. (a-d) Inclusion en résine et ultramicrotomie : (a) Bloc d'inclusion contenant la peau de momie Tarapacá¹⁰ et (b) coupe de fils de soie moderne, inclus dans la résine polyester Sody 33, (c) coupe de corne de bœuf moderne avec son cornillon et (d) image MEB en mode BSE de l'épiderme d'une peau de momie égyptienne dorée incluse dans la résine LR-White Medium. (e-f) Enrobage dans l'OCT et cryomicrotomie : (e) coupe de peau de momie égyptienne du site d'Antinoë et (f) coupe de peau de cochon moderne.

2.4.2.4.2 Enrobage dans la colle O.C.T.

Dans le cas de tissus mous, comme par exemple la peau moderne, la technique de cryomicrotomie peut s'appliquer. Il s'agit d'une méthode d'enrobage et de coupe simple et courante en biologie.

Cette méthode a également été mise en œuvre pour l'étude des tissus hétérogènes du bois en TOF-SIMS (Tokareva, 2007) ainsi que pour l'étude de peaux de momies en spectroscopie infrarouge (Cotte, 2005). Dans ces deux cas, les coupes réalisées étaient plus épaisses (5 µm au minimum, 10 à 20 µm en principe) que celles effectuées pour l'analyse en TOF-SIMS (0.5 à 1 µm).

Le principe de la préparation est détaillé Figure 2-12. Le tissu est congelé rapidement après prélèvement sur l'individu ou l'animal, par immersion dans un bac de glace ou de carboglace (-78°C) ou encore dans un bœcher d'isopentane refroidi par de l'azote liquide (-196°C).

¹⁰ Voir chapitre 3

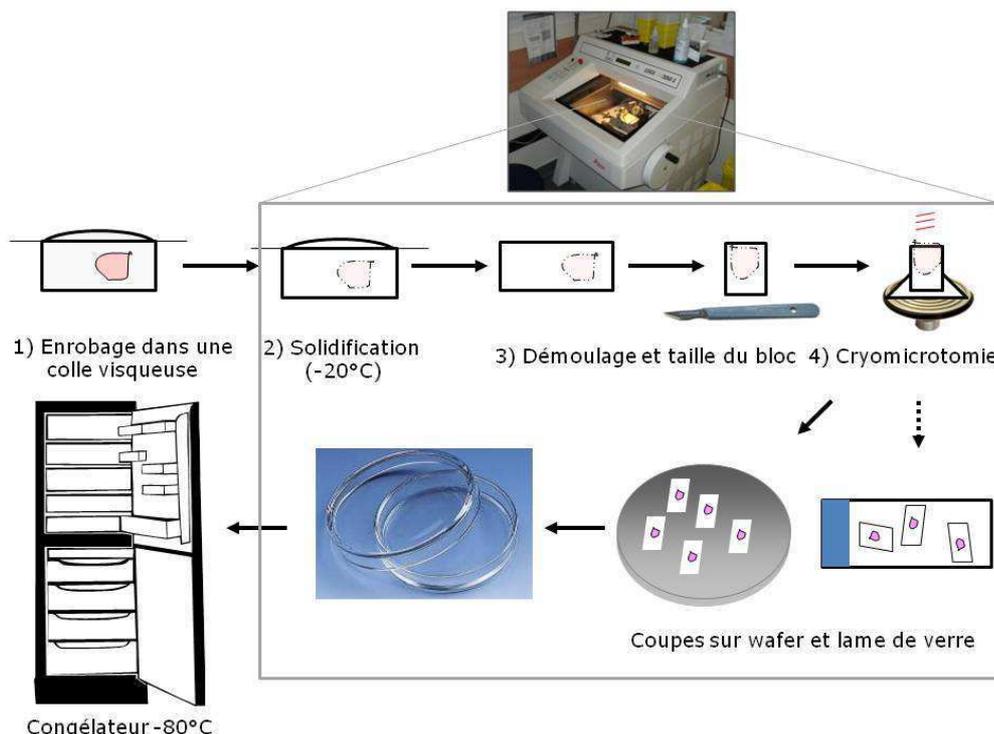


Figure 2-12 : Préparation des tissus mous en cryomicrotomie, enrobage dans la colle OCT, solidification et taille du bloc, coupes à l'aide d'un lame de rasoir. Les coupes sont réalisées dans l'enceinte d'un cryomicrotome (photo).

Maintenu à une température de -80°C pour sa conservation, le tissu est ramené à une température de -20°C afin de réaliser la coupe dans le cryostat, lui-même à cette température.

L'échantillon, maintenu à l'aide d'une colle appelée O.C.T. (pour Optimal Cutting Temperature), visqueuse à température ambiante mais solide à -20°C , est alors coupé à l'aide d'un cryomicrotome muni de lames de rasoir jetables. En raison de la signature chimique de cette colle, pouvant interférer avec les signaux biologiques recherchés, on préfère parfois utiliser un autre agent enrobant, comme la gomme adragante ou la gélatine (Meriaux, 2011) ou envelopper le tissu préalablement dans du papier d'aluminium (Cotte, 2004). Les coupes obtenues, de 8 à $16\ \mu\text{m}$ d'épaisseur, peuvent être déposées sur tout support compatible avec le porte-échantillon du spectromètre utilisé ensuite pour l'analyse. Ainsi, dans le cas du TOF-SIMS, il est possible de déposer les coupes sur un wafer de silicium, une plaque en inox également compatible avec l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) mais aussi sur une lame de verre de microscope. Les opérations d'inclusion et de coupe sont réalisées dans une pièce confinée réservée à la préparation des échantillons biologiques, dans le respect des textes réglementaires (accès réglementé, élimination des pièces anatomiques et des instruments jetables en DASRI, port de blouses, utilisation de lames jetables et pratiques adaptées).

Deux exemples de coupes réalisées par cette technique sont présentés Figure 2-11 (b et d) : le cas d'un tissu frais (peau d'oreille de cochon) et une coupe de peau de momie égyptienne.

Remarque : Afin de réaliser des coupes plus fines, tout en conservant les avantages de l'enrobage dans l'OCT et de la coupe à froid, nous avons réalisé des tests de coupes en ultra-cryomicrotomie sur de la peau de momie. Ces essais n'ont pas permis d'obtenir de meilleurs résultats car la peau de momie, fragilisée, supporte mal les coupes fines avec un simple enrobage (voir 2.4.2.4.1.20). De plus, le problème lié à l'adhérence du tissu sec sur le wafer de silicium demeure.

Une autre solution, dans le cas des peaux de momie, serait de pouvoir réaliser les analyses directement sur les blocs d'OCT avec l'échantillon affleurant à la surface. Ceci nécessite de réaliser les analyses à froid (-20°C) afin que l'OCT reste solide, ce qui n'est pas réalisable pour l'instant.

Avant d'aborder l'étude de tissus complexes (tissus kératinisés et peaux), je vais présenter les modalités d'analyses des protéines. Je rappellerai dans un premier temps les techniques classiques d'analyses de ces molécules et les informations qu'elles permettent d'obtenir. Dans un second temps, nous présentons l'analyse d'acides aminés, de protéines, puis de tissus osseux (moderne et anciens) pour expliquer comment s'effectue l'étude des protéines (et de leur dégradation) en TOF-SIMS.

2.5 Étude des protéines en SIMS

2.5.1 Méthodes d'analyse classiques

Si les techniques de colorations histologiques ou immunochimiques (Wick, 2001) permettent de repérer et de localiser la présence d'une protéine donnée dans un tissu, on recherche souvent à identifier les protéines présentes et à caractériser leur état de dégradation sans connaissance a priori.

Classiquement, les protéines (et plus généralement les polypeptides) doivent être extraites des tissus ou des fluides biologiques. Cette étape délicate doit être réalisée à froid et rapidement afin de limiter tout risque de contamination et de dénaturation des protéines. Les protéines ainsi récupérées peuvent être purifiées après solubilisation. La séparation des protéines peut être effectuée à l'aide de techniques telles que la chromatographie : en phase liquide à haute performance (en anglais HPLC pour High Performance Liquid Chromatography), en phase inverse, chromatographie d'affinité... L'électrophorèse (migration dans un champ électrique), la filtration sur gel ou l'ultracentrifugation permettent aussi leur séparation et caractérisation. La modification, par différentes réactions chimiques, des extrémités N-terminales ou C-terminales de la chaîne polypeptidique donnent également des informations sur la nature de la protéine.

La spectrométrie de masse offre cependant, depuis la fin des années 80, des possibilités d'analyse plus directe comme l'électronébullition (ou Electrospray, ESI) et la désorption-ionisation laser assistée par laser (ou MALDI, acronyme anglais pour Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation). Ces techniques de désorption permettent l'analyse de composés de haut poids moléculaire avec une grande précision et une sensibilité de l'ordre de la femtomole (Spengler, 1990). La faible fragmentation des espèces par ces méthodes d'ionisation ainsi que la précision des analyseurs qui peuvent leur être associés permettent l'analyse de mélange complexe de protéines sans séparation préalable. Appliquées récemment à l'étude de coupes de peinture, ces techniques ont permis, par exemple, la caractérisation de liants protéiques, respectivement en MALDI dans une peinture italienne de la fin du XV^{ème} siècle (van der Werf, 2012) et en ESI dans un ornement doré du XVIII^{ème} siècle (Dallongeville, 2011). Dans ce dernier cas, l'origine animale de la colle a même pu être identifiée grâce à l'utilisation d'un analyseur haute résolution à résonance cyclotronique d'ion (en anglais FT-ICR pour Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance).

La présence de contaminants et de sels, auxquels les méthodes MALDI et ESI sont sensibles, nécessitent cependant souvent le recours à une étape de purification et de concentration des protéines dans le mélange analysé (de Hoffmann, 2005). On peut citer par exemple, dans ce but, le couplage de l'electrospray avec l'HPLC (Zhang, 2006) ou l'électrophorèse capillaire (Duteil, 1999). Afin d'obtenir des informations sur la séquence et non seulement sur le poids moléculaire de la protéine étudiée, les ions

moléculaires peuvent être ensuite fragmentés, au niveau des liaisons peptidiques et/ou de la chaîne latérale des acides aminés. La fragmentation peut être induite par exemple par collision de l'ion d'intérêt avec les atomes d'un gaz neutre (dissociation induite par collision ou CID). Dans le cas du MALDI, la sélection de l'ion et l'utilisation d'un analyseur à temps de vol muni d'un miroir électrostatique (ou *reflectron*) permettent d'observer les fragments du peptide d'intérêt (on parle de technique PSD pour Post Source Decay). Cette possibilité a, par exemple, permis de déterminer, par comparaison des spectres initiaux (MS) et post-fragmentés (MS/MS), l'origine animale des fibres textiles, appartenant aux vêtements de la momie Ötzi (Hollemeier, 2008).

Notons que dans le cas de la spectrométrie de masse MALDI, l'imagerie directe sur tissu est possible (Caprioli, 1997), avec une résolution typique de 50 μm (Stoeckli, 2001), 5 μm étant la limite basse qui a pu être atteinte sous certaines conditions (Touboul, 2011).

La diffraction des rayons X apporte des informations sur les structures secondaire, tertiaire et quaternaire des protéines. Elle nécessite cependant, dans la plupart des cas, que les protéines soient cristallisées. Si ce n'est pas le cas, il est, par exemple, possible de les faire précipiter grâce à un sel tel que $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou de les extraire par dialyse. La diffraction des rayons X a par exemple permis d'explicitier la structure en triple hélice (superhélice de procollagène) du collagène de type I, provenant en particulier du tendon de queue de kangourou (Ramachandran, 1955).

Les spectroscopies vibrationnelles infrarouge (IR) et Raman peuvent donner des informations sur la présence de certains acides aminés dans la structure primaire et renseigner sur les structures secondaires majoritaires d'une protéine. En effet, ces spectroscopies donnent des informations sur la liaison peptidique et la nature des chaînes latérales d'une part et la position des bandes caractéristiques des protéines (amide I et amide II) est sensible à la présence de liaisons hydrogènes caractéristiques des différentes structures secondaires. Ainsi, si la structure secondaire majoritaire d'une protéine est une hélice α , les bandes amide I et amide II du spectre IR correspondant apparaîtront respectivement entre 1651 et 1657 cm^{-1} et à 1548 cm^{-1} . Les sous-bandes correspondant au cas du feuillet β seront quant à elles présentes entre 1621 et 1627 ; 1628 et 1634 ; 1635 et 1640 ainsi que 1671 et 1679 cm^{-1} pour la bande amide I et 1530 cm^{-1} pour la bande amide II (Stuart, 1997). Notons que la distinction entre les deux types de sous-bandes n'est possible que si la résolution spectrale est suffisante. La proportion relative de chacune des structures dans les protéines est également contenue dans le spectre : il suffit de calculer l'aire des pics correspondant à l'une ou l'autre configuration. Cette possibilité a, par exemple, été mise à profit, en Raman, pour montrer que la structure secondaire majoritaire de la fibroïne de soie Bombyx Mori est le feuillet β (50%) contre 14% pour l'hélice α (Lefèvre, 2007).

Dans notre cas, l'imagerie TOF-SIMS a été choisie pour étudier les protéines de différents tissus biologiques anciens in situ, à une échelle submicronique.

2.5.2 *Analyse des acides aminés et des protéines en TOF-SIMS*

La spectrométrie de masse TOF-SIMS permet d'étudier, a priori, uniquement la composition en acides aminés d'une protéine (présence et proportions relatives). Toutefois, comme nous l'avons vu au paragraphe 1.2.2, cette composition (mais aussi l'enchaînement des acides aminés ou séquence) conditionne la construction des structures hiérarchiques supérieures.

Si l'ion pseudo-moléculaire d'une molécule organique de masse moléculaire inférieure à m/z 1500 est généralement présent dans le spectre (Mazel, 2009), les signaux correspondant à une molécule de rapport m/z plus élevé sont plus complexes. En effet, ils présentent non seulement un grand nombre de pics mais aussi des fragments de petit rapport m/z .

Ainsi, si dans le cas des lipides, l'ion $[M+H]^+$ (en mode d'ionisation) ou plus souvent l'ion $[M-H]^-$ (en mode d'ionisation négatif) sont détectés, en même temps que des adduits (avec l'ion sodium par exemple en mode d'ionisation positif) et un certain nombre de fragments, dans le cas des protéines et des polypeptides en revanche, seuls des fragments d'acides aminés sont détectés (Graham, 2006).

Depuis 2001, diverses études ont porté sur les protéines et leurs produits de dégradation en TOF-SIMS : études de maladies, d'adsorption de gels à base de protéines (Wagner, 2002) sur différents polymères ou études de tissus et fluides biologiques (surface des cheveux (Kempson, 2003 et Poleunis, 2006), coquille d'huître (Farre, 2011), os, (Schweitzer, 2008 ; Aranyosiova, 2011) et dent (Gotliv, 2006) mais aussi sang séché (Mazel, 2007) et urine de serpent (Mazel, 2010)). Certains auteurs ont utilisé l'analyse multivariée par composantes principales pour déterminer les fragments correspondant aux protéines étudiées. L'identification correspondante n'est pas toujours proposée, les auteurs se contentant parfois de donner une formule chimique. De plus en plus utilisée pour l'analyse des spectres TOF-SIMS complexes (depuis les années 2000) mais aussi des images (Biesinger, 2002), cette méthode de traitement des données a prouvé qu'il était possible de distinguer différents types de protéines en solution grâce au recours à des analyses couplées en analyse par composante principale (ACP) et en analyse discriminante linéaire (ADL) mais que les essais sur des tissus (mettant parfois en jeu des analyses d'images) permettent uniquement de distinguer des protéines d'autres composés biologiques ou des tissus sains par rapport à des tissus malades (Park, 2008). Ces études ont également montré l'influence du support, sur lequel les gouttes de protéines sont déposées, sur le succès des analyses. Depuis 2010, deux études (Kempson, 2010 et Killian, 2011) se sont intéressées à la caractérisation de la dénaturation des protéines. L'étude Killian sur une enzyme (la peroxydase de raifort ou HRP pour horseradish peroxidase en anglais) comportant plusieurs ponts disulfures, montre qu'il existe une corrélation entre la diminution du rapport TOF-SIMS S_2^-/CNO^- et la diminution de l'activité de l'enzyme, manifestation de la perte de sa structure tertiaire. L'ion S_2^- (m/z 63.94) caractérise dans ce cas la présence d'un pont disulfure entre deux résidus soufrés (cystéine) tandis que l'ion CNO^- correspond à un fragment de chaîne polypeptidique. D'autre part, l'utilisation de l'analyse par composante principale (ACP) a permis de montrer, dans le cas de l'étude de Kempson, que le TOF-SIMS peut mettre en évidence la dénaturation. Dans cette étude, deux fragments d'acides aminés (aux rapports m/z 84.08 et 102.04) se sont révélés discriminants car ils sont plus abondants dans l'albumine sérique humaine (protéine majoritaire du plasma sanguin) lorsque celle-ci est dénaturée.

Enfin, la variété des méthodes employées pour traiter et normaliser les données ainsi que la difficulté de choisir les pics d'intérêt pour réaliser l'analyse multivariée montrent que ces questions techniques doivent être discutées. Je reviendrai sur ce point au paragraphe 2.5.2.5.

Dans un premier temps, j'ai étudié des standards d'acides aminés puis des protéines entières en solution et enfin des tissus modernes et anciens.

2.5.2.1 Acides aminés

D'après Graham (Graham, 2006), les fragments de tous les acides aminés présents dans la séquence d'une protéine sont en principe présents dans le spectre TOF-SIMS de la protéine. De plus, chacun de ces acides aminés donne classiquement un fragment spécifique en mode d'ionisation positive. La distinction de différentes protéines, but ultime de notre étude pour différencier la kératine et le collagène respectivement dans l'épiderme et le derme de la peau, devra se baser sur les différences de signature spectrale. Il faut ainsi rechercher soit des pics caractéristiques d'acides aminés suffisamment abondants dans la séquence, soit des différences d'intensité relative de chaque pic correspondant à un acide aminé.

Dans un premier temps, je présenterai donc les spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif mais aussi négatif des acides aminés les plus importants dans la séquence des protéines étudiées. Ces composés de référence, acquis auprès de Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), sous forme de poudres, ont été mis en pastilles d'1 mm de diamètre, à l'aide d'une micropastilleuse et d'une presse hydraulique. Cette préparation permet d'obtenir une surface relativement plate pour l'analyse en TOF-SIMS. Si la pastille est suffisamment solide, celle-ci est transférée sur un scotch carbone, directement collé sur un wafer de silicium. Sinon l'échantillon doit être dissout dans un solvant adapté et déposé sous forme de goutte sur le wafer. Le solvant utilisé est évaporé à l'air libre avant l'introduction sous vide dans le TOF-SIMS.

Après l'acquisition, successivement dans les deux modes, positif et négatif, la visualisation des images ioniques correspondant aux principaux pics du spectre, permet de contrôler la planéité de la pastille ou l'homogénéité du dépôt sur le wafer. Le spectre total est également analysé avec précision pour déceler la présence éventuelle de pollutions. Le cas échéant, une ROI peut être délimitée afin d'obtenir le spectre sur une zone non polluée.

2.5.2.1.1 Cas de l'hydroxyproline

Comme nous l'avons dit précédemment, l'hydroxyproline est l'acide aminé caractéristique du collagène, souvent utilisé pour son identification. Sa synthèse nécessite la présence de vitamine C. Ceci explique les manifestations cliniques du scorbut : le déficit en vitamine C ne permet plus de synthétiser l'hydroxyproline et l'hydroxylysine du collagène des vaisseaux sanguins ce qui provoque, entre autres, le saignement des gencives ainsi que des dérèglements cutanés (Rawn, 1990).

Les formules développées de l'hydroxyproline et de la proline, acide aminé dont elle dérive, sont rappelées Figure 2-13 et les spectres dans les deux modes d'ionisation de l'hydroxyproline sont présentés Figure 2-14.



Figure 2-13 : Formules semi-développées de la proline (a) et de l'hydroxyproline (b)

Le spectre en mode d'ionisation positif (Figure 2-14a) est dominé par l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ de l'hydroxyproline (m/z 132.06). L'ion dimère $[2M+H]^+$ (m/z 263.12), deux adduits de plus faible intensité (notamment $[M+Na]^+$, m/z 154.05) ainsi qu'un grand nombre de fragments, sont aussi détectés. Ces fragments ont été identifiés et leur attribution ainsi que la référence bibliographique associée à celle-ci sont précisées dans l'annexe 2. Les fragments $C_4H_6N^+$ (m/z 68.05) et $C_4H_8NO^+$ (m/z 86.06) sont caractéristiques. Dans le cas de la proline, acide aminé structurellement très proche, le fragment majoritaire, dans le spectre en mode d'ionisation positif, est $C_4H_8N^+$ (m/z 70.07). Cette fragmentation correspond pour les deux acides aminés au cycle pyrrolidone (C_4H_9N , de masse moléculaire $M = 71.12 \text{ Da}$, en l'absence de fonction hydroxyle OH) et donc à la perte de la fonction acide carboxylique. On remarque l'absence des ions fragments $C_5H_9NO_3^+$ (m/z 131) et $C_5H_8NO^+$ (m/z 98) détectés dans l'os et considérés par Aranyosiova comme caractéristiques de l'hydroxyproline (Aranyosiova, 2011).

En mode d'ionisation négatif (Figure 2-14 b), l'ion moléculaire (déprotoné dans ce cas) est aussi présent ($[M-H]^-$, m/z 130.04) ainsi que le dimère ($[2M-H]^-$, m/z 261.12) mais les pics majoritaires correspondent à des petits fragments de la chaîne polypeptidique comme CN^- (m/z 26.00) et CNO^- (m/z 42.00).

Il apparait donc ici que le mode positif apporte plus d'informations sur la structure de l'acide aminé.

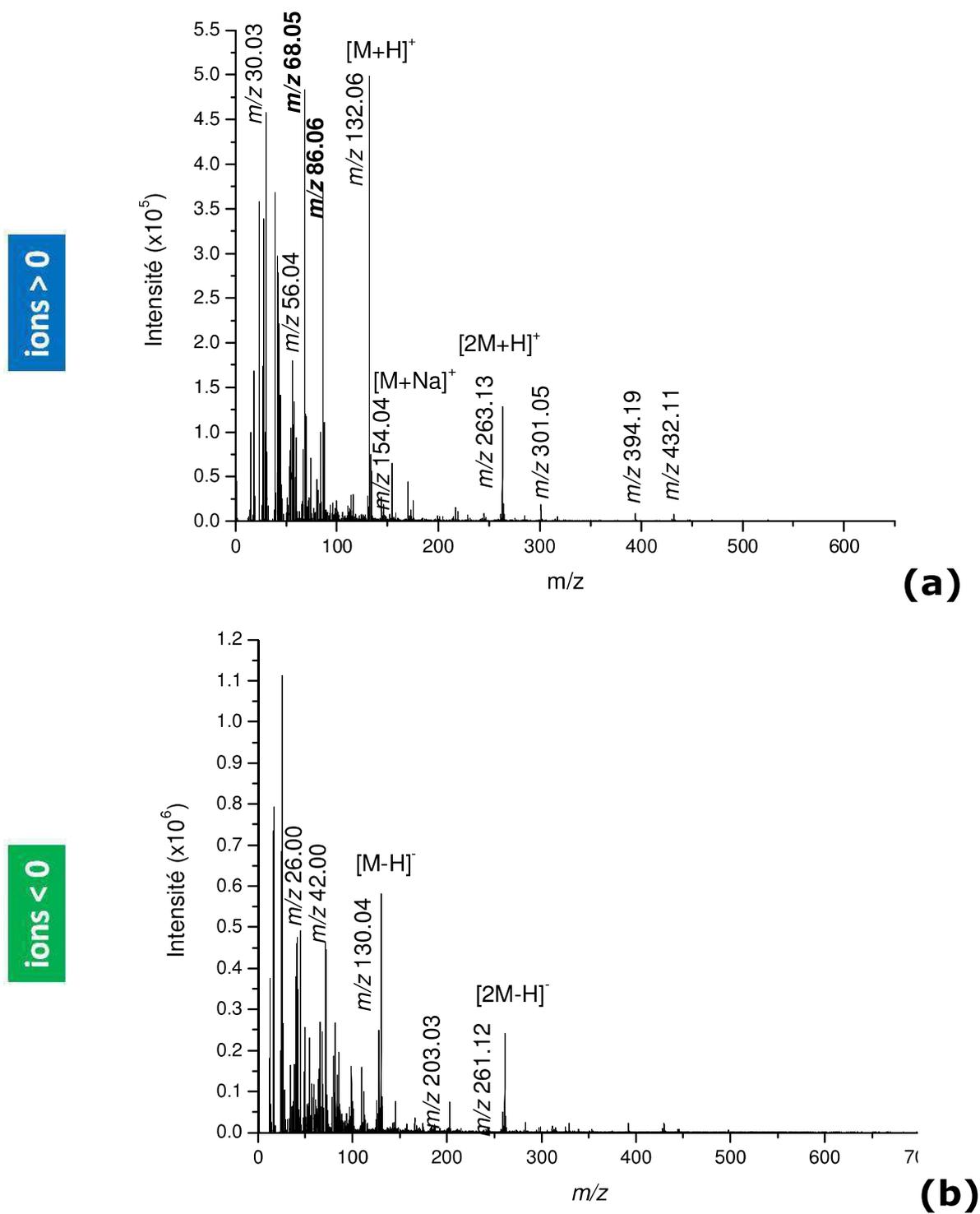


Figure 2-14 : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) d'une référence d'hydroxyproline

2.5.2.1.2 Cas d'acides aminés sulfurés de la kératine

Dans la kératine, en particulier dans les cheveux, les acides aminés sulfurés sont présents en quantité particulièrement importante. La richesse en soufre dans certaines protéines fibrillaires et globulaires explique la dureté des tissus qui les contiennent, comme par exemple celle de la tablette unguéale (partie visible de l'ongle, qui peut être vernie), riche en kératine (Kierszenbaum, 2006). Trois références d'acides aminés sulfurés ont été étudiées : la cystéine possédant un groupement thiol (S-H), la cystine comportant un pont disulfure (S-S) et la lanthionine comportant une liaison thioéther (C-S-C). Leur formule développée est rappelée Figure 2-15. Si la cystéine est un acide aminé protéinogène, la cystine est formée par établissement d'un pont disulfure entre les cystéines des différentes chaînes polypeptidiques (structure tertiaire de la kératine du cheveu par exemple) et la lanthionine est un produit de dégradation de la cystine, par exemple lors du processus de teinture antique du cheveu à l'aide de sels de plomb (Walter, 2006).

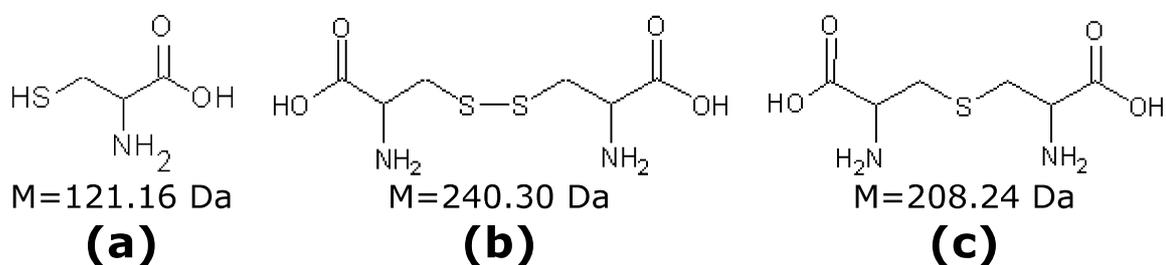


Figure 2-15 : Formule développée de trois acides aminés sulfurés : la cystéine (a), la cystine (b) et la lanthionine (c). Leur masse moléculaire est précisée.

Le spectre en mode d'ionisation positif (Figure 2-16 a) est dominé par des fragments de petit rapport m/z , l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ (m/z 122.03) étant ici minoritaire. L'ion dimère $[2M+H]^+$ (m/z 241.04), et un adduit de plus faible intensité ($[2M+Na]^+$, m/z 263.02) sont aussi détectés.

Les fragments ont été identifiés et leur attribution ainsi que la référence bibliographique associée à celle-ci sont précisées dans l'annexe 2. Le fragment $C_2H_6SN^+$ (m/z 76.02) est caractéristique. Cette fragmentation correspond à la perte de la fonction acide carboxylique COOH.

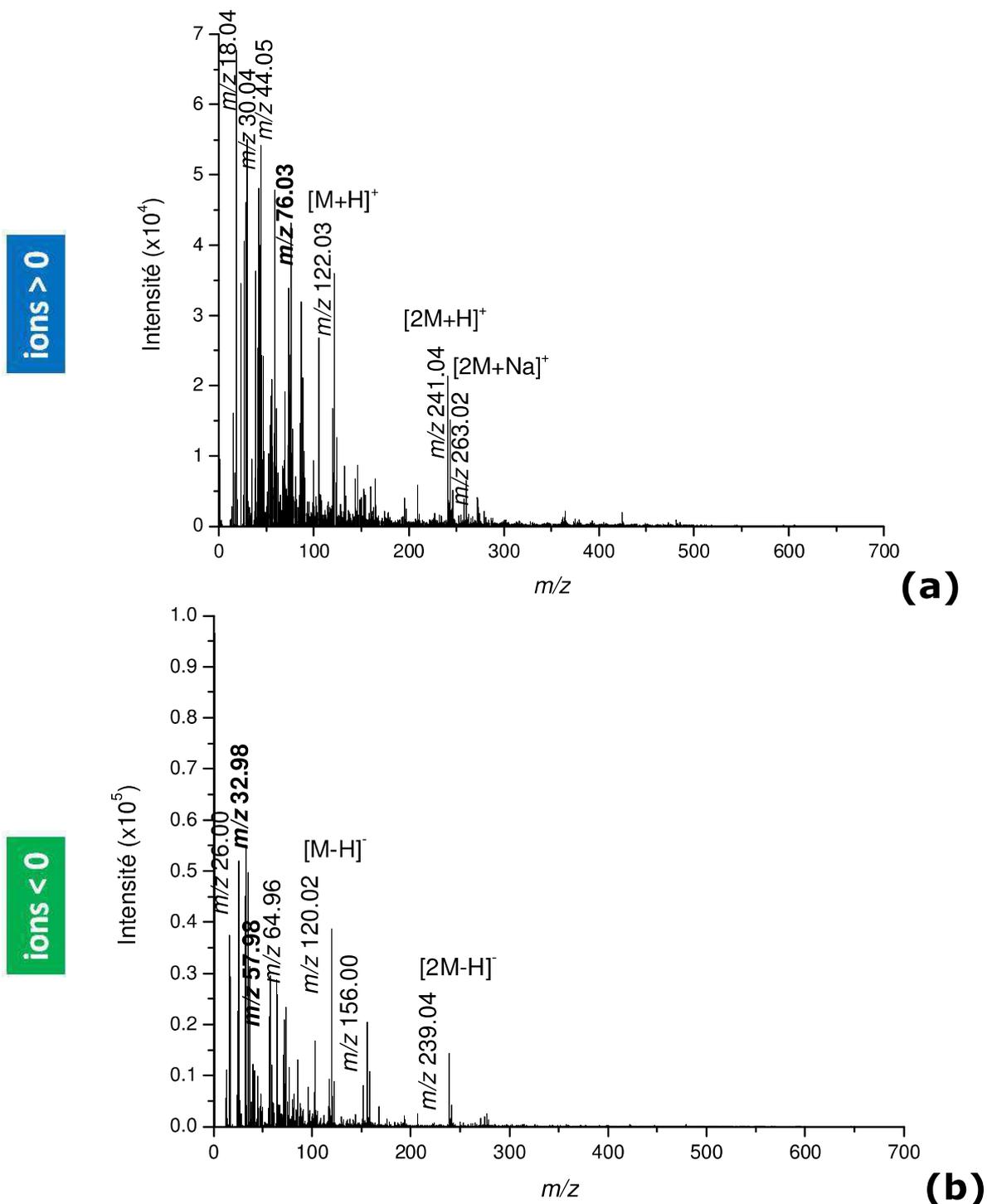


Figure 2-16 : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) d'une référence de cystéine

Dans le cas de la cystine (Figure 2-17 a), structurellement très proche, le fragment à m/z 74.02 est présent en quantité plus importante que le fragment $C_2H_6N^+$. Celui-ci pourrait être attribué à l'ion $C_2H_4SN^+$.

En mode d'ionisation négatif (Figure 2-16 b), l'ion moléculaire déprotoné et le dimère sont aussi présents ($[M-H]^-$, m/z 120.02 et $[2M-H]^-$, m/z 239.04) mais les pics majoritaires correspondent à des ions et des fragments soufrés (HS^- , m/z 32.98 ; SCN^- , m/z 57.98 et S_2^- , m/z 63.95) ainsi qu'à des petits fragments de la chaîne polypeptidique comme CN^- (m/z 26.00) et CNO^- (m/z 42.00). L'ion à m/z 74.01 pourrait correspondre à $C_2H_4SN^-$.

Ainsi, dans le cas de cet acide aminé soufré, le spectre en mode d'ionisation négatif est aussi porteur d'informations sur la composition de l'acide aminé.

Si les spectres de la cystine (Figure 2-17) semblent correspondre à celui de deux molécules de cystéine (pics correspondant à la cystéine auxquels s'ajoutent les pics moléculaires), on note toutefois, l'apparition, dans les deux modes, de pics supplémentaires : à m/z 112.90 en mode positif et 95.92 en mode négatif. Ce dernier pourrait correspondre à l'ion S_3^- puisqu'il est distant de 31.97 Da de l'ion S_2^- (m/z 63.95). L'ion majoritaire reste cependant dans ce mode, l'ion HS^- , comme dans le cas de la cystéine.

2.5.2.1.3 Cas de la lanthionine

Les spectres de la lanthionine, présentés Figure 2-18, montrent une signature différente. Ainsi en mode d'ionisation positif, le spectre est dominé par des petits fragments d'acides aminés non spécifiques : $C_2H_6N^+$ (44.05) et CH_4N^+ (30.03) ainsi qu'un fragment à m/z 86.09 correspondant à l'ion $C_5H_{12}N^+$. On remarque, de plus, que les pics de l'ion moléculaire protoné et du dimère sont absents dans les deux modes d'ionisation. Ils sont remplacés par des pics à m/z 252.10 en positif et 286.07 en négatif d'une part et par des ions moins intenses à m/z 503.13 en positif et 537.14 en négatif. Ces pics n'ont pas pu être attribués.

En mode d'ionisation négatif, les ions correspondant au soufre seul (S^- et HS^-) ne sont pas présents et le spectre est dominé par l'ion m/z 45.99 (SCH_2^-) et l'ion m/z 137.02. Les petits fragments, considérés comme des marqueurs de la présence des protéines, CN^- , CNO^- et C_3N^- sont aussi présents.

Ainsi, malgré la proximité de leurs structures, les trois acides aminés soufrés donnent une signature spectrale différente en TOF-SIMS. En particulier, ils peuvent être distingués, en mode d'ionisation négatif : la cystéine et la cystine se distinguent de la lanthionine par la présence des ions S^- (m/z 32.98) et SCN^- (57.98). Elles se distinguent entre elles car l'ion S_2^- correspondant à un pont disulfure n'est présent que dans le spectre de la cystine.

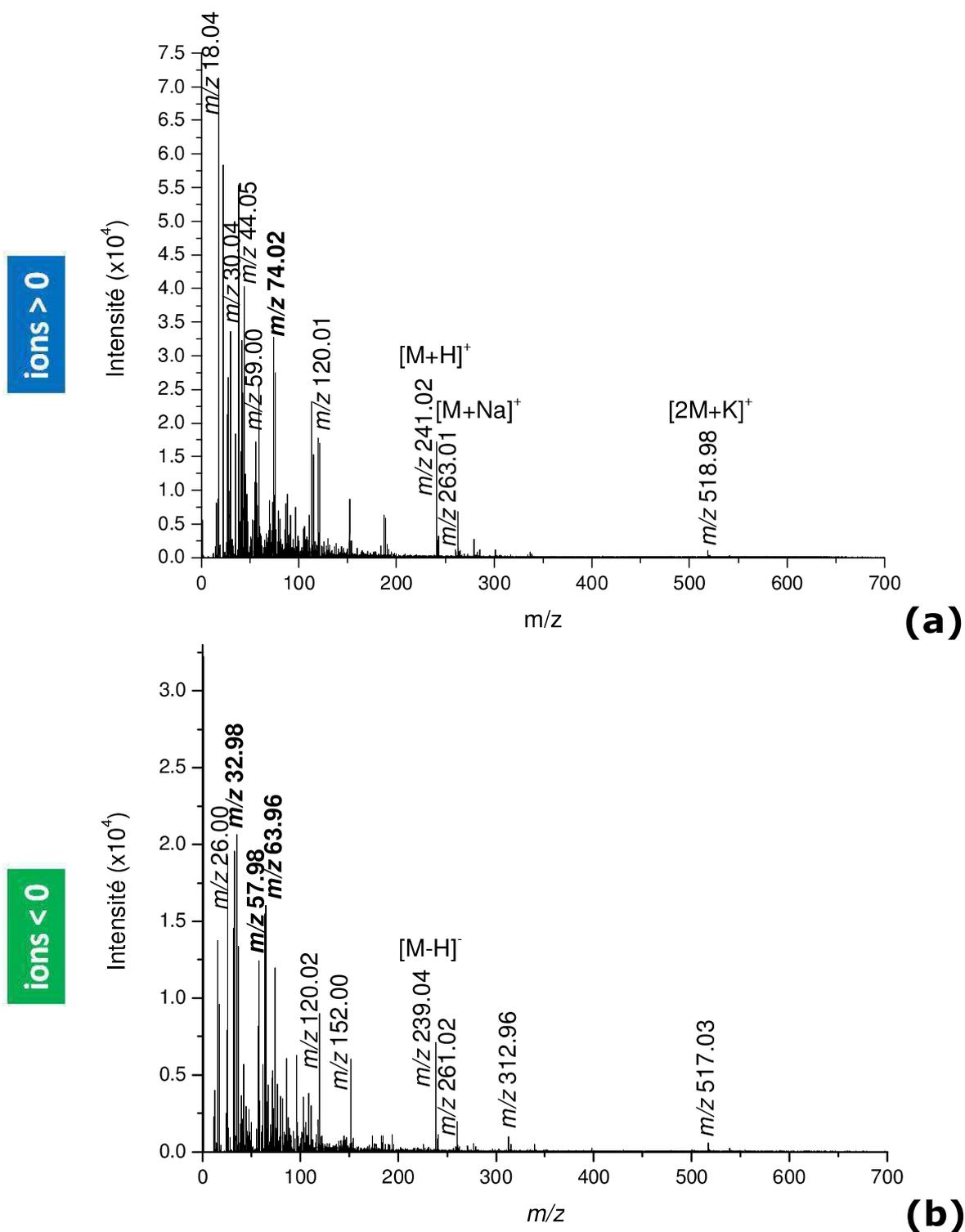


Figure 2-17 : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) d'une référence de cystine

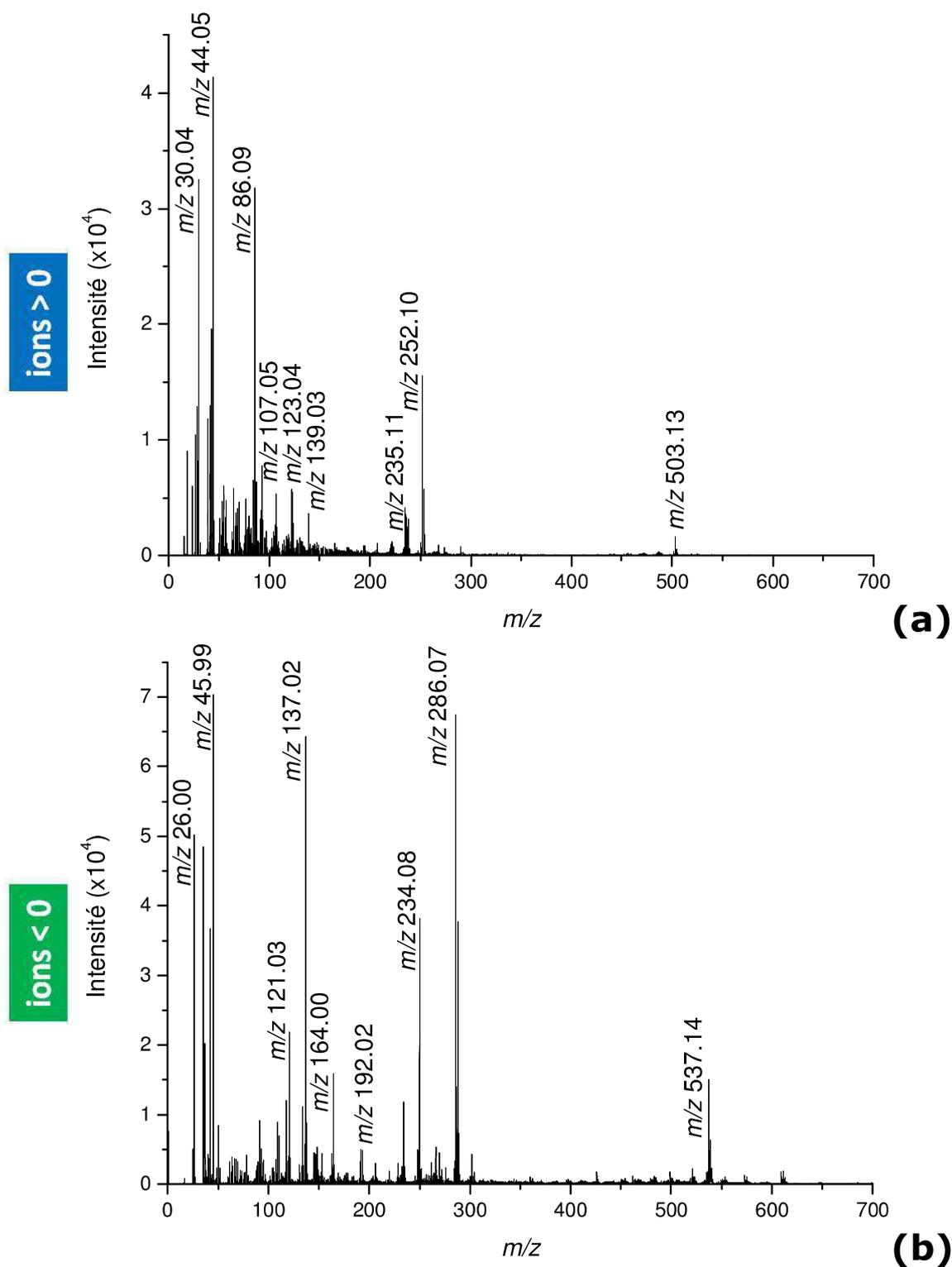


Figure 2-18 : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) d'une référence de lanthionine

2.5.2.2 Protéines

Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.2.2, la kératine de l'épiderme et le collagène du derme peuvent théoriquement être distingués grâce à leur composition en acides aminés. Ce constat effectué, une difficulté demeure dans le cas du SIMS : Quelle est la signature spectrale de chacune de ces protéines ? Peut-on relier cette signature aux acides aminés composant la séquence et à leur fragmentation ?

Pour ces analyses, une goutte de kératine d'épiderme humaine conservée dans de l'azoture de sodium NaN_3 (Sigma-Aldrich) et une de collagène de derme bovin (Gibco, Paisley, Royaume-Uni) commerciaux ont été déposés sur wafer (sans dilution). L'insuline commerciale de pancréas porc (Sigma-Aldrich), vendue en poudre, a été dissoute dans de l'eau ultrapure MilliQ avant dépôt d'une goutte sur wafer. Les précautions de conservation des différentes références ont été respectées afin d'éviter la dégradation des protéines avant l'analyse. Afin d'éviter toute contamination, les gouttes ont été déposées à l'aide de capillaires en verre à usage unique et des gants en nitrile ont été portés.

La composition en acides aminés des trois protéines étudiées est rappelée dans le Tableau 2-2.

	Ala	Arg	Asp	Cys	Glu	Gly	His	Leu/Ileu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	OH-Pro	OH-Lys
Collagène	11.4	4.1	4.7	0.0	6.8	36.5	0.4	3.9	2.4	0.5	1.2	11.6	3.9	1.8	0.0	0.5	2.0	7.7	0.6
Kératine	6.9	7.2	9.2	7.5	16.6	5.2	0.7	13.9	3.5	0.4	2.0	3.8	9.0	5.5	0.0	2.5	6.1	0.0	0.0
Insuline	5.9	2.0	5.9	11.8	13.7	7.8	3.9	13.7	2.0	0.0	5.9	2.0	5.9	2.0	0.0	7.8	9.8	0.0	0.0

Tableau 2-2: Comparaison de la composition en acides aminés du collagène de derme bovin, de la kératine issue du cheveu et de l'insuline de pancréas de porc (Rawn, 1990).

2.5.2.2.1 Collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante chez les vertébrés. Il existe en réalité plusieurs types de collagène. Je me suis limité à l'étude du collagène I ($M=285$ kDa) majoritaire dans la peau et les os (Hennen, 2001).

Le spectre en mode d'ionisation positif du collagène (Figure 2-19 a) est dominé par les ions fragments correspondant à la glycine (CH_4N^+ , m/z 30.03), la proline ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$, m/z 70.06), l'alanine ($\text{C}_2\text{H}_6\text{N}^+$, m/z 44.05), l'hydroxyproline ($\text{C}_4\text{H}_6\text{N}^+$, m/z 68.05 et $\text{C}_4\text{H}_8\text{NO}^+$, m/z 86.06) et l'acide glutamique (m/z 41.04 et $\text{C}_4\text{H}_6\text{NO}^+$, m/z 84.04). Il s'agit des acides aminés effectivement majoritaires dans le collagène.

En mode d'ionisation négatif (Figure 2-19 b), les pics majoritaires correspondent, comme dans le cas des acides aminés, à des petits fragments de la chaîne polypeptidique comme CN^- (m/z 26.00), CNO^- (m/z 42.00) mais aussi C_3N^- (m/z 50.00), C_2N_3^- (m/z 66.00) pour les fragments azotés et $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2^-$ (m/z 71.02) et $\text{C}_4\text{H}_3\text{O}_3^-$ (m/z 99.04) d'autre part. La présence de chlore est aussi détectée (Cl^- , m/z 34.97) : elle correspond vraisemblablement à une pollution.

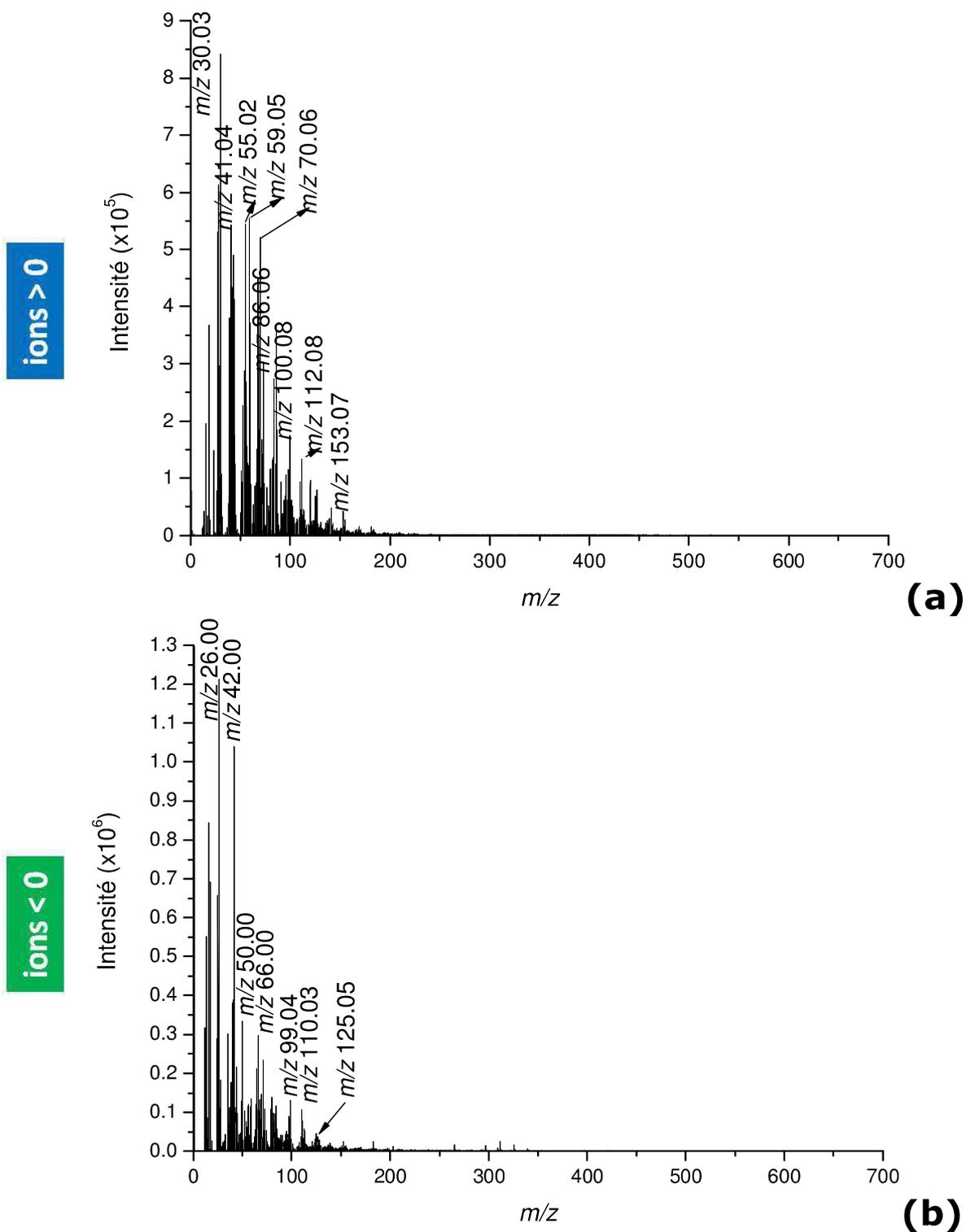


Figure 2-19 : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) d'une référence de collagène

2.5.2.2.2 Kératine

Le spectre en mode d'ionisation positif (Figure 2-20 a) est dominé par l'ion Na^+ (m/z 22.99) lié à la présence d'azoture de sodium comme conservateur dans la référence commerciale de kératine étudiée.

Une série de pics séparés de 60.03 Da dominant le spectre. Le premier de cette série est un fragment soufré ($\text{C}_2\text{H}_5\text{S}^+$, m/z 61.03). La série pourrait correspondre à l'adjonction d'un groupement SiO_2 , le support de dépôt étant un wafer de silicium. On remarque aussi la présence de pics moins intenses correspondant à la glycine (CH_4N^+ , m/z 30.03) ou la proline ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$, m/z 70.06). Les pics caractéristiques de la cystéine et de la cystine ne sont pas identifiés dans ce spectre.

En mode d'ionisation négatif (Figure 2-20 b), les pics majoritaires correspondent, comme dans le cas précédent, aux petits fragments de la chaîne polypeptidique (notamment CN^- et CNO^-).

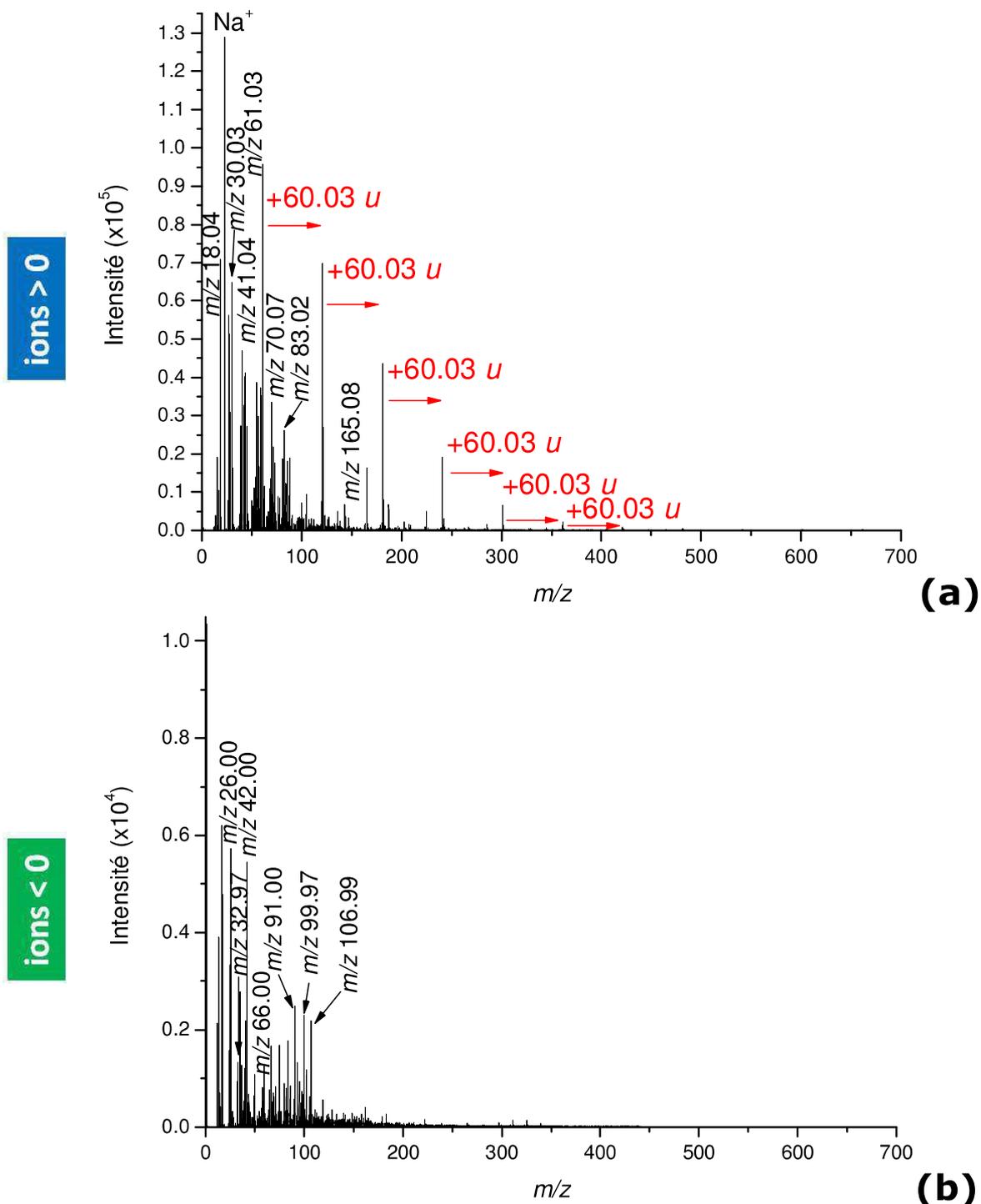


Figure 2-20 : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) d'une référence de kératine

2.5.2.2.3 Insuline

La séquence de l'insuline a été déterminée par Frederick Sanger dès 1955 (Prix Nobel de Chimie, 1958). Elle est riche en leucine, cystéine et glutamine et son poids moléculaire est $M = 5777.6$ Da (dans le cas du porc)¹¹. L'insuline est une protéine globulaire possédant 3 ponts disulfure : deux de type interchaines comme dans la kératine (ponts entre cystéines formant une cystine), et le troisième de type intrachaine (Rawn, 1990). Protéine de régulation du glucose dans le sang, sécrétée dans le pancréas, son absence peut être mortelle. Sa synthèse en 1958 a permis d'améliorer le traitement du diabète de type I dont les symptômes sont cependant connus depuis l'Égypte ancienne au moins. Ainsi le Papyrus Ebers, découvert dans une tombe à Thèbes en 1872 et datant du XVI^{ème} siècle av. J.-C, décrit la polyurie associée à cette maladie et préconise de suivre un régime à base de fruits, céréales, bière et miel (Nunn, 2002).

Le spectre de l'insuline en mode d'ionisation positif (Figure 2-21 a) est très différent de celui de la kératine et du collagène. Il est dominé par les pics du sodium (Na^+ , m/z 22.99) et du potassium (K^+ , m/z 38.96) et on identifie, outre l'ion CH_4N^+ que l'on retrouve dans toutes les références d'acides aminés et de protéines, uniquement des sels de sodium et potassium (de type CNXY^+ avec X et Y les éléments sodium ou potassium) et des adduits d'ions sulfates. Ceux-ci ont déjà été identifiés dans des patines de statuettes africaines Dogon contenant également des protéines issues de deux fluides biologiques : du sang séché et de l'urine de serpent (Mazel, 2006a et 2010). Leur attribution est résumée dans le Tableau 2-3.

Le spectre en mode d'ionisation négatif contient en revanche des marqueurs de la protéine sous forme de fragments de basse masse : CN^- , CNO^- , C_3N^- , C_2N_3^- . L'ion de rapport m/z 83.87 pourrait correspondre à $\text{C}_2\text{N}_2\text{S}^-$.

¹¹ L'insuline humaine possède une séquence très proche de celle du porc et une masse moléculaire $M = 5804$ Da.

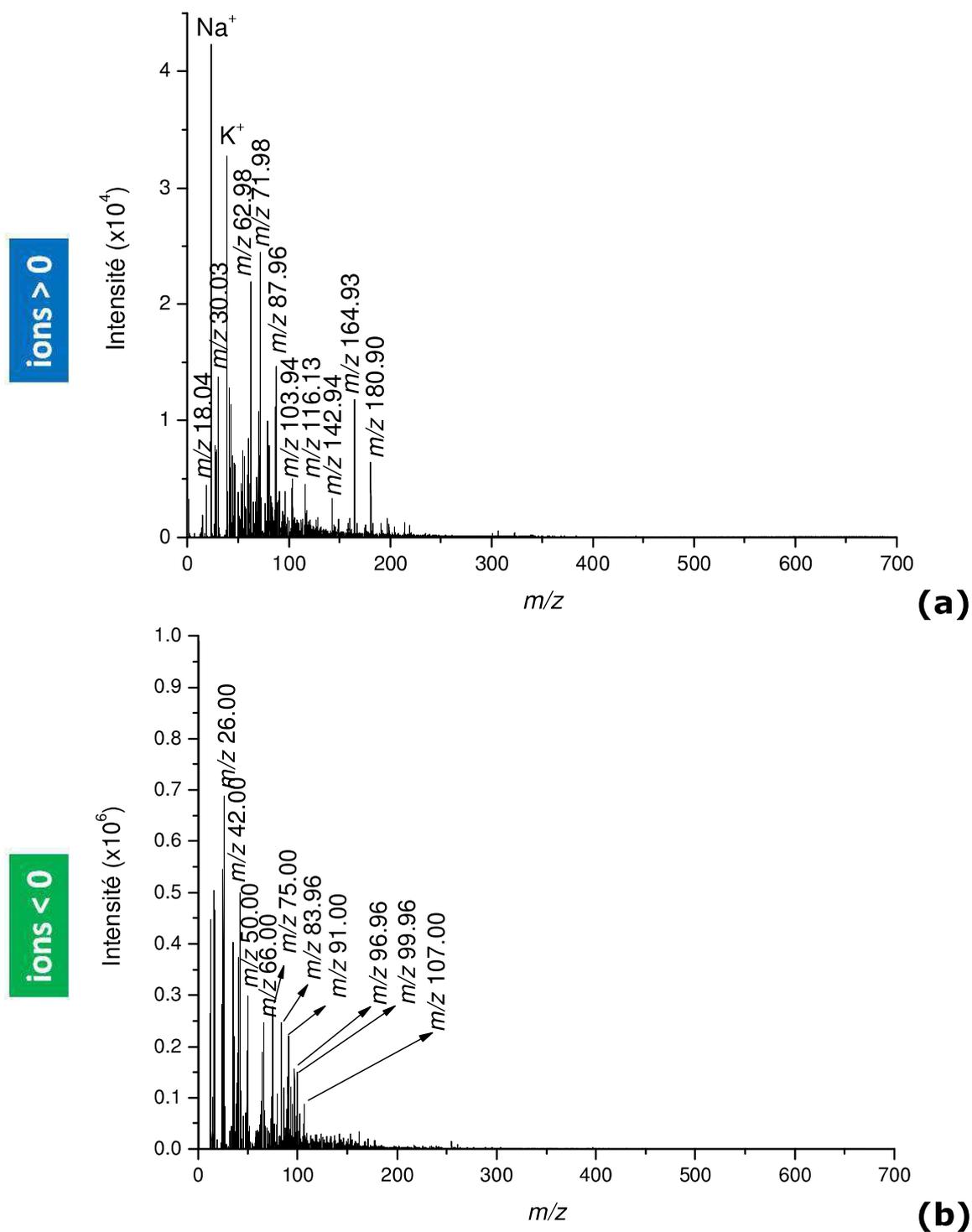


Figure 2-21 : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) d'une référence de l'insuline

<i>m/z</i>	Attribution	Nature
62.98	Na_2OH^+	Sel de sodium
71.98	CNNa_2^+	Sel de sodium
87.96	CNKNa^+	Sel de sodium et potassium (Jones, 2006)
103.94	CNK_2^+	Sel de potassium
164.93	Na_3SO_4^+	Adduit d'ion sulfate (Guazzotti, 2004)
180.90	$\text{KNa}_2\text{SO}_4^+$	Adduit d'ion sulfate (Guazzotti, 2004)

Tableau 2-3: Attribution des principaux pics du spectre de la Figure 2-21 a

Ainsi, si la signature spectrale en mode positif du collagène semble facile à relier à sa composition en acides aminés, le spectre en mode d'ionisation négatif est nécessaire pour distinguer la kératine et l'insuline. Contrairement au cas de l'hémoglobine, une protéine du sang lourde ($M=60$ kDa), pour laquelle un constituant particulier, l'hème, permet une identification sans ambiguïté (Mazel, 2007), les protéines fibrillaires étudiées dans cette thèse ne présentent que des fragments de petit rapport m/z correspondant aux acides aminés ou à des fragments de chaîne.

Après avoir présenté la signature spectrale particulière de différentes protéines, intéressons nous à l'analyse de celles-ci au sein d'un tissu. L'exemple choisi est celui de l'os, contenant du collagène. Un échantillon moderne et deux échantillons anciens ont pu être analysés et leur spectres TOF-SIMS comparés. Les analyses structurales permettant de repérer les principales structures osseuses ainsi que l'état de dégradation des échantillons anciens sont également présentées.

2.5.2.3 Étude d'un tissu : l'os

L'étude sur une référence de collagène prouve que l'on peut trouver des marqueurs de cette substance en TOF-SIMS en mode d'ionisation positif, comme nous l'avons vu au paragraphe 2.5.2.1. Un tissu collagénique comme l'os contient beaucoup d'autres molécules organiques et minérales notamment une phase minérale constituée de cristaux d'hydroxyapatite.

2.5.2.3.1 Préparation de l'échantillon

L'os étudié provient d'une main droite humaine trouvée sur le site de Paykend en Ouzbékistan, par une équipe française du Musée du Louvre, du Département des Arts de l'Islam, dirigée par Rocco Rante. Celui-ci a été daté par le carbone 14 de la fin du XIX^{ème} siècle (135 +/- 30 BP). Notons que l'os a donc été trouvé dans un contexte désertique (Richardin, 2011b). L'échantillon sélectionné est la plus petite phalange (Figure 2-22 a). L'os de phalange a été découpé en sections transverses (Figure 2-22 b) de 2 mm d'épaisseur environ. Cette opération a été réalisée à l'aide d'une scie circulaire diamantée (Meule 330 CA, Minitom, Struers). Des coupes transverses (Figure 2-22 c) semi-fines de 1 μm d'épaisseur ont ensuite été réalisées en ultramicrotomie (Figure 2-22 d) comme expliqué au paragraphe 2.4.2.3.

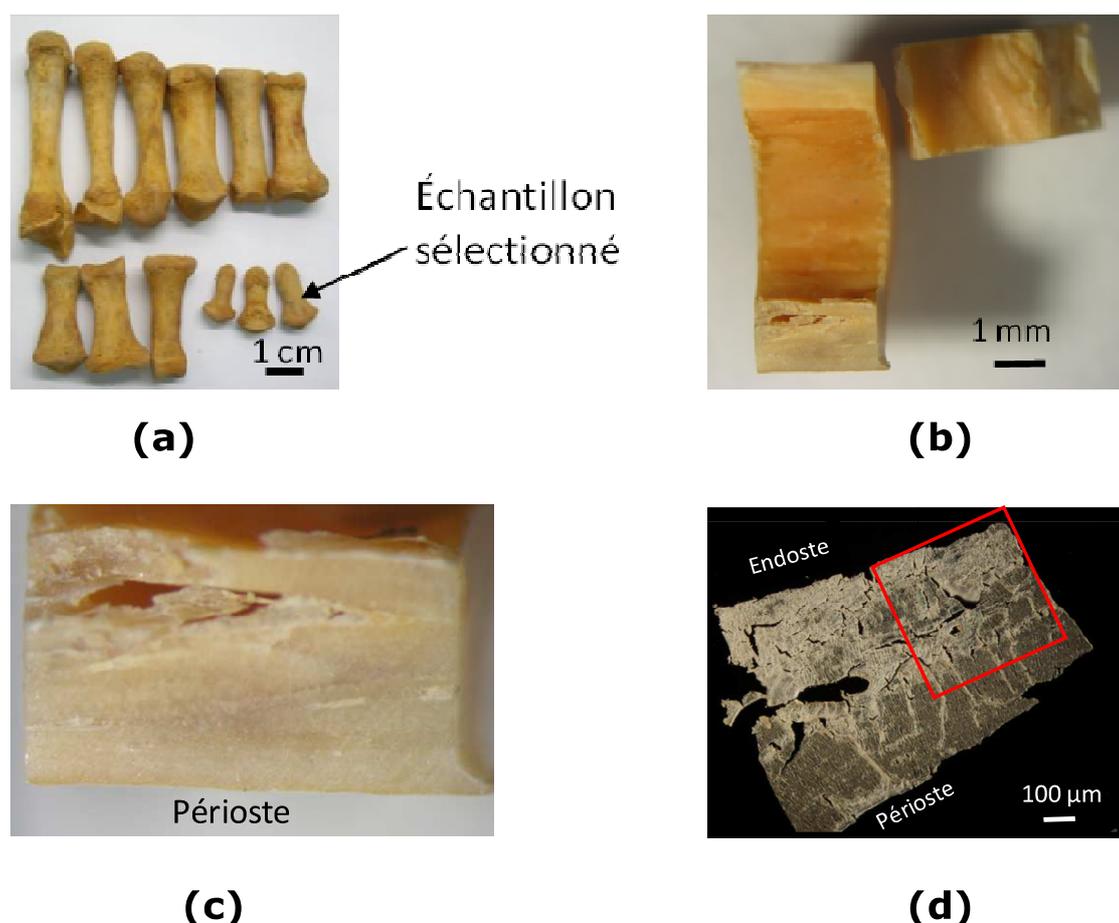


Figure 2-22 : (a) Photographie des ossements de la main droite. L'échantillon de phalange choisi est indiqué. (b) Photographie sous loupe binoculaire de l'échantillon après sciage et (c) zoom sur la zone de coupe. Les zones internes (endoste) et externe (périoste) de l'os sont indiquées. (d) Photographie sous microscope optique d'une coupe d'os déposée sur wafer de silicium. Grossissement x 10. Le cadre rouge indique la zone analysée en TOF-SIMS.

Avant de présenter l'analyse TOF-SIMS effectuée, je rappelle brièvement l'histologie de l'os.

2.5.2.3.2 Qu'est-ce qu'un os ?

Macroscopiquement, tout os se divise en 2 zones principales : une partie externe compacte, l'os dit cortical et une partie plus poreuse et plus importante en volume, interne, l'os trabéculaire dont les zones lacunaires sont remplies par la moelle (Goffer, 2007). Cette architecture explique la résistance mécanique de l'os à la déformation.

En partant de l'extérieur de l'os, on distingue le périoste, première couche de l'os cortical, de nature fibreuse puis une couche plus épaisse d'os cortical constituée d'un réseau de canaux dit de Havers (Prince, 2000). Ceux-ci, d'un diamètre de quelques centaines de microns, s'alignent dans l'axe de l'os. Chaque système haversien (ou ostéon) est constitué d'un canal central entouré de lamelles concentriques d'os lamellaire (les macrofibrilles de collagène sont rangées parallèlement les unes aux autres de façon régulière) entre lesquelles s'intercalent des cellules de type ostéocytes, anciens ostéoblastes ne synthétisant plus de matrice osseuse. Ceux-ci se distinguent en lumière polarisée par leur absence de polarisation et en lumière non polarisée par leur forme aplatie et par les canicules qui les relient entre eux.

Les zones interstitielles entre ostéons sont remplies par des lamelles de même nature. L'irrigation sanguine est assurée par un réseau de vaisseaux, dits canaux de Volkmann, reliant les ostéons les uns aux autres. Le canal central de l'ostéon contient, outre des capillaires sanguins, des nerfs sans gaines de myéline. La zone de contact entre l'os cortical et l'os trabéculaire, appelée endoste, est riche en cellules ostéoprogénitrices et en ostéoblastes, cellules osseuses assurant le renouvellement et le remodelage osseux (Stevens, 1997).

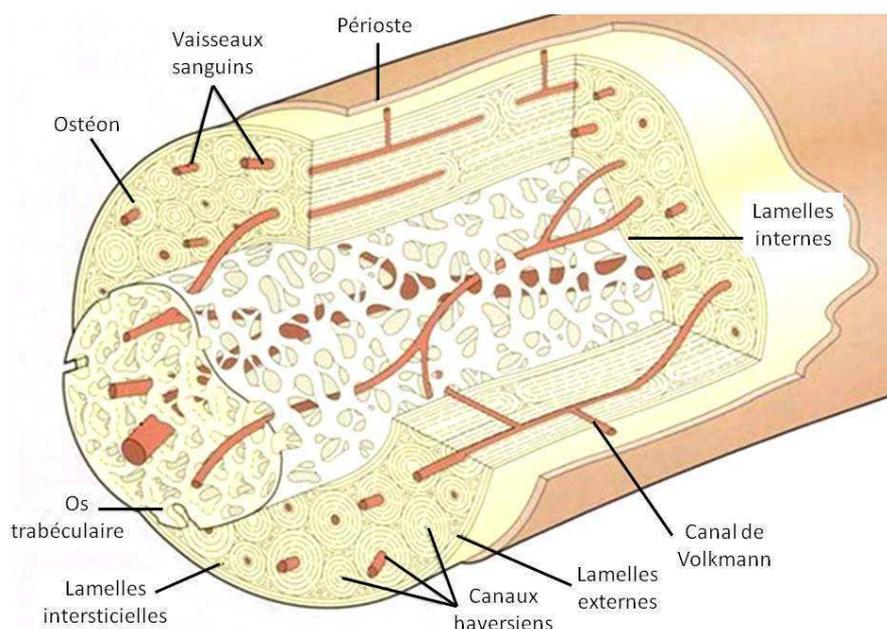


Figure 2-23 : Schéma représentant la structure de l'os cortical, d'après (Stevens, 1997)

Les manuels de biochimie (Rawn, 1990 et Hennen, 2001) offrent, si nécessaire, une description plus détaillée de l'histologie de l'os.

D'un point de vue chimique, l'os est composé d'une phase inorganique (2/3 de l'os en poids), d'une phase organique et d'eau. La phase organique, appelée ostéoïde, constitue la matrice extracellulaire au sein de laquelle sont déposés les sels minéraux. L'ostéoïde est constitué en grande majorité de collagène de type I, dans un gel de glycosaminoglycane et de glycoprotéines spécifiques comme l'ostéocalcine, l'ostéonectine, la thrombospondine (ou l'ostéopontine) qui aident notamment à fixer le calcium. La phase organique contient également une faible part de lipides (concentrés dans la moelle dite 'jaune') et de glucides (Johns, 1977). Les cellules d'ostéoblastes assurent l'organisation de la minéralisation de l'ostéoïde extracellulaire. La phase minérale est constituée majoritairement de cristaux d'hydroxyapatite (désignée par la suite par le sigle HAP, de formule standard $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4 \text{ ou } \text{CO}_3)_x(\text{OH} \text{ ou } \frac{1}{2}\text{CO}_3)_{2-x}$, avec x compris entre 0 et 2 (Rey, 2006) et dont la structure cristalline, pseudo hexagonale, serait proche de la dahlite (Mc Connell, 1965) et de la calcite qui confèrent sa dureté à l'os. On trouve également dans l'os, en plus faibles quantités, des fluorures, du magnésium, du sodium, du plomb et du soufre (Katzenberg, 1997).

2.5.2.3.3 Étude du collagène de l'os en TOF-SIMS

Les spectres en mode d'ionisation positif et négatif de l'échantillon osseux étudié sont présentés Figure 2-24.

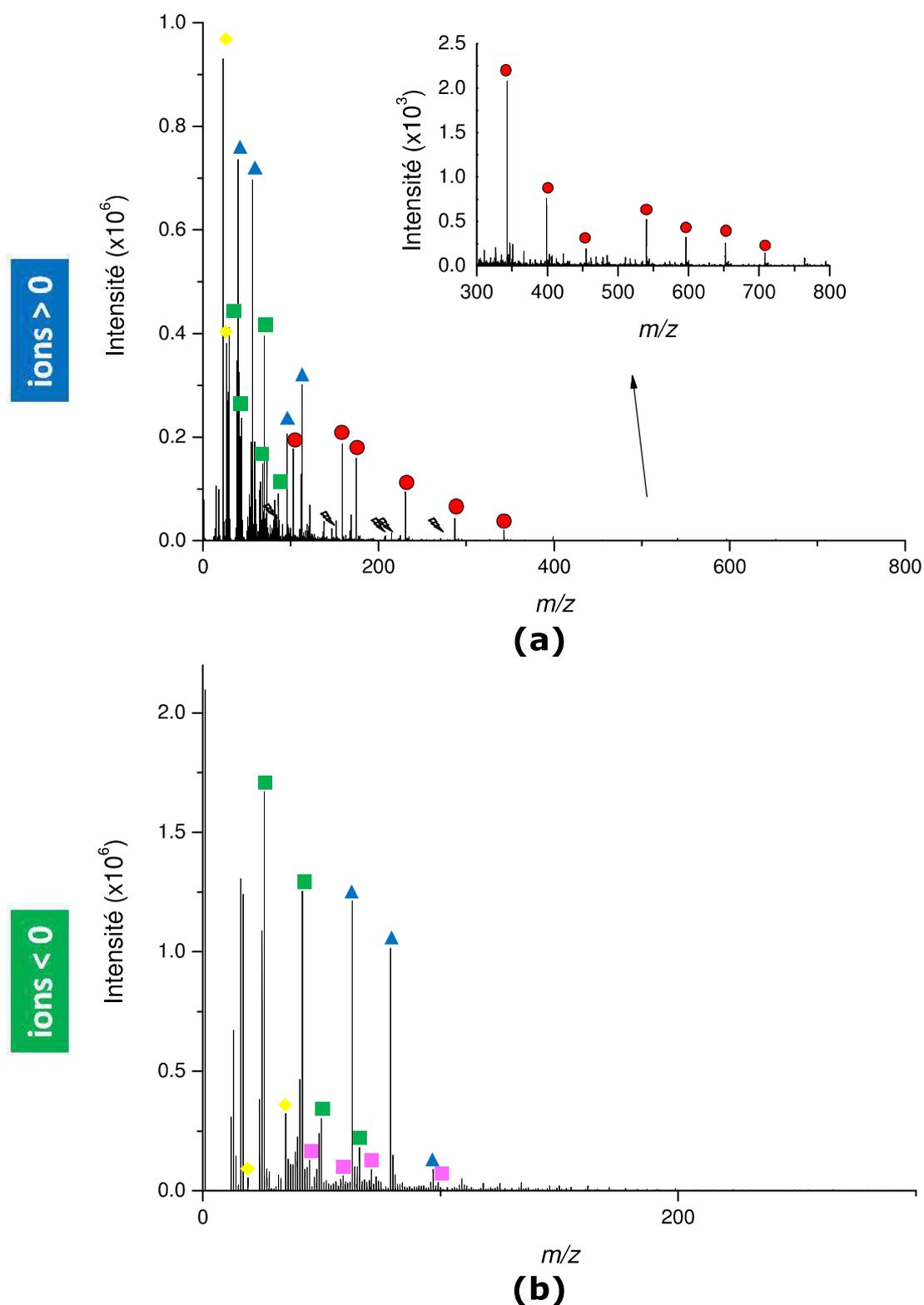


Figure 2-24 : Spectre de l'os en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) ●Ronds rouges : fragments d'hydroxyapatite. ▲ Triangles bleus : ions calcium et hydroxyde de calcium(en positif) et phosphates (en négatif). ■ Carrés verts : fragments protéiques. ◆ Losanges jaunes : ions sodium et potassium (positif) et fluor et chlore (négatif). ■ Carrés magenta : fragments polysaccharides. ▲ Éclairs gris : fragments correspondant à une pollution de type PDMS.

Comme attendu, ces spectres ne présentent pas uniquement des pics correspondant au collagène.

Ainsi, en mode d'ionisation positif, le spectre total, (Figure 2-24 a), présente 3 types de pics, correspondant à :

- la phase minérale de l'os (hydroxyapatite, calcium et autres minéraux),
- la phase organique (signaux protéiques),
- une pollution aux polydiméthylsiloxanes (PDMS).

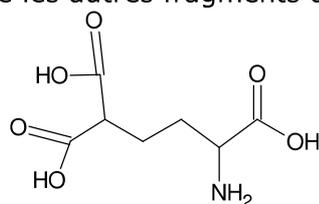
Pour la phase organique, on détecte des fragments d'acides aminés (carrés verts), majoritairement ceux correspondant au collagène (voir paragraphe 2.5.2.2.1) : proline (m/z 70.07), alanine (m/z 44.05), glycine (m/z 30.03) et surtout hydroxyproline (m/z 86.06). Leur répartition spatiale ainsi que celle d'acides aminés plus minoritaires est présentée Figure 2-26. La colocalisation des fragments majoritaires du collagène permet son identification formelle dans la coupe d'os.

Leur localisation dans la coupe est assez homogène. Une distinction entre les cellules d'ostéocytes et les fibres de collagène (Henss, 2011), basée sur les différences de localisation des fragments m/z 44.05 (pour les ostéocytes) et m/z 70.07 (pour les fibres), ne semble pas possible dans notre cas.

Une infime partie de ces signaux protéiques peut correspondre à l'ostéocalcine, autre protéine de nature hormonale. Il s'agit de la protéine la plus abondante dans l'os après le collagène (Carstanjen, 2003). L'ostéocalcine joue un rôle important, comme l'ostéonectine et le collagène I, lors de l'ostéogénèse puisqu'il permet l'association avec l'hydroxyapatite (Weiger, 2010). Cette protéine de 5.8 kDa, possède un acide aminé particulier dans sa composition, l'acide carboxyglutamique (Figure 2-25). Celui-ci (noté Gla) est caractéristique des protéines fixant le calcium et absent de la séquence du collagène mais la signature spectrale de cet acide aminé n'est pas connue en TOF-SIMS.

En mode d'ionisation négatif, le spectre (Figure 2-24 b) est dominé par les pics correspondant à la présence de protéines (ions CN^- , CNO^- , C_3N^- et C_2N_3^-) mais aussi par deux ions phosphates (PO_2^- et PO_3^-). La matrice minérale contient également un peu de fluor (normalement plus abondant dans les os adultes que chez les individus jeunes) ainsi que du chlore (Goffer, 2007). La présence de fragments polysaccharides (CHO_2^- , $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$, $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2^-$ et $\text{C}_4\text{H}_3\text{O}_3^-$) est remarquable. Ces signaux peuvent correspondre aux glycosaminoglycanes (ou mucopolysaccharides) constituant le gel de la matrice osseuse et assurant la cohésion entre les fibres de collagène (Johns, 1977).

La colocalisation des ions présents dans le spectre du collagène (ions fragments de la chaîne polypeptidique) confirme la présence de celui-ci et sa localisation dans la coupe d'os. Cette localisation est identique à celle repérée en mode d'ionisation positif. Les images de la Figure 2-26 présentent la localisation des ions polysaccharides. Les deux premiers sont aussi présents dans le spectre du collagène de référence que j'ai étudié. Ils sont localisés au même endroit que les autres fragments polysaccharides et que les autres fragments du collagène.

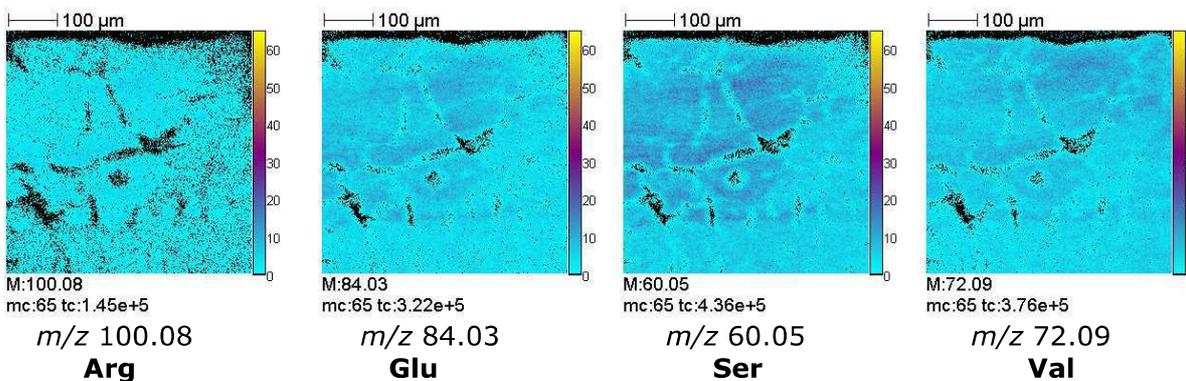
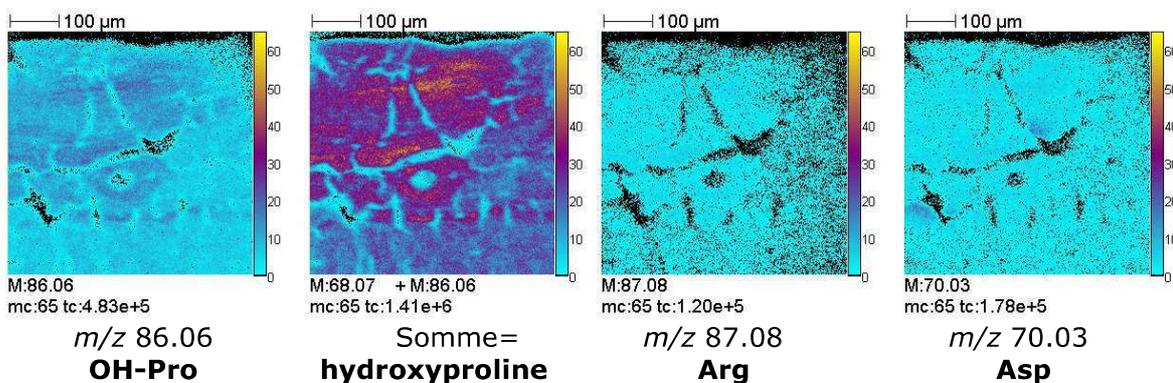
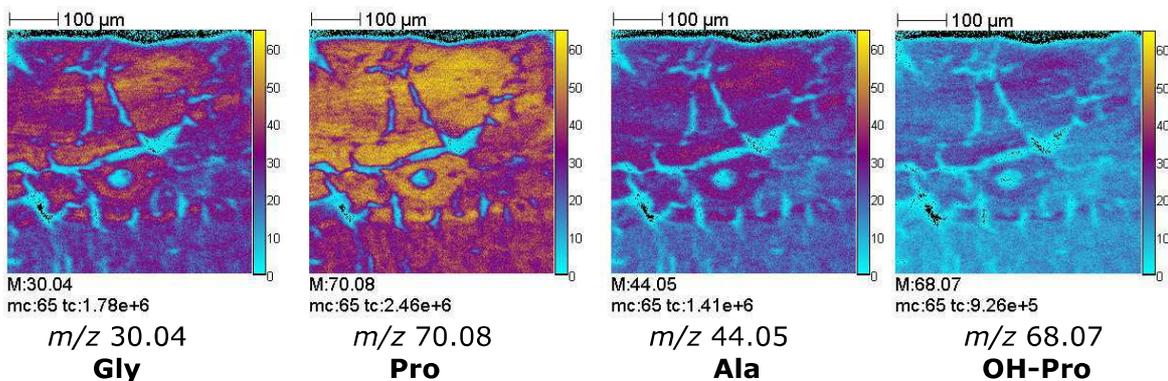


M= 191.14 Da

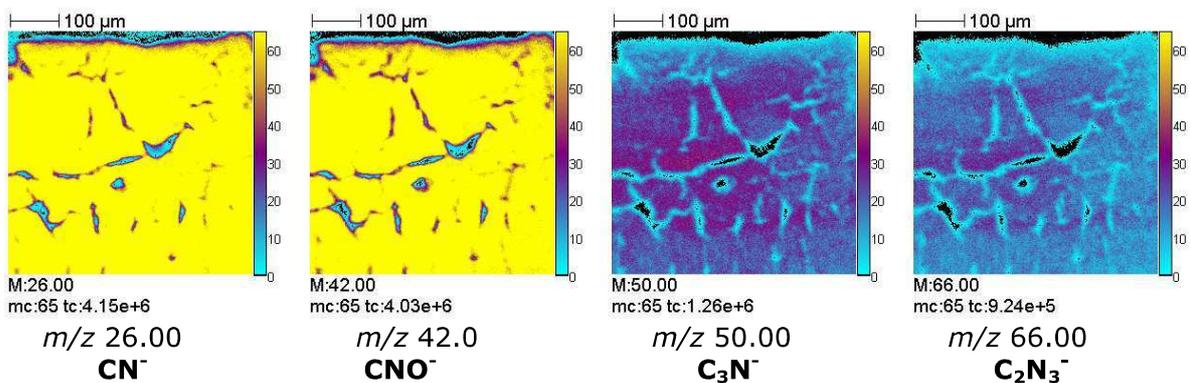
Figure 2-25 : Ostéocalcine : Formule développée de l'acide carboxyglutamique et sa masse moléculaire.

Polypeptides

ions > 0



ions < 0



Polysaccharides

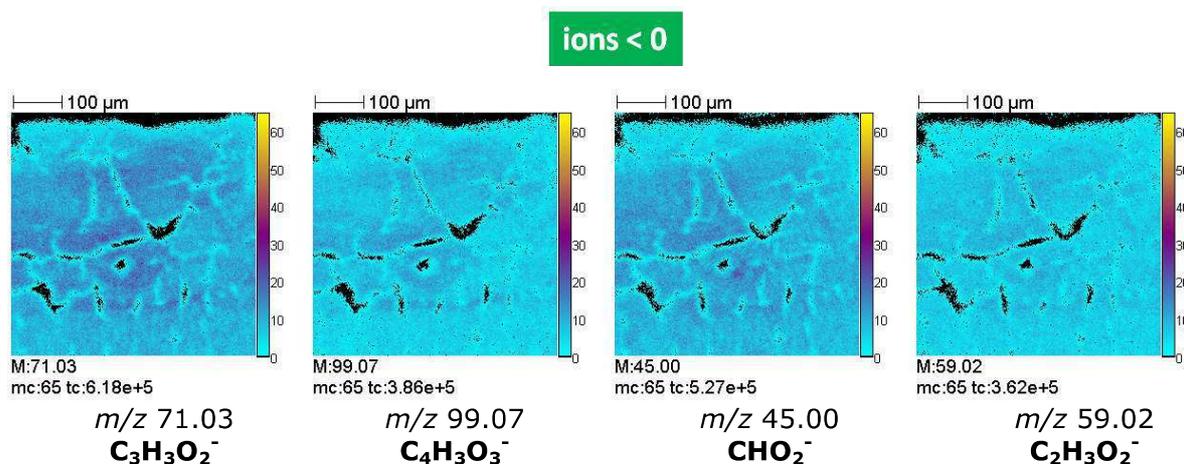


Figure 2-26 : Images d'une coupe d'os moderne : répartition spatiale des différents fragments d'acides aminés en mode d'ionisation positif, des fragments de chaîne polypeptidique et de mucopolysaccharides en mode d'ionisation négatif. Les images ont été normalisées par rapport à l'image la plus intense, correspondant au fragment de la proline en mode d'ionisation positif (m/z 70.07) et au fragment CN^- (m/z 26.00) en mode d'ionisation négatif. Taille de l'image TOF-SIMS : 500 x 500 μm .

2.5.2.4 Étude d'un os ancien

Les tissus biologiques anciens que nous nous proposons d'étudier dans cette thèse sont susceptibles d'avoir subi des modifications et des dégradations au cours du temps (voir paragraphe 1.1). J'ai cherché à savoir si, dans le cas du collagène, la protéine est encore identifiable dans un os ancien.

2.5.2.4.1 Préparation de l'échantillon

L'os ancien étudié ici est une côte de porc, retrouvée parmi un ensemble d'os de porc, dans un des vaisseaux de la flotte du roi Henri VIII, appelé la « Mary Rose ». Ce vaisseau a coulé, dans la Manche, le 19 juillet 1545 au cours d'une bataille contre la flotte de François I^{er} (Bell, 2009). L'os a été daté par ^{14}C AMS à l'ORAU, laboratoire de datation par radiocarbone d'Oxford (Oxford Radiocarbon Accelerator Unit, University of Oxford, United Kingdom-cf (Ramsey, 2004)). L'âge calibré trouvé est (310 +/- 80 BP), ce qui correspond effectivement à la date de naufrage du navire.

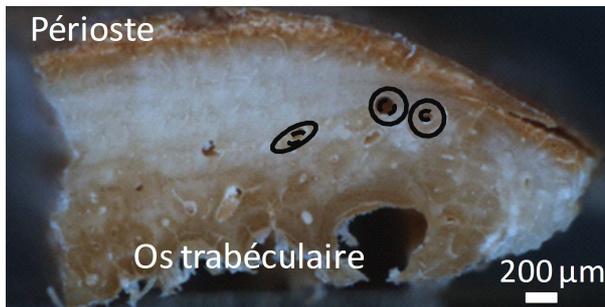
L'os de porc (Figure 2-27 a) a été scié en son milieu, à l'aide d'une scie circulaire diamantée. La section transversale (de 5 mm d'épaisseur) ainsi obtenue (Figure 2-27 b), a été à nouveau sciée. L'aspect général de cet os (Figure 2-27 c) semble indiquer un bon état de conservation (porosité peu importante, présence du périoste, ostéons visibles). Les images MEB ont permis de visualiser des ostéons bien conservés et les ostéocytes présents entre les lamelles (Figure 2-27 f).

Après avoir réduit la taille de coupe à une pyramide tronquée (Figure 2-27 d et e), nous avons réalisé des coupes transverses semi-fines à l'aide d'un ultramicrotome, de 900 nm d'épaisseur.

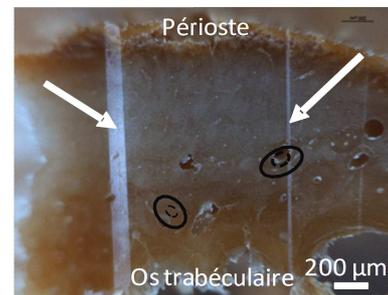


(a)

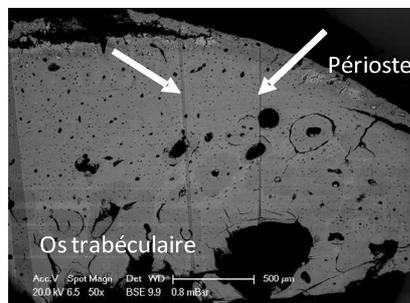
(b)



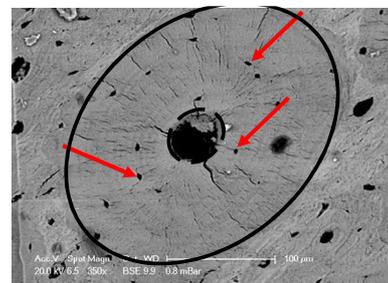
(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 2-27 : (a) Photographie sous loupe binoculaire de l'os de porc ancien étudié. (b) Photographie sous loupe binoculaire de l'échantillon après sciages. (c) Photographie au microscope optique de l'échantillon après la coupe (d) et zoom sur la pyramide tronquée de coupe. Les flèches indiquent les bords de la pyramide tronquée. (e) Images MEB en mode BSE de l'échantillon. Grossissement x 50. (f) et zoom x 350 sur un ostéon de la zone de coupe. Les flèches rouges indiquent les ostéocytes. Les cercles noirs délimitent un ostéon (trait plein) et son canal de Havers (pointillés).

2.5.2.4.2 Évaluation de l'état de dégradation

Moins sujets à une désintégration complète que les tissus mous, les os peuvent être retrouvés partiellement ou complètement préservés après des milliers d'années d'enfouissement. Néanmoins leurs propriétés mécaniques et leurs compositions chimiques peuvent avoir évolué (Aufderheide, 1971).

2.5.2.4.2.1 Causes

Les dégradations subies par les os retrouvés dans un contexte archéologique sont la plupart du temps liées aux conditions environnementales d'enfouissement puis de conservation (Lebon, 2011). Il s'agit souvent de dégradation affectant le matériau de façon hétérogène, ce qui explique l'intérêt de mener des investigations sur la distribution spatiale des composés c'est-à-dire en imagerie chimique : par exemple avec des profils par microPIXE, PIGE ou NRA (Beck, 2012). Les conditions environnementales de température, d'humidité et de variations climatiques au cours du temps jouent un rôle primordial (White, 1983). Il est également important de prendre en compte la nature des micro-organismes présents dans le sol, le pH, l'aération (ou son absence) et la circulation de l'eau.

2.5.2.4.2.2 Dégradation de la structure

À l'échelle histologique, par observation au microscope optique, sous lumière classique, polarisée ou fluorescente, on peut caractériser l'état de conservation de l'os en regardant si les structures hiérarchiques telles que les ostéons ou le système lamellaire sont encore visibles (Hedges, 1995). À ce stade, on estime parfois l'index histologique HI qui classe les os par état de conservation. La porosité ainsi que le caractère cassant de l'échantillon sont aussi des indices précieux (Jans, 2002).

On peut citer quatre types de dégradations microbiennes visibles sur les tissus osseux en microscopie optique et en microscopie électronique (Jans, 2004) :

- des tunnels dits « de Wedl » (du nom du découvreur, 1864) de 5 à 10 µm aux parois calcifiées. Ils sont causés par des champignons.

- des destructions microscopiques localisées dues à l'action de bactéries : de type « linéaires longitudinales », « bourgeonnées » ou « lamellaires ». Ces nouveaux pores sont liés à une déminéralisation de l'os.

Microfissures et inclusions peuvent être une conséquence de ces dégradations mais ne sont pas répertoriées comme des dégradations d'origine microbienne. En effet, les larges fissures proviennent souvent de changements climatiques tandis que les microfissures sont liées au processus de reminéralisation (Jans, 2002).

2.5.2.4.2.3 Dégradation de la matière organique

Plusieurs phénomènes peuvent stabiliser le collagène notamment la réticulation et la minéralisation (calcification). La théorie de l'exclusion enzymatique (Nielsen-Marsh, 2000) décrit une voie plausible de dégradation du collagène dans l'os. Les cristaux d'hydroxyapatite, entourant les fibres de collagène, les protègent physiquement des enzymes, susceptibles de les attaquer. Cette attaque biologique consiste en une autolyse et une dégradation microbienne. Le collagène non protégé

est en revanche digéré. Dès lors, les fibres protégées des attaques biologiques ne subissent qu'une dégradation d'ordre chimique, beaucoup plus lente.

Comme toute protéine, le collagène peut subir une dénaturation, se dissoudre et finir par disparaître. On évalue le degré de préservation du collagène, en spectroscopie infrarouge, à l'aide du rapport collagène/phosphates PO_4^- , calculé à partir des 2 bandes d'absorption, correspondant au collagène (à 1660 cm^{-1}) et aux phosphates (intensité maximale de la bande, entre 1200 et 900 cm^{-1} : cf. Reiche, 2010). La mesure de la quantité d'azote présente dans l'os a également été utilisée pour estimer la quantité de collagène encore présente (Bocherens, 1997).

Les lipides, de même que les acides nucléiques (tel que l'ADN), se dégradent généralement rapidement après l'enfouissement du fait de l'action de micro-organismes (Goffer, 2007).

- *Dégradation de la matière minérale*

Une des modifications les plus courantes de la partie minérale de l'os est la transformation de l'hydroxyapatite en fluoroapatite. Celle-ci résulte de l'incorporation de fluor issu du milieu d'enfouissement dans l'os et la recristallisation en fluoroapatite.

Parfois, d'autres éléments issus du milieu d'enfouissement, comme les carbonates, peuvent être incorporés et diffuser dans la matrice osseuse (Reiche, 1999) ou se déposer dans les nombreux pores (Piga, 2011).

2.5.2.4.3 Identification du collagène

Les spectres sont présentés Figure 2-28 a. On constate qu'ils sont presque identiques à ceux de l'os moderne : mêmes pics et mêmes intensités relatives. La seule différence est visible en mode d'ionisation négatif : le spectre fait apparaître une quantité importante de fluor par rapport à la partie protéique. Ceci correspond probablement à l'incorporation de fluor issu du milieu d'enfouissement de l'os de la Mary Rose.

Afin d'effectuer une quantification relative, j'ai calculé le rapport du fluor sur les phosphates. Ce rapport varie de quelques centièmes dans un os récent à 1 lorsque les hydroxyapatites sont converties intégralement en fluoroapatite. Dans notre cas, j'ai calculé le rapport des aires des pics TOF-SIMS, en mode d'ionisation négatif, correspondant à l'ion fluor (F^- , m/z 19.00) sur la somme des ions phosphates PO_2^- et PO_3^- . Dans tous les cas, la correction de Poisson a été appliquée pour le calcul de l'aire du pic étudié, afin de pallier l'effet des temps morts du système d'acquisition.

Pour l'os moderne étudié au paragraphe 2.5.2.3, on trouve $\frac{A(F^-)}{A(PO_2^- + PO_3^-)} = 0.01$

et pour l'os ancien $\frac{A(F^-)}{A(PO_2^- + PO_3^-)} = 0.09$. Ainsi, la quantité de fluor dans l'os ancien est effectivement légèrement plus importante que dans l'os moderne.

J'ai ensuite cherché à savoir si, parallèlement, la quantité relative de collagène par rapport à la quantité de phosphate de calcium est moins importante dans l'os ancien que dans l'os moderne. Ce rapport est évalué en spectroscopie infrarouge à partir

des 2 bandes d'absorption, correspondant au collagène (à 1660 cm^{-1}) et aux phosphates (intensité maximale de la bande, entre 1200 et 900 cm^{-1}). Pour un os moderne, ce rapport est compris entre 0.8 et 1 tandis qu'il est inférieur si le collagène de l'os est dégradé. Dans notre cas, le rapport des aires des pics correspondants au collagène (fragments des acides aminés majoritaires : glycine, alanine, proline et hydroxyproline) sur la somme des aires des pics correspondants aux phosphates de calcium, a été calculé. Pour l'os moderne, ce rapport vaut 1.3 tandis que je l'ai évalué à 1.0 pour l'os ancien. Ainsi, le rapport calculé à partir de nos données TOF-SIMS, est du même ordre de grandeur qu'en spectroscopie infrarouge et suit la même tendance. Ce résultat a été confirmé lors de l'étude d'un os plus ancien (os humain médiéval, d'apparence très dégradé-Figure 2-29 a) : pour cet os, le rapport des aires des pics du collagène sur celles des hydroxyapatite varie de 0.6 à 0.8 selon des zones de l'os. On constate, en outre, que ce rapport diminue de l'extérieur vers l'intérieur (Figure 2-29 d) ce qui suggère une dégradation du collagène à partir de l'intérieur de l'os. La structure de l'échantillon (Figure 2-29 b) suggère d'ailleurs une attaque microbienne depuis l'os trabéculaire vers l'os compact.

Le rapport dans l'os ancien de la Mary Rose est proche de celui de l'os moderne ce qui indique une bonne conservation du collagène. Une étude en chromatographie a d'ailleurs montré, que le collagène de cet os présentait effectivement une composition en acides aminés proche de celui d'un os frais (Tripp, 2006).

À titre indicatif, le rapport $\frac{A(F^-)}{A(PO_2^- + PO_3^-)}$ a aussi été cartographié pour l'os médiéval: on constate une présence plus importante du côté externe, en contact avec le milieu extérieur, comme on le voit sur la cartographie Figure 2-29 e.

Ainsi l'identité de signature spectrale entre l'os ancien et l'os moderne, corrélée à une diminution relative de la quantité totale de collagène par rapport à la phase minérale, semble en accord avec les études menées sur la diagenèse du collagène dans ce tissu. Selon ces études, la composition en acides aminés du collagène reste en effet très stable tant qu'il reste plus d'1% (en poids) de collagène dans l'os (Dobberstein, 2009).

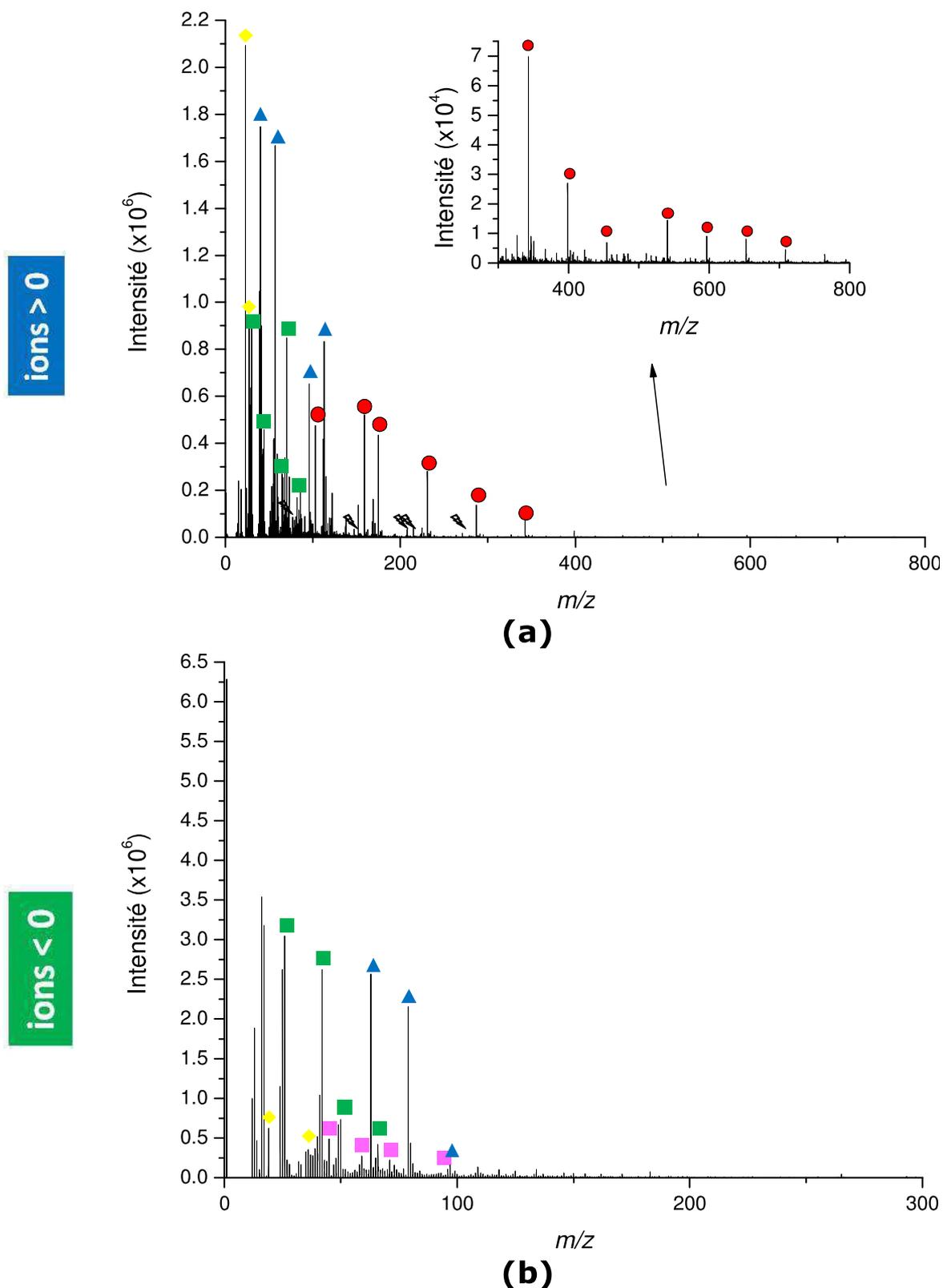


Figure 2-28 : Spectre de l'os ancien en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) ● Ronds rouges : fragments d'hydroxyapatite. ▲ Triangles bleus : ions calcium et hydroxyde de calcium (en positif) et phosphates (en négatif). ■ Carrés verts : fragments protéiques. ◆ Losanges jaunes : ions sodium et potassium (positif) et fluor et chlore (négatif). ■ Carrés magenta : fragments polysaccharides. ▲ Éclairs gris : fragments correspondant à une pollution de type PDMS.

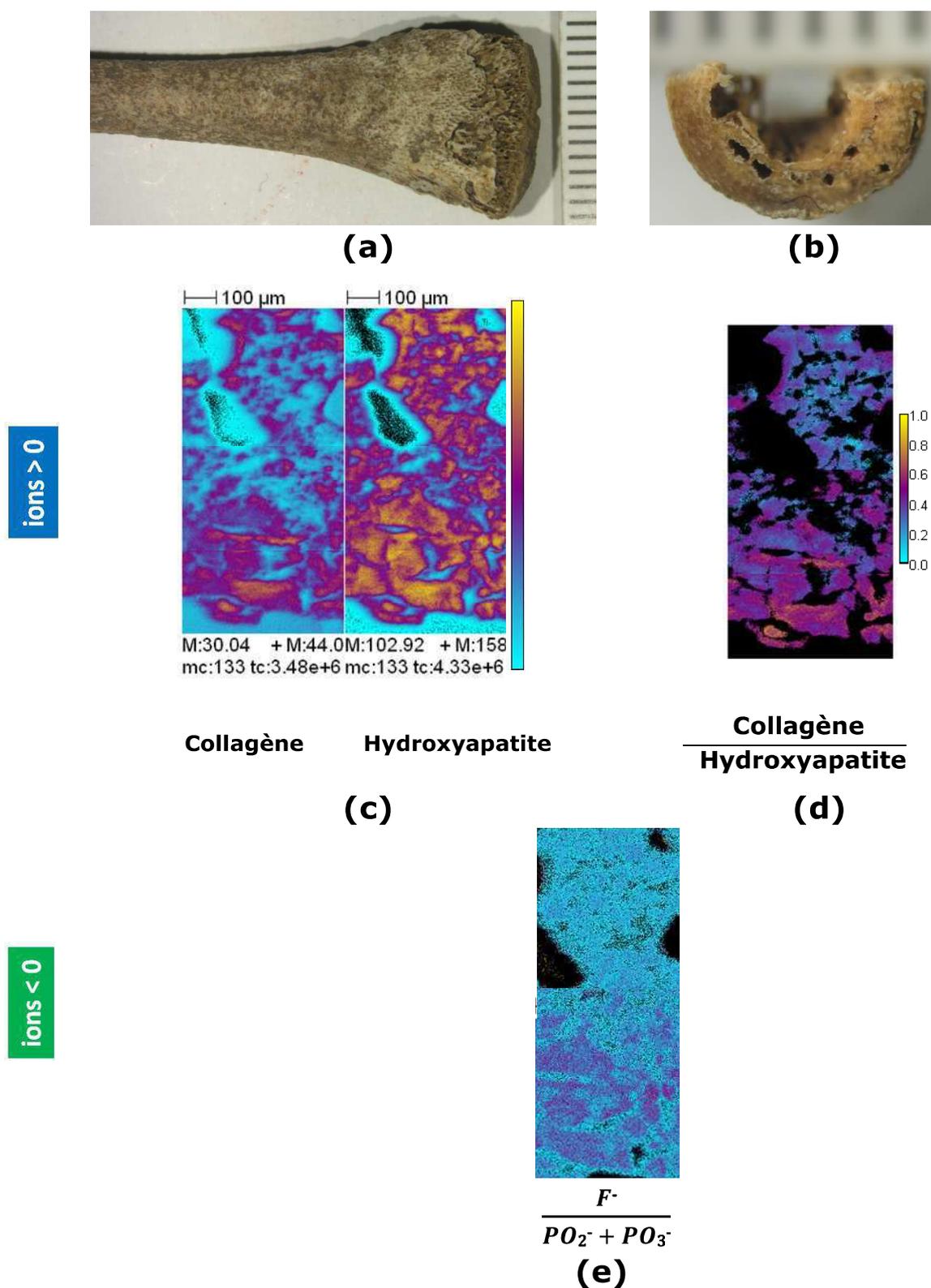


Figure 2-29 : État de dégradation d'un os humain médiéval. (a) Photographie à la loupe binoculaire de l'os étudié et (b) de la section sciée. Chaque graduation de la mire correspond à 1 mm. (c) Image TOF-SIMS de la somme des fragments d'acides aminés (collagène) et d'hydroxyapatite (mode d'ionisation positif). Les images ont été normalisées par rapport à la plus intense. (d) Rapport des images présentées en (c). (e) Rapport des images ioniques correspondant au fluor et aux ions phosphates. Taille des 3 images superposées : 500x500 μm chacune.

2.5.2.5 Stratégies d'analyse des protéines en TOF-SIMS

Comme nous l'avons vu précédemment, les différentes protéines peuvent être distinguées en TOF-SIMS du fait d'éléments de composition discriminante ou de différences de proportion dans leur composition en acides aminés. Ceci suppose alors de disposer d'échantillons de référence dont la signature spectrale pourra être comparée au spectre complexe du tissu. Le calcul de rapports adaptés peut également donner des informations sur l'état de dégradation de la protéine.

Pour pouvoir comparer les proportions relatives d'acides aminés de manière quantitative, il faut cependant pouvoir obtenir des données normalisées. En effet, l'efficacité d'une analyse multivariée dépend, entre autres, de la bonne normalisation des données. À ce prix cependant, des changements de composition difficilement détectables dans les spectres complexes peuvent être mis en évidence et la base de données des fragments correspondant à différentes macromolécules biologiques peut être étendue. On peut citer, par exemple, les travaux récents de Goacher et al. sur les composés du bois de pin (Goacher, 2011).

Dans le cas du TOF-SIMS, il est possible de normaliser les données par rapport à la somme des intensités des pics sélectionnés (Kempson, 2010), par rapport au nombre total de coups dans une expérience, c'est-à-dire à l'intensité ionique totale dans un mode (Pacholski, 2004) ou encore par rapport à un pic donné, dont l'intensité serait supposée constante dans toutes les expériences. Ce choix est très dépendant du type d'échantillon analysé. Ainsi les données d'une expérience très reproductible (même support, mêmes conditions d'analyses, expériences réalisées le même jour avec une source stable) pourront être normalisées par rapport à l'intensité ionique totale. Dans notre cas, l'analyse de tissus, préparés de manière très différente, analysés dans des conditions différentes ne permet pas une telle normalisation. Je me suis donc contentée de comparer les expériences effectuées dans des conditions semblables, en normalisant les données par rapport à l'intensité ionique totale.

Le choix des pics ainsi que le prétraitement des données doivent aussi être effectués avec soin, afin de ne pas induire de biais dans les résultats. Par exemple, le choix d'un pic de basse masse correspondant à un fragment commun à un acide aminé et à l'agent enrobant ferait ressortir des corrélations entre des échantillons potentiellement très différents mais qui auraient été préparés selon le même protocole. De même, le support du tissu analysé est important : en effet, les effets de matrice peuvent favoriser ou non la désorption de certains ions. La présence de certains sels, de sodium en particulier, peut avoir des effets similaires.

L'analyse d'images TOF-SIMS et la recherche de corrélations entre les spectres correspondant aux différents pixels plutôt qu'entre des spectres correspondant à des tissus différents, semblent plus simple de ce point de vue (un seul substrat, une même normalisation). L'étude de Brulet et al. (Brulet, 2010), sur la répartition des lipides de la muqueuse colique, chez des souris saines ou atteintes de la mucoviscidose, offre un exemple très complet d'analyse multivariée sur des images TOF-SIMS, détaillant les paramètres importants à optimiser. Toutefois, l'importante quantité de données à manipuler dans ce cas rend l'opération délicate.

J'ai effectué plusieurs essais d'analyse des données recueillies à la fois sur des tissus et sur des produits de référence à l'aide des logiciels PLS-toolbox 6.7 (Eigenvector Research, Wanatchee, WA) fonctionnant sous MATLAB 2008 (MathWorks, Natick, MA), de Statistica 6 (Statsoft Inc., Tulsa, OK) et de Multi-ion SIMS (Biophy research, Fuveau, France).

Ces analyses, assez lourdes (normalisations, construction de la matrice de données...), n'ont cependant pas permis d'apporter plus d'informations que celles que j'ai pu effectuer « à la main ». Au sein de tissus tels que la peau de momie, kératine et collagène étaient différenciés sur l'image ionique de la coupe.

La mise au point de la méthode dite Gentle-SIMS (ou G-SIMS) au National Physical Laboratory (Gilmore, 2000a) donne de nouvelles perspectives. La combinaison des données issues de 2 spectres correspondant à des conditions de fragmentation différentes (2 sources d'ions primaires) permet de comprendre la structure moléculaire du composé. Les premiers essais montrent qu'il est possible d'explicitier la voie de fragmentation complète d'acides aminés comme la tyrosine ou la valine ainsi que celle de peptides simples (Green, 2008a). Les possibilités d'imagerie pour cette technique sont en cours de développement (Green, 2008b) grâce à l'utilisation d'une double source d'ions primaires manganèse/bismuth.

Bibliographie

A

ARANYOSIOVA, M., STANCIKOVA, M. *et al.* (2011). 'Strontium distribution in bones and tissues of strontium ranelate-administrated rats' *Surface and Interface Analysis* 43(1-2): 306-309.

AUFDERHEIDE, A. C. (2003), *The Scientific Study of Mummies*. Cambridge university press. authors, W. Wilkins, Editor. 1971: Baltimore. 28-46.

AYACHE, J., BEAUNIER, L., BOUMENDIL, J., EHRET, G. *et al.* (2007) *Guide de la préparation des échantillons pour la Microscopie électronique en transmission-Tome1, Méthodologie*. PU Saint-Etienne.

AYOUB, H., LAIR, V. *et al.* (2012). 'Ageing of nickel used as sensitive material for early detection of sudomotor dysfunction' *Applied Surface Science* 258(7): 2724-2731.

B

BADA, J. L., HELFMAN, P. M. (1975) 'Amino acid racemization dating of fossil bones' *World archaeology* 7(2): 160-173.

BALTIMORE, D., LODISH, H. *et al.* (2000). *Biologie moléculaire de la cellule*, De Boeck Université.

BECK, L., CUIF, J.P. *et al.* (2012). 'Checking collagen preservation in archaeological bone by non-destructive studies (Micro-CT and IBA).' *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 273(0): 203-207.

BELL, L. S., THORP, J. A. L., *et al.* (2009) 'The sinking of the Mary Rose warship: a medieval mystery solved?' *Journal of Archaeological Science*, 36 (1), 166-173.

BELU, A. M., GRAHAM, D. J. *et al.* (2003). 'Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces' *Biomaterials* 24(21): 3635-3653.

BENETTI, F., MARCHETTINI, N. *et al.* (2011). 'ToF-SIMS and XPS study of ancient papers.' *Applied Surface Science* 257(6): 2142-2147.

BENQUERBA, M., BRUNELLE, A., *et al.* (1991). "Impact of slow gold clusters on various solids: nonlinear effects in secondary ion emission." *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 62(1): 8-22.

BENNINGHOVEN, A., B. HAGENHOFF, *et al.* (1993). 'Surface ms - probing real-world samples.' *Analytical Chemistry* 65(14): A630-A640.

BEREUTER, T.L., *et al.*(1996). 'Post-mortem alterations of human lipids-part I : evaluation of adipocere formation and mummification by dessication . ' In *The man in ice 3 : Human Mummies.*, Spindler, K.

BICH, C., VIANELLO, S. *et al.* (2012). 'Compatibility between TOF-SIMS lipid imaging and histological staining on a rat brain section.' *Surface and Interface Analysis*, doi: 10.1002/sia.4846.

BIESINGER, M. C., PAEPEGAEY, P. Y. *et al.* (2002). 'Principal component analysis of TOF-SIMS images of organic monolayers.' *Analytical Chemistry* 74(22): 5711-5716.

BOANO, R., FULCHERI, E. *et al.* (2009). 'Neural tube defect in a 4000-year-old Egyptian infant mummy: A case of meningocele from the museum of anthropology and ethnography of Turin (Italy).' *European Journal of Paediatric Neurology* 13(6): 481-487.

BOCHERENS, H. *et al.*(1997) 'Diagenetic evolution of mammal bones in two French Neolithic sites.' *Bulletin de la Société géologique de France* 168, 555-564.

BOLBACH, G., VIARI, A. *et al.* (1992). 'Organic film thickness effect in secondary ion mass-spectrometry and plasma desorption mass-spectrometry.' *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 112(1): 93-100.

BOON, J. J., KEUNE, K. *et al.* (2001). 'Imaging microspectroscopic, secondary ion mass spectrometric and electron microscopic studies on discoloured and partially discoloured smalt in cross-sections of 16th century paintings.' *Chimia* 55(11): 952-960.

BOWES, J. H., ELLIOTT, R. G. *et al.* (1955). 'Composition of collagen and acid-soluble collagen of bovine skin.' *Biochemical Journal* 61(1): 143-150.

BRISSET, F. (2008). *Microscopie électronique à balayage et microanalyses*, EDP Sciences.

BRULET, M., SEYER, A. *et al.* (2010). 'Lipid mapping of colonic mucosa by cluster TOF-SIMS imaging and multivariate analysis in cfr knockout mice.' *Journal of Lipid Research* 51(10): 3034-3045.

BRUNELLE, A., TOUBOUL, D. *et al.* (2005). 'Biological tissue imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry and cluster ion sources.' *Journal of Mass Spectrometry* 40(8): 985-999.

C

CAPRIOLI, R. M., FARMER, T.B *et al.* (1997). 'Molecular imaging of biological samples: Localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS.' *Analytical Chemistry* 69(23): 4751-4760.

CARMINATI, P. (2010). Étude et conservation : problématiques de la restauration d'une momie andine des collections du musée de l'Homme. Mémoire de conservation-restauration. École Supérieure des Beaux-arts de Tours.

CARSTANJEN, B., SULON, J., *et al.* (2003) 'Development and validation of a specific radioimmunoassay for equine osteocalcin'. *Domestic Animal Endocrinology* 24 (1), 31-41.

CAZAUX, J., LEHUEDE, P. (1992). 'Some physical descriptions of the charging effects of insulators under incident particle bombardment.' *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 59(1): 49-71.

CERSOY, S. (2009). Imagerie chimique par ToF-SIMS et patrimoine : Application aux matériaux hybrides dans l'Art et la Beauté. Rapport de stage de M2 Recherche, C2RMF-UMR 171.

CERSOY, S., RICHARDIN, P. *et al.* (2012). 'Cluster TOF-SIMS imaging of human skin remains: analysis of a South-Andean mummy sample.' *Journal of Mass Spectrometry* 47(3): 338-346.

CONLOGUE, G., BECKETT, R. *et al.* (2008). 'Paleoimaging: The Use of Radiography, Magnetic Resonance, and Endoscopy to Examine Mummified Remains.' *Journal of Radiology Nursing* 27(1): 5-13.

CONSTANTINIDES, I., GRITSCH, M. *et al.* (2001). 'Microstructural characterisation of five simulated archaeological copper alloys using light microscopy, scanning electron microscopy, energy dispersive X-ray microanalysis and secondary ion mass spectrometry.' *Analytica Chimica Acta* 440(2): 189-198.

COTTE, M. (2004). Développement de la microscopie infrarouge avec rayonnement synchrotron pour l'étude des pratiques pharmaceutiques anciennes : exemple des emplâtres de plomb et des tissus humains. Thèse de doctorat de l'université Paris 6.

COTTE, M., WALTER, P. *et al.* (2005). 'Studying skin of an Egyptian mummy by infrared microscopy.' *Vibrational Spectroscopy* 38(1-2): 159-167.

D

DALLONGEVILLE, S., KOPERSKA, M. *et al.* (2011). 'Identification of Animal Glue Species in Artworks Using Proteomics: Application to a 18th Century Gilt Sample.' *Analytical Chemistry* 83(24): 9431-9437.

DAUPHIN, Y., BRUNELLE, A. *et al.* (2010). 'A Layered Structure in the Organic Envelopes of the Prismatic Layer of the Shell of the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera* (Mollusca, Bivalvia).' *Microscopy and Microanalysis* 16(1): 91-98.

DAVID, A. R. (1997). 'Disease in Egyptian mummies: the contribution of new technologies.' *The Lancet* 349(9067): 1760-1763.

DEBOIS, D., BRUNELLE, A. *et al.* (2007). 'Attempts for molecular depth profiling directly on a rat brain tissue section using fullerene and bismuth cluster ion beams.' *International Journal of Mass Spectrometry* 260(2-3): 115-120.

DELCORTE, A., BEFAHY, S., *et al.* (2004) 'Improvement of metal adhesion to silicone films: a TOF-SIMS study', *Adhesion Aspects of Thin Films* 2, 1-12.

DELALLEAU A. Analyse du comportement mécanique de la peau in vivo. Thèse de doctorat, Université Jean Monnet de Saint-Etienne, 2007.

DERRICK M., SOUZA L., *et al.* (1994), 'Embedding paint cross-section samples in polyester resins: problems and solutions', *Journal of the American Institute for Conservation*, 33, 227-245.

DICKINSON, M., HEARD, P. J. *et al.* (2006). 'Dynamic SIMS analysis of cryo-prepared biological and geological specimens.' *Applied Surface Science* 252(19): 6793-6796.

DOBBERSTEIN, R., COLLINS, M. *et al.* (2009). 'Archaeological collagen: Why worry about collagen diagenesis?' *Archaeological and Anthropological Sciences* 1(1): 31-42.

DOWSETT, M., ADRIAENS A. (2004). 'Role of SIMS in cultural heritage studies.' *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* 226(1-2): 38-52.

DUCKWORTH, C. N., HENDERSON, J. *et al.* (2012). 'Opacifiers in Late Bronze Age glasses: the use of ToF-SIMS to identify raw ingredients and production techniques.' *Journal of Archaeological Science* 39(7): 2143-2152.

DURIGON, M., CACCALDI, P.F., *et al.* (1985). 'Etudes histopathologiques de l'effet du rayonnement gamma' In Balout, L., Roubet, C. (1985). La momie de Ramsès II - Contribution scientifique à l'égyptologie, édition Recherches sur les Civilisations.

DUTEIL, S., GAREIL, P. *et al.* (1999). 'Identification of heparin oligosaccharides by direct coupling of capillary electrophoresis/ion-spray-mass spectrometry.' *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 13(19): 1889-1898.

E

EL MAGHRABY, G. M., BARRY, B. W., *et al.* (2008) Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 34(4-5), 203-222.

F

FARDIM, P., HOLMBOM, B. (2005) 'ToF-SIMS imaging: a valuable chemical microscopy technique for paper and paper coatings.' *Applied Surface Science* 249(1-4): 393-407.

FARRE, B., A. BRUNELLE, *et al.* (2011). 'Shell layers of the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*: Matching microstructure and composition.' *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 159(3): 131-139.

FRASER, R. D. B., MACRAE, T.P. *et al.* (1972). Keratins: their composition, structure, and biosynthesis, Thomas.

FULCHERI, E., (1996). 'Mummies of Saints : a particular category of Italian mummies.' In The man in ice 3: Human Mummies., Spindler, K.

G

GILMORE, I. S., SEAH, M.P. (2000a). 'Static SIMS: towards unfragmented mass spectra - the G-SIMS procedure.' *Applied Surface Science* 161(3-4): 465-480.

GILMORE, I. S., SEAH, M.P. (2000b). 'Ion detection efficiency in SIMS: Dependencies on energy, mass and composition for microchannel plates used in mass spectrometry.' *International Journal of Mass Spectrometry* 202(1-3): 217-229.

GILMORE, I. S., SEAH, S.P. (2002). 'Electron flood gun damage in the analysis of polymers and organics in time-of-flight SIMS.' *Applied Surface Science* 187(1-2): 89-100.

GOACHER, R. E., JEREMIC, D. *et al.* (2011). 'Expanding the Library of Secondary Ions That Distinguish Lignin and Polysaccharides in Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Analysis of Wood.' *Analytical Chemistry* 83(3): 804-812.

GOFFER, Z. (2007). *Archaeological Chemistry*, Wiley-Interscience.

GOTLIV, B. A., ROBACH, J. S. *et al.* (2006). 'The composition and structure of bovine peritubular dentin: Mapping by time of flight secondary ion mass spectroscopy.' *Journal of Structural Biology* 156(2): 320-333.

GRAHAM, D. J., WAGNER, M.S. *et al.* (2006). 'Information from complexity: Challenges of TOF-SIMS data interpretation.' *Applied Surface Science* 252(19): 6860-6868.

GREEN, F. M., GILMORE, I.S. *et al.* (2008a). 'G-SIMS and SMILES: Simulated fragmentation pathways for identification of complex molecules, amino acids and peptides.' *Applied Surface Science* 255(4): 852-855.

GREEN, F. M., KOLLMER, F. *et al.* (2008b). 'Imaging G-SIMS: a novel bismuth-manganese source emitter.' *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22(16): 2602-2608.

GUAZZOTTI, S. A., SUESS, D.T., *et al.* (2003). 'Characterization of carbonaceous aerosols outflow from India and Arabia: Biomass/biofuel burning and fossil fuel combustion.' *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* 108(D15).

GUILLOT, D., (2005). 'La momie de sa confection a son utilisation.' *Histoire de la Pharmacie*.

H

HARDY, J. G., SCHEIBEL, T. R. (2010) 'Composite materials based on silk proteins.' *Progress in Polymer Science*, 35 (9), 1093-1115.

HASHIMOTO, H., NAKAMURA, K., *et al.* (2004) 'Quantitative TOF-SIMS imaging of DNA microarrays produced by bubble jet printing technique and the role of TOF-SIMS in life science industry.' *Applied Surface Science* 231, 385-391.

HEDGES, R. E. M., MILLARD, A. R., *et al.* (1995) 'Measurements and Relationships of Diagenetic Alteration of Bone from Three Archaeological Sites.' *Journal of Archaeological Science* 22 (2), 201-209.

HENNEN, G. (2001). *Biochimie 1er cycle. Cours et questions de révision, 3ème édition*, Dunod.

HENß, A., ROHNKE, M., *et al.* (2011) 'TOF-SIMS Analysis of Osteoporotic Bones and New Implant Materials for Osteoporosis Patients', 18th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS XVIII, Riva del Garda, Italie, 18-23 Sept. 2011.

DE HOFFMANN, E., STROOBANT, V. (2005). *Spectrométrie de masse*, Dunod.

HOLLEMEYER, K., ALTMAYER, W. *et al.* (2008). 'Species identification of Oetzi's clothing with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry based on peptide pattern similarities of hair digests.' *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22(18): 2751-2767.

HOPSTAKEN, M. J. P., PFEIFFER, D. *et al.* (2012). 'Physical characterization of sub-32-nm semiconductor materials and processes using advanced ion beam-based analytical techniques.' *Surface and Interface Analysis*, doi: 10.1002/sia.4916.

J

JANS, M. M. E., KARS, H., *et al.* (2002) 'In-situ preservation of archaeological bone: A histological study within a multidisciplinary approach.' *Archaeometry* 44, 343-352.

JANS, M. M. E., NIELSEN-MARSH, C. M., *et al.* (2004) 'Characterisation of microbial attack on archaeological bone.' *Journal of Archaeological Science* 31(1), 87-95.

JAUZEIN, V., COLOMBAN, P. (2009) *Types, structure and mechanical properties of silk*. Woodhead Publ Ltd: Cambridge, Vol. 91, 144-178.

JIT, I., SEHGAL, S. *et al.* (2001). 'An Indian mummy: a case report.' *Forensic Science International* 117(1-2): 57-63.

JOHNS, P., (1977). The structure and components of collagen containing tissues. In: Ward, A.G., Cours, A. (Eds.), *The Science and Technology of Gelatin*. Academic Press, London, 31-72.

JONES, E. A., FLETCHER, J. S. *et al.* (2006). 'ToF-SIMS analysis of bio-systems: Are polyatomic primary ions the solution?' *Applied Surface Science* 252(19): 6844-6854.

K

KANITAKIS, J. (2002) 'Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal skin.' *European Journal of Dermatology* 12(4), 390-401.

KATZENBERG, M., HARRISON, R. (1997) 'What's in a bone? Recent advances in archaeological bone chemistry.' *Journal of Archaeological Research* 5 (3), 265-293.

KEMPSON, I. M., SKINNER, W. M. *et al.* (2003). 'Time-of-flight secondary ion mass spectrometry analysis of hair from archaeological remains.' *European Journal of Mass Spectrometry* 9(6): 589-597.

KEMPSON, I. M., MARTIN, A.L. *et al.* (2010). 'Detecting the Presence of Denatured Human Serum Albumin in an Adsorbed Protein Monolayer Using TOF-SIMS.' *Langmuir* 26(14): 12075-12080.

KEUNE, K., BOON, J.J. (2004a). 'Enhancement of the static SIMS secondary ion yields of lipid moieties by ultrathin gold coating of aged oil paint surfaces.' *Surface and Interface Analysis* 36(13): 1620-1628.

KEUNE, K., BOON, J.J. (2004b). 'Imaging secondary ion mass spectrometry of a paint cross section taken from an early Netherlandish painting by Rogier van der Weyden.' *Analytical Chemistry* 76(5): 1374-1385

KEUNE, K., BOON, J.J. (2005). 'Analytical imaging studies clarifying the process of the darkening of vermilion in paintings.' *Analytical Chemistry* 77(15): 4742-4750.

KEUNE, K., BOON, J.J. (2007). 'Analytical imaging studies of cross-sections of paintings affected by lead soap aggregate formation.' *Studies in Conservation* 52(3): 161-176.

KEUNE, K., HOOGLAND, F. *et al.* (2009). 'Evaluation of the 'added value' of SIMS: A mass spectrometric and spectroscopic study of an unusual Naples yellow oil paint reconstruction.' *International Journal of Mass Spectrometry* 284(1-3): 22-34.

KIERSZENBAUM, A. L., VALIDIRE-CHARPY, P., *et al.* (2006). Histologie et biologie cellulaire : Une introduction à l'anatomie pathologique, De Boeck.

KILLIAN, M. S., KREBS, H.M. *et al.* (2011). 'Protein Denaturation Detected by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry.' *Langmuir* 27(12): 7510-7515.

KOLLMER, F. (2004). 'Cluster primary ion bombardment of organic materials.' *Applied Surface Science* 231: 153-158.

KRONICK, P. L., COOKE, P. (1996). 'Thermal stabilization of collagen fibers by calcification.' *Connective Tissue Research* 33(4): 275-282.

L

LEBON, M., MULLER, K., *et al.* (2011) 'Imaging fossil bone alterations at the microscale by SR-FTIR microspectroscopy' *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26 (5), 922-929.

LEE, Y., LEE, J., *et al.* (2008). 'Investigation of natural dyes and ancient textiles from Korea using TOF-SIMS.' *Applied Surface Science* 255(4): 1033-1036.

LEFEVRE, T., ROUSSEAU, M.E., *et al.* (2007). 'Protein secondary structure and orientation in silk as revealed by Raman spectromicroscopy.' *Biophysical Journal* 92(8): 2885-2895.

LEHUEDE, P. (1984). 'SIMS analysis of insulating materials using an electron-gun.' *Journal De Microscopie Et De Spectroscopie Électroniques* 9(6): 507-511.

LEHUEDE, P., ROUSSEAU, J.L. *et al.* (1987). 'Essais en autoclave de flacons de verre a usage pharmaceutique.' *Analytica Chimica Acta* 201(0): 145-151.

LHOEST, J. B., WAGNER, M. S., *et al.* (2001) 'Characterization of adsorbed protein films by time of flight secondary ion mass spectrometry'. *Journal of Biomedical Material Research*. 57 (3), 432-440.

M

MALMBERG, P., BEXELL, U., *et al.* (2007) 'Analysis of bone minerals by time-of-flight secondary ion mass spectrometry: a comparative study using monoatomic and cluster ions sources'. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 21 (5), 745-749.

MARSH, R. E, COREY, R.B., *et al.* (1955). 'The structure of Tussah Silk Fibroïn (with a note on the structure of bêta-poly-alanine).' *Acta Crystallographica*. 8: 710-715.

MAYER, B. X., REITER, S. *et al.* (1997). 'Investigation of the triacylglycerol composition of iceman's mummified tissue by high-temperature gas chromatography.' *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 692(1): 1-6.

MAZEL, V., RICHARDIN, P., *et al.* (2006a) 'Chemical imaging techniques for the analysis of complex mixtures: New application to the characterization of ritual matters on African wooden statuettes.' *Analytica Chimica Acta* 570 (1), 34-40.

MAZEL, V. (2006b). Analyse par imagerie chimique de mélanges hybrides : les patines rituelles de la statuaire dogon. Thèse de doctorat de l'université Paris 6.

MAZEL, V., P. RICHARDIN, *et al.* (2007). 'Identification of Ritual Blood in African Artifacts Using TOF-SIMS and Synchrotron Radiation Microspectroscopies.' *Analytical Chemistry* 79(24): 9253-9260.

MAZEL, V., RICHARDIN, P. (2009) 'TOF-SIMS Study of Organic Materials in Cultural Heritage: Identification and Chemical Imaging' In *Organic mass spectrometry in art and archaeology*, Eds: M. P. Colombini, F. Modugno, Wiley, 433-457.

MAZEL, V., P. RICHARDIN, *et al.* (2010). 'Animal urine as painting materials in African rock art revealed by cluster ToF-SIMS mass spectrometry imaging.' *Journal of Mass Spectrometry* 45(8): 944-950.

MCCONNELL, D. (1965). 'Crystal chemistry of hydroxyapatite: Its relation to bone mineral.' *Archives of Oral Biology* 10(3): 421-431.

MEKOTA, A. M., VERMEHREN, M. (2005). 'Determination of optimal rehydration, fixation and staining methods for histological and immunohistochemical analysis of mummified soft tissues.' *Biotechnic & Histochemistry* 80(1): 7-13.

MERIAUX, C., ARAFAH, K. *et al.* (2011). 'Multiple Changes in Peptide and Lipid Expression Associated with Regeneration in the Nervous System of the Medicinal Leech.' *Plos One* 6(4).

MILLS, J. S., WHITE, R. (1999). *The organic chemistry of museum objects*, Butterworth-Heinemann.

MÖLLER, K., JANSSON, A. *et al.* (2003) 'Analysis of polymer oxidation using $^{18}\text{O}_2$ and TOF-SIMS.' *Polymer Degradation and Stability* 80(2): 345-352.

MOULHERAT, C., MOHEN, J.-P. *et al.* (2001). *Archéologie des textiles protohistoriques : exemple de la Gaule celtique*. Thèse de doctorat de l'université Panthéon-Sorbonne, Paris.

N

NEWMAN, G. R. (1987) 'Use and abuse of LR-White'. *Histochemical Journal* 19 (2), 118-120.

NIELSEN-MARSH, C. M., HEDGES, R. E. M., *et al.* (2000) 'A preliminary investigation of the application of differential scanning calorimetry to the study of collagen degradation in archaeological bone.' *Thermochimica Acta* 365 (1-2), 129-139.

NISHIKAWA, M., KATAGI, M., MIKI, A., TSUCHIHASHI, H. (2003) 'Forensic toxicological determination of surfactant by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry.' *Journal of Health Science* 49 (2), 138-148.

NUNN, J. F. (2002). *Ancient Egyptian Medicine*, University of Oklahoma Press.

O

ODLAND, G.F. (1971) Histology and fine structure of the epidermis, In *The skin: by 30 authors*, W. Wilkins, Editor.: Baltimore. 28-46

P

PÄÄBO, S. (1985) 'Preservation of DNA in ancient Egyptian mummies.' *Journal of Archaeological Science* 12(6): 411-417.

PACHOLSKI, M. L. (2004). 'Principal component analysis of TOF-SIMS spectra, images and depth profiles: an industrial perspective.' *Applied Surface Science* 231: 235-239.

PALMQUIST, A., EMANUELSSON, L. *et al.* (2012). 'Chemical and structural analysis of the bone-implant interface by TOF-SIMS, SEM, FIB and TEM: Experimental study in animal.' *Applied Surface Science* 258(17): 6485-6494.

PARK, J.-W., SHON, H.K. *et al.* (2008) 'Differentiation between human normal colon mucosa and colon cancer tissue using ToF-SIMS imaging technique and principal component analysis.' *Applied Surface Science* 255(4): 1119-1122.

PAULING, L., COREY, R.B. (1951). 'Configuration of polypeptide chains.' *Nature* 168(4274): 550-551.

PERCHEC, P. L. (1994). Les molécules de la beauté, de l'hygiène et de la protection: une introduction à la science cosmétologique, Nathan.

PIGA, G., SANTOS-CUBEDO, A., *et al.* (2011) 'A multi-technique approach by XRD, XRF, FT-IR to characterize the diagenesis of dinosaur bones from Spain.' *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 310 (1-2), 92-107.

PLESTERS, J. (1956). 'Cross-sections and chemical analysis of paint samples.' *Studies in Conservation* 2:110-57.

PODTELEJNIKOV, A. V., MANN, M. (2002). 'Identification of yeast proteins by mass spectrometry. Methods' In *Enzymology*. G. R. F. Christine Guthrie, Academic Press. Volume 351: 296-321.

POLEUNIS, C., EVERAERT, E.P. *et al.* (2006). 'Characterisation of human hair surfaces by means of static ToF-SIMS: A comparison between Ga⁺ and C-60(+) primary ions.' *Applied Surface Science* 252(19): 6761-6764.

PRINCE, R. L., DRAPER, C. (2000) Chapter 19 - Bone and Calcium. In *Menopause*, Rogerio A. Lobo, J. K., Robert, M., Eds. Academic Press: San Diego, pp 287-II.

PROKSCH, E., FÖLSTER-HOLST, R., *et al.* (2006) 'Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema.' *Journal of Dermatological Science* 43(3), 159-169.

PROST-SQUARCIONI, C. (2006) 'Histologie de la peau et des follicules pileux.' *MS-Medical Science* 22(2), 131-137.

R

RAMACHANDRAN, G. N., KARTHA, G. (1955). 'Structure of collagen.' *Nature* 176(4482): 593-595.

RAMSEY, C. B., HIGHAM, T., *et al.* (2004) 'Improvements to the pretreatment of bone at Oxford.' *Radiocarbon* 46 (1), 155-163.

RAWN, J. D. (1990). *Traité de biochimie*, Ed. universitaires.

REICHE, I., FAVRE-QUATTROPANI, L., *et al.* (1999) 'Trace element composition of archaeological bones and postmortem alteration in the burial environment.' *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* 150 (1-4), 656-662.

REICHE, I., LEBON, M., *et al.* (2010) 'Microscale imaging of the preservation state of 5,000-year-old archaeological bones by synchrotron infrared microspectroscopy.' *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (6), 2491-2499.

REY, C., COMBES, C., *et al.* (2006) 'Chemical diversity of apatites', *Advances in Science and Technology* 49, 27-36.

RICHARDIN, P., MAZEL, V. *et al.* (2011a) 'Identification of Different Copper Green Pigments in Renaissance Paintings by Cluster-TOF-SIMS Imaging Analysis.' *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 22(10): 1729-1736.

RICHARDIN P., GANDOLFO N. (2011b). Datation par le carbone-14 d'échantillons de charbons de bois et d'os provenant du site de Paykend, situé au sud-ouest de l'oasis de Boukhara en Ouzbékistan, N° C2RMF 69779 à C2RMF 69790 –Rapport interne- 20609.

S

SAITO, K., T. MITSUTANI, *et al.* (2008). 'Discriminating the indistinguishable sapwood from heartwood in discolored ancient wood by direct molecular mapping of specific extractives using time-of-flight secondary ion mass spectrometry.' *Analytical Chemistry* 80(5): 1552-1557.

SANNI, O. D., WAGNER, M. S., *et al.* (2002) Classification of adsorbed protein static ToF-SIMS spectra by principal component analysis and neural networks. *Surface and Interface Analysis* 33 (9), 715-728.

SANYOVA, J., CERSONY, S., *et al.* (2011). 'Unexpected Materials in a Rembrandt Painting Characterized by High Spatial Resolution Cluster-TOF-SIMS Imaging.' *Analytical Chemistry* 83(3): 753-760.

SANYOVA, J., (2001) Contribution à l'étude de la structure et des propriétés des laques de garance Doctorat en sciences appliquées F507 - Faculté des sciences appliquées - Chimie - Université Libre de Bruxelles

SARAVANAN, D. (2006). 'Spider silk - Structure, properties and spinning.' *Journal of Textile and Apparel, Technology and Management* 5(1): 1-20.

SCHROEDER, W. A., KAY, L. M, *et al.*(1955) 'The Amino Acid Composition of Bombyx mori Silk Fibroin and of Tussah Silk Fibroin.' *Journal of the American Chemical Society* 177 (14), 3908-3913.

SCHWEITZER, M. H., AVCI, R. *et al.* (2008). 'Microscopic, chemical and molecular methods for examining fossil preservation.' *Comptes Rendus Palevol* 7(2-3): 159-184.

SEYER, A., EINHORN, J. *et al.* (2010). 'Localization of Flavonoids in Seeds by Cluster Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Imaging.' *Analytical Chemistry* 82(6): 2326-2333.

SHIN, D. H., CHOI, Y.H. *et al.* (2003). 'Radiological analysis on a mummy from a medieval tomb in Korea.' *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 185(4): 377-382.

SILJESTRÖM, S., J. LAUSMAA, *et al.* (2011). 'Structural effects of C60+ bombardment on various natural mineral samples — Application to analysis of organic phases in geological samples.' *Applied Surface Science* 257(21): 9199-9206.

SODHI, R. N. S. (2004). 'Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS): versatility in chemical and imaging surface analysis.' *Analyst* 129(6): 483-487.

SOSNIK, A., SODHI, R. N. S., *et al.* (2006) 'Surface study of collagen/poloxamine hydrogels by a 'deep freezing' ToF-SIMS approach.' *Biomaterials* 27 (11), 2340-2348.

SOTTON, M. (1985) Textiles et doublages : Des fibres textiles naturelles. *Conservation-Restauration*, 11, 7.

SPENGLER, B., COTTER, R.J. (1990). 'Ultraviolet-laser desorption ionization mass-spectrometry of proteins above 100000 daltons by pulsed ion extraction time-of-flight analysis.' *Analytical Chemistry* 62(8): 793-796.

STEVENS, A., LOWE, J. (1997) Histologie humaine. De Boeck Université.

STOECKLI, M., CHAURAND, P. *et al.* (2001). 'Imaging mass spectrometry: A new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues.' *Nature Medicine* 7(4): 493-496.

STUART, B., ANDO, D.J. (1997) Biological applications of infrared spectroscopy, Published on behalf of ACOL (University of Greenwich) by John Wiley.

STÜCKER, M., BECHARA, F.G. *et al.* (2001). 'What happens to skin after 2000 years in a bog?' *Hautarzt* 52(4):316.

SWANSON, J. R., MELTON, J.L. (1996) Anatomy and histology of Normal Skin. Loyola University Press: Chicago.

T

TAHALLAH, N., BRUNELLE, A. *et al.* (2008). 'Lipid mapping in human dystrophic muscle by cluster-time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging.' *Journal of Lipid Research* 49(2): 438-454.

TOKAREVA, E. N., FARDIM, P. *et al.* (2007). 'Imaging of wood tissue by ToF-SIMS: Critical evaluation and development of sample preparation techniques.' *Applied Surface Science* 253(18): 7569-7577.

TORRISI, A., TUCCITTO, N. *et al.* (2008). 'ToF-SIMS characterization of fluoroalkyl derivatives of possible interest as water repellent for stone protection.' *Applied Surface Science* 255(4): 1527-1530.

TOUBOUL, D., KOLLMER, F. *et al.* (2005). 'Improvement of biological time-of-flight-secondary ion mass spectrometry imaging with a bismuth cluster ion source.' *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 16(10): 1608-1618.

TOUBOUL, D. (2006). Imagerie biologique par spectrométrie de masse. Aspects fondamentaux, méthodologies et applications. Thèse de doctorat de l'université d'Evry-Val d'Essonne.

TOUBOUL, D., LAPREVOTE, O. *et al.* (2011). 'Micrometric molecular histology of lipids by mass spectrometry imaging.' *Current Opinion in Chemical Biology* 15(5): 725-732.

TRIPP, J. A., MCCULLAGH, J. S. O, *et al.* (2006) 'Preparative separation of underivatized amino acids for compound-specific stable isotope analysis and radiocarbon dating of hydrolyzed bone collagen.' *Journal of Separation Science*. 29 (1) : 41-48.

V

VAN DER WERF, I. D., CALVANO, C.D. *et al.* (2012). 'A simple protocol for Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) analysis of lipids and proteins in single microsamples of paintings.' *Analytica Chimica Acta* 718: 1-10.

VAN HAM, R., VAN VAECK, L. *et al.* (2005). 'Feasibility of analyzing molecular pigments in paint layers using TOF S-SIMS.' *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 383(6): 991-997.

VAN HAM, R., VAN VAECK, L., *et al.* (2006) 'Static secondary ion mass spectrometry (S-SIMS) for the characterization of surface components in mineral particulates.' *Talanta* 69(1) : 91-96.

VICKERMAN, J. C., BRIGGS, D. (2001). ToF-SIMS: surface analysis by mass spectrometry, IM.

W

WAGNER, M. S., TYLER, B. J. *et al.* (2002). 'Interpretation of static time-of-flight secondary ion mass spectra of adsorbed protein films by multivariate pattern recognition.' *Analytical Chemistry* 74(8): 1824-1835.

WAGNER, M. S., CASTNER, D. G., (2004) 'Analysis of adsorbed proteins by static time-of-flight secondary ion mass spectrometry'. *Applied Surface Science* 231, 366-376.

WALTER, P., WELCOMME, E. *et al.* (2006). 'Early use of PbS nanotechnology for an ancient hair dyeing formula.' *Nano Letters* 6(10): 2215-2219.

WEIGER, M. C., PARK, J. J., *et al.* (2010) 'Quantification of the binding affinity of a specific hydroxyapatite binding peptide.' *Biomaterials* 31 (11), 2955-2963.

WHITE, E. M., HANNUS, L. A. (1983) 'Chemical Weathering of Bone in Archaeological Soils', *American Antiquity* 48(2) : 316-322.

WICK, G., KALISCHNIG, G. *et al.* (2001). 'Really old - Palaeoimmunology: Immunohistochemical analysis of extracellular matrix proteins in historic and pre-historic material.' *Experimental Gerontology* 36(9): 1565-1579.

WILLIAMS, A. C., EDWARDS, H.G.M. *et al.* (1995). 'The 'Iceman': molecular structure of 5200-year-old skin characterised by raman spectroscopy and electron microscopy.' *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1246(1): 98-105.

WINOGRAD, N. (2005). 'The magic of cluster SIMS.' *Analytical Chemistry* 77(7): 142-149.

X

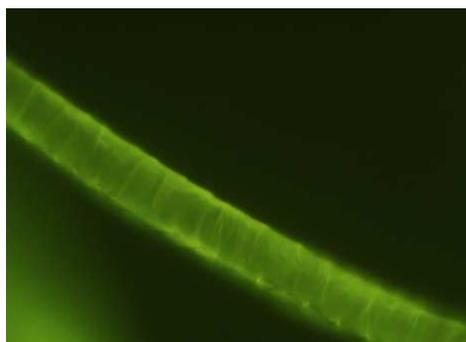
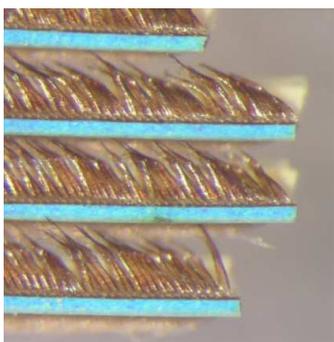
XU, B., ZHANG, Y. *et al.* (2011). 'Usage of electrostatic eliminator reduces human keratin contamination significantly in gel-based proteomics analysis.' *Journal of Proteomics* 74(7): 1022-1029.

Z

ZHANG, G., SUN, A. *et al.* (2006). 'Mass spectrometric analysis of enzymatic digestion of denatured collagen for identification of collagen type.' *Journal of Chromatography A* 1114(2): 274-277.

ZHANG, X., BERGHE, I. V., WYETH, P. (2011) 'Heat and moisture promote deterioration of raw silk estimated by amino acid analysis'. *Journal of Cultural Heritage* 12 (4) : 408-411.

Chapitre 2 : Étude de matériaux kératinisés



1	Introduction	102
2	Analyses de cheveux et de poils animaux	103
2.1	Structure d'un cheveu	103
2.2	Analyses de cheveux	104
2.3	Analyses de poils animaux	115
3	Analyses de cornes	122
3.1	Structure d'une corne de bovidé	122
3.2	Analyses de cornes de bovidés	124
3.3	Analyses d'une corne de rhinocéros laineux	141
4	Conclusion	153
	Bibliographie	154

1 Introduction

Les kératines constituent une famille de 28 protéines présentes à la fois dans la peau (cytokératine) et dans les phanères (exokératines). On dénombre, par exemple, 7 kératines différentes dans les couches de l'épiderme et 15 dans les poils. On classe ces kératines en deux types selon leur poids moléculaire et leurs propriétés acido-basiques :

- les kératines de type I, acides et d'un poids moléculaire de 40 à 50 kDa
- les kératines de type II, basiques et d'un poids moléculaire de 50 à 70 kDa.

Les différentes structures des tissus kératinisés associent le plus souvent une kératine de chaque type.

L'étude de tissus kératinisés, modernes et anciens, autre que la peau permet de mieux comprendre la signature de ces protéines en TOF-SIMS et leur dégradation.

Parmi les différents tissus et phanères kératinisés nous nous sommes intéressés spécifiquement aux cheveux, aux poils d'animaux et aux cornes. Ces kératines dites dures ont en commun leur structure : elles sont organisées en filaments intermédiaires de 7,5 nm de diamètre dans une matrice amorphe de protéines riches en cystine et/ou glycine et tyrosine. La formation de ponts disulfures au sein de la structure dans le cas des poils et de la laine explique le caractère insoluble du tissu (Fraser, 1972). Dans les différents tissus, l'espacement entre les filaments varie et la matrice occupe ainsi de 30 à 50% du volume du tissu. Tandis que la laine, les poils et les pics de porc-épic s'organisent en fibres, les autres tissus adoptent des formes variées (Marshall, 1991).

Comme en témoigne l'étude présentée par M. Tilanus en 1850 (Tilanus, 1850), la différence chimique existant entre des tissus kératinisés tels que la corne, les poils, l'épiderme, l'ongle ou les fanons de baleine, est l'objet d'études depuis le XIX^{ème} siècle. Le Tableau 1-1 permet de constater les différences de composition en acides aminés des différentes kératines étudiées. Si les cheveux, la corne et les plumes contiennent tous une part importante de leucine, d'acide glutamique et de sérine, les cheveux se distinguent par leur forte teneur en cystéine tandis que la corne contient davantage de glycine et la plume davantage d'alanine.

	Ala	Arg	Asp	Cys	Glu	Gly	His	Leu/Ileu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	OH-Pro	OH-Lys
Cheveu	6.9	7.2	9.2	7.5	16.6	5.2	0.7	13.9	3.5	0.4	2.0	3.8	9.0	5.5	0.0	2.5	6.1	0.0	0.0
Corne de bœuf	3.8	4.7	7.2	5.5	11.5	18.1	0.5	11.3	2.0	0.4	2.3	9.1	8.4	6.5	0.4	2.4	5.8	0.0	0.0
Plume	7.4	4.7	6.3	3.9	7.3	12.2	0.5	12.0	1.3	0.4	3.5	10.0	15.6	4.6	0.4	1.3	8.6	0.0	0.0

Tableau 1-1 : Comparaison de la composition en acides aminés des kératines de cheveu (Akhtar, 1997b), de corne de bœuf (Ward, 1954) et de plume (Mills, 1999).

2 Analyses de cheveux et de poils animaux

Tous les poils des mammifères, quelle que soit leur localisation sur le corps, leur origine ou leur utilisation (cheveux, laine...) ont la forme d'un tube, riche en kératine, qui prend sa source dans un follicule, poche de l'épiderme de la peau creusée dans le derme.

Plusieurs études ont été réalisées sur des cheveux anciens et modernes, ainsi que sur des crins de chevaux teintés et de la laine.

2.1 Structure d'un cheveu

2.1.1 Structure histologique

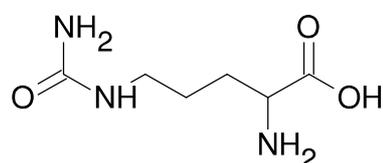
Trois zones histologiques principales, concentriques, constituent la structure d'une fibre capillaire :

- un canal central appelé *medulla*, peu riche en protéines,
- entouré par le cortex,
- la cuticule, de 2 à 10 μm d'épaisseur, formée de couches d'écaillés (cellules aplaties rectangulaires de 30 à 50 μm de côté) qui isolent la fibre du milieu extérieur (Robbins, 1994).

La composition en acides aminés dans ces trois zones du cheveu diffère :

- la *medulla* est très riche en acide glutamique, ne contient pas de cystéine et présente un acide aminé particulier, la citrulline ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$, voir Figure 2-1),
- le cortex est composé majoritairement d'acide glutamique, de sérine ainsi que de glycine et de cystéine,
- la cuticule comprend la sérine, la proline, la glycine et l'acide glutamique (Marshall, 1991).

Les cheveux ont un diamètre compris entre 30 et 120 μm (Fraser, 1972).



M=175.19 Da

Figure 2-1 : Formule développée et masse moléculaire de la citrulline

2.1.2 Composition du cheveu

Comme nous l'avons vu (Tableau 1-1), la kératine du cheveu est particulièrement riche en cystéine. Elle contient également en proportion importante de la glutamine et de la leucine. Les structures secondaires, tertiaires, quaternaires et supérieures du cheveu ont été explicitées au chapitre 1 (paragraphe 1.2.2).

Outre la kératine, les autres composés organiques présents dans le cheveu sont les lipides. Ils se concentrent dans la cuticule et la partie externe du cortex ainsi que dans la *medulla* (Kreplak, 2001). Il s'agit principalement de triglycérides, d'acides gras libres (principalement acide palmitique et acide stéarique), des céramides et du cholestérol (Debois, 2008). Ils constituent moins de 1% de la composition du cheveu (Marshall, 1991).

La mélanine, présente sous forme de grains dans le cortex, donne aux cheveux leur couleur et protège les lipides et l'ADN des ultraviolets (Krol, 1998). On note aussi la présence de minéraux dans le cheveu, en particulier du calcium (Kempson, 2003a).

2.1.3 *Techniques d'étude*

La structure histologique du cheveu (et son éventuelle dégradation) est généralement étudiée par microscopie optique et électronique. La microscopie électronique permet par exemple de visualiser les grains de mélanine du cortex du cheveu (Nofsinger, 2000).

Les structures secondaire, tertiaire et quaternaire de la kératine du cheveu sont étudiées en diffraction des rayons X depuis les années 1950 (Pauling, 1953).

Les spectroscopies IR et Raman permettent d'étudier la composition chimique du cheveu en termes de lipides et de protéines, ainsi que ses dégradations (Panayiotou, 1999 ; Cotte, 2004 ; Akhtar, 1997b).

Plusieurs études ont été effectuées sur des cheveux anciens et modernes en TOF-SIMS. La première fut celle de Gillen en 1999 (Gillen, 1999). Dans des coupes longitudinales de cheveux, Kempson s'est ensuite intéressé à la présence de calcium dans la cuticule et la *medulla* des cheveux (Kempson, 2003a), Chen à la pénétration de colorants (Chen, 2006) tandis que Poleunis a étudié leur surface (Poleunis, 2006). En préparant des coupes transverses, Hallégot souligne la présence de composés phosphatés dans la *medulla* et à la surface de cheveux de momie. Hallégot (2008) et Debois (2008), comme Li (Li, 2005) ont exploré la composition lipidique de cheveux anciens et modernes grâce à cette technique.

Des études en NanoSIMS ont également été effectuées, notamment par Hallégot, pour étudier les grains de mélanine du cortex (Hallégot, 2004) ou localiser d'éventuelles traces d'arsenic (Audinot, 2004). Cette technique, relevant du régime de SIMS « dynamique » permet d'obtenir une résolution spatiale supérieure à celle du TOF-SIMS (de l'ordre 50 à 200 nm) mais l'analyse chimique se limite à des éléments ou de petits fragments (de rapport $\frac{m}{z}$ inférieur à 250). Mise au point dans les années 1980 et d'abord utilisée en géo- et cosmochimie, elle autorise la localisation de molécule marquée isotopiquement, à l'échelle subcellulaire, ce qui s'avère particulièrement intéressant en biologie et en médecine. En France, seul l'instrument du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris est utilisé, pour quelques applications, dans le domaine du patrimoine.

2.2 *Analyses de cheveux*

2.2.1 *Difficultés liées à la préparation des échantillons*

Les échantillons de cheveu dont l'étude est présentée ici ont été inclus en résine polyester et préparés en ultramicrotomie selon le protocole décrit au chapitre 1 (paragraphe 2.4.2.4.1). Cette technique n'était pas optimale. En effet, on constate le plus souvent un retrait de la résine et une rétraction du cheveu dans le bloc entre le moment de la coupe et l'analyse en TOF-SIMS. Ceci rend difficile l'obtention de coupes ou de surface de blocs planes. L'analyse en haute résolution spatiale de cheveux modernes, teintés ou non, préparés en cryomicrotomie¹, a montré dans ce cas un problème de plis dans la coupe (Figure 2-2 a et b).

Un autre problème s'est parfois posé : l'orientation des fibres pour l'inclusion. En effet le cheveu est très peu dense par rapport à la résine et il est nécessaire d'inclure un fagot de fibres afin d'être sûr d'orienter au moins quelques-unes d'entre elles perpendiculairement à la zone de coupe.

¹ Ce type de préparation a été réalisée par Elsa Van Elslande dans le cadre de l'ANR Nanochéops afin d'étudier, entres autres, des coupes de cheveux teintés en spectroscopie Raman.

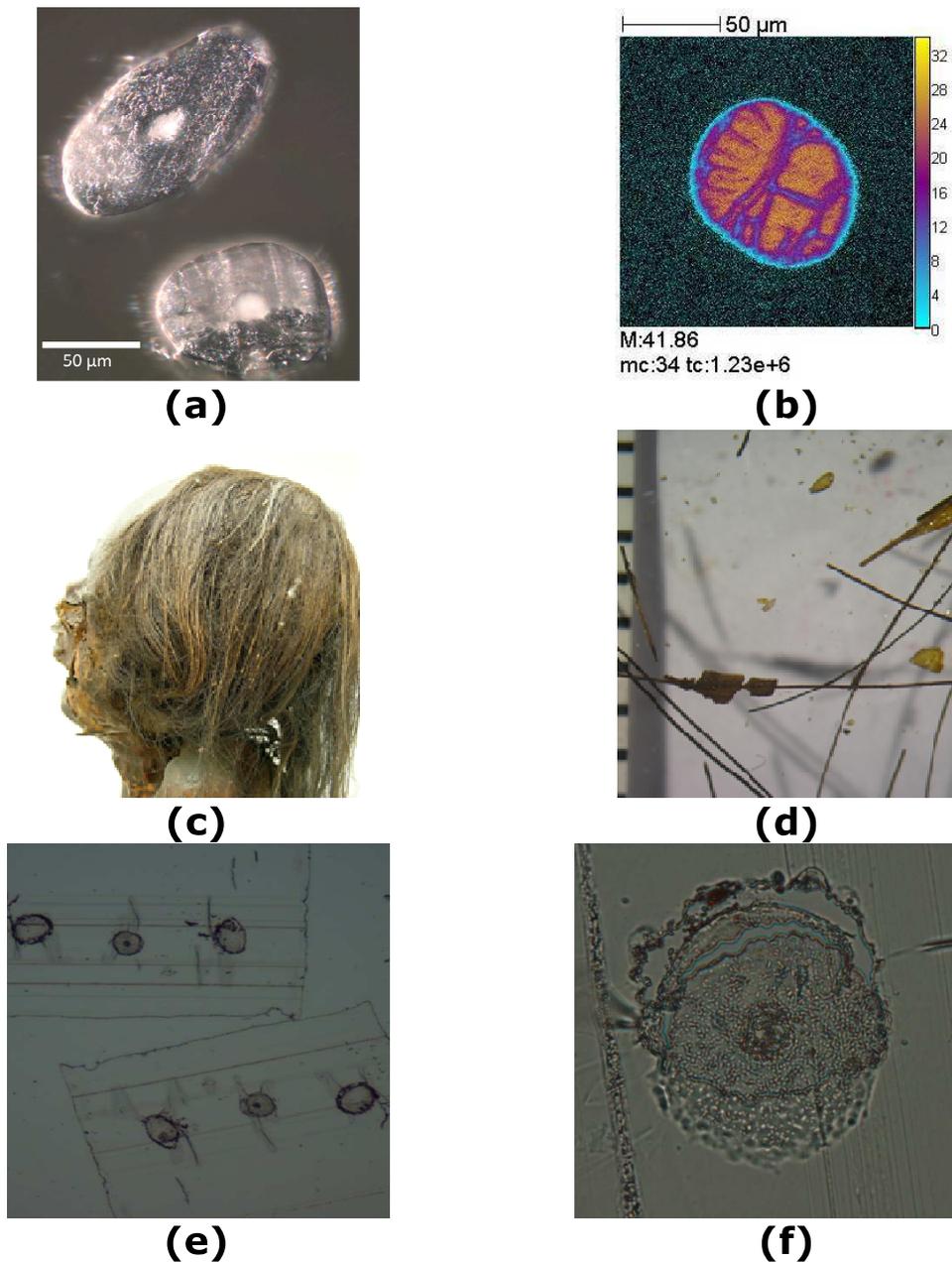


Figure 2-2 : Caractérisation structurale de cheveux modernes et anciens. (a) Photographie au microscope optique d'une coupe de cheveux modernes préparés en cryomicrotomie et (b) image ionique TOF-SIMS de l'ion CNO^- en haute résolution spatiale. (c-f) Cheveux anciens : (c) photographie de la tête de la momie Tarapacá © P. Carminati et. (d) Photographie à la loupe binoculaire des cheveux de la momie. (e-f) Images au microscope optique de coupes de cheveux anciens.

2.2.2 Présentation des échantillons et caractérisation structurale

Échantillons modernes

Les cheveux modernes étudiés sont de type caucasien et n'ont jamais fait l'objet d'une teinture.

Échantillons anciens

Les échantillons de cheveux anciens proviennent d'une momie andine, de la culture de Tarapacá (dont la peau a, par ailleurs, été étudiée en TOF-SIMS, voir chapitre 3 et (Cersoy, 2012)). Ceux-ci étaient préservés uniquement sur la partie gauche de la tête (Figure 2-2 c). Longs et bruns, ils sont devenus fragiles et cassants. Comme on peut le voir sur la photographie des prélèvements, observés à la loupe binoculaire, des grains de résine jaune y étaient collés (Figure 2-2 d). De plus, des exuvies (cuticules issues de la mue) d'anthrènes (coléoptères appréciant les tissus biologiques) ont été retrouvées au niveau du cuir chevelu (Carminati, 2010). Prélevés au départ pour la datation radiocarbone (Richardin, 2011b), les cheveux ont été inclus, préparés en ultramicrotomie et analysés directement sur le bloc et en coupe (Figure 2-2 e et f). Certains cheveux ne contenaient pas de *medulla*.

2.2.3 Analyse TOF-SIMS de cheveux modernes

La région d'intérêt (ROI) correspondant aux échantillons de cheveux modernes, dans le bloc, a été délimitée afin d'extraire le spectre correspondant, avec une contribution minimale de la résine d'inclusion. Les spectres TOF-SIMS correspondants, dans les deux modes d'ionisation, sont présentés Figure 2-3 a et b.

Le spectre en mode d'ionisation positif (Figure 2-3 a) présente 5 types de pics correspondant à :

- des peptides ou protéines (fragments d'acides aminés)
- la résine d'inclusion (croix noires) présente autour des cheveux
- une pollution PDMS (éclaircs gris) présente dans la résine
- des lipides correspondant au cholestérol (m/z 368.46) et à un fragment de céramide (fragment m/z 284.32), (Tahallah' 2008).
- quelques minéraux (sodium, potassium, traces de calcium).

La localisation des fragments d'acides aminés est uniforme sur l'ensemble du cheveu en coupe transversale (Figure 2-4). Certains pics de faible masse correspondant à des hydrocarbures C_xH_y , sont communs avec des fragments d'espèces présentes dans la résine d'inclusion ce qui explique une localisation sur l'ensemble des images (c'est le cas par exemple des ions m/z 41.08, 55.08 et 74.08). Ces signaux (fragments d'acides aminés et hydrocarbures) viennent de protéines, ici de la kératine probablement. On constate que les ions les plus abondants dans le spectre et sur les images obtenues en SIMS sur le cheveu moderne, correspondent aux fragments de rapport m/z 41.04 (Glu), 30.04 (Gly), 70.07 (Pro) et 44.05 (Ala). On détecte également les fragments m/z 55.02 et 59.05, également détectés dans la kératine et le collagène, ainsi que les fragments m/z 86.10 (Leu/Ileu) et 100.05 (Arg).

Deux pics présents dans le spectre en mode d'ionisation positif avaient été observés par Debois (Debois, 2008) lors de l'étude des cheveux. Il s'agit d'un pic à m/z 284.32 et de l'ion $[M+H-H_2O]^+$ du cholestérol (m/z 369.30). Leur localisation (Figure 2-4) semble correspondre à une zone périphérique du cheveu, comme dans le cas de l'étude de Debois, qui serait la cuticule. L'ion à 284 est cependant attribué par Poleunis, lors de l'étude de surface de cheveux modernes en TOF-SIMS (Poleunis, 2006), à l'ion hexadecyltriméthylammonium ($(CH_3)_3N(CH_2)_{15}CH_3^+$) issu d'un après-shampooing². Cette attribution semble plausible puisque cet ion n'est jamais retrouvé dans les cheveux anciens et se limite toujours à la cuticule.

² Ce composé est souvent présent et répertorié dans les après-shampoings, soin et baumes réparateurs sous le nom de Docosanyl Triméthylammonium ou Cetrimonium Chloride.

La Figure 2-4 présente la répartition de l'ion 184.10 ayant permis à Delphine Debois de délimiter la zone de la *medulla* : dans notre cas, il présente une intensité trop faible pour parvenir à identifier cette zone. Ce fragment a été identifié depuis comme correspondant à l'ion $C_5H_{15}NO_4P^+$ et correspondrait à un lipide de type phosphocholine, sphingomyéline ou céramide (Tahallah 2008). Notons que Li a aussi noté sa présence dans la *medulla* de cheveux modernes (Li, 2005). Cet élément pourrait être relié à une éventuelle présence d'ions phosphates (à détecter en mode d'ionisation négative) dans la *medulla* sur des images TOF-SIMS de coupes de cheveux (Hallégot, 2008).

Le spectre global extrait de la ROI, en mode d'ionisation négatif, correspondant aux cheveux (délimitée, à la main, à partir de l'image somme des ions de la résine) est présenté Figure 2-3 b. Il présente 5 types de pics correspondant à :

- des peptides ou protéines
- la résine d'inclusion (croix noires)
- une pollution de type LABS (éclaircs gris)
- des composés déjà observés par Debois (m/z 265.18 et 309.18) dans la cuticule de cheveux modernes.
- quelques minéraux (fluor, chlore)

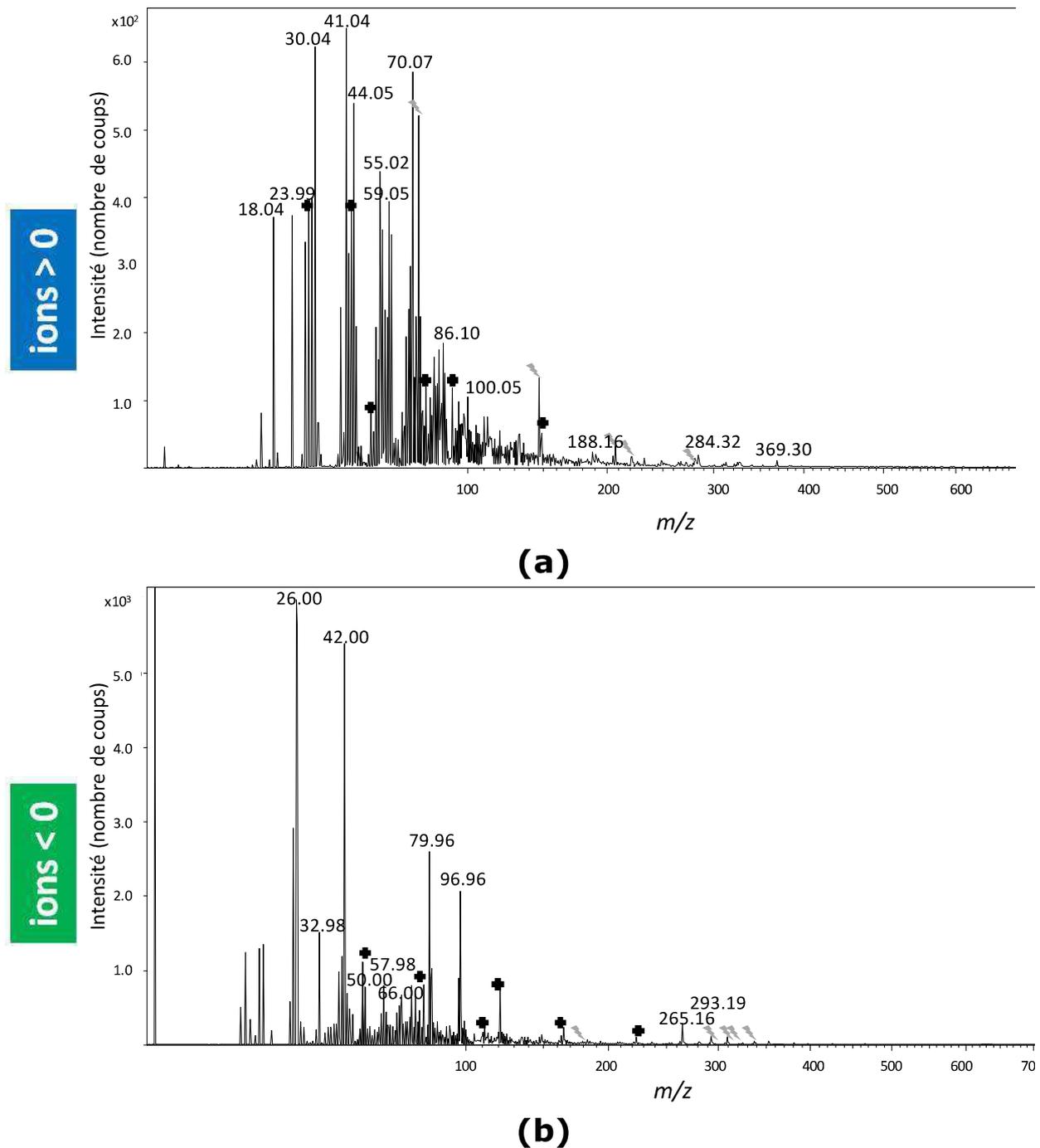


Figure 2-3 : Analyse TOF-SIMS des cheveux modernes. Spectres en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b).

Les principaux pics du spectre des cheveux en mode d'ionisation négative correspondent à une ou plusieurs protéines (fragments CN^- à m/z 26.00, CNO^- à m/z 42.00 et dans une moindre mesure C_3N^- à m/z 50.00 et C_2N_3^- à m/z 66.00). La présence de soufre (m/z 32.98, ion HS^-) en quantité relativement importante ainsi que d'ions sulfates indiquent la présence d'une protéine soufrée. On identifie également l'ion CSN^- à m/z 57.98, présent dans le spectre des cheveux et déjà identifié dans celui de la cystine et de la cystéine. Les ions à m/z 79.96 et 96.96 correspondent respectivement aux ions SO_3^- et HSO_4^- . Kempson (2003b) avaient déjà observés des ions de type SO_x^- dans les cheveux en TOF-SIMS. On remarque qu'ils ne sont présents ni dans les spectres de la cystéine et de la cystine ni dans celui de la kératine.

La localisation des différents ions correspondant à des protéines, en particulier à la kératine du cheveu (protéine soufrée, du fait de la présence importante de cystéine/cystine), sont présentés Figure 2-4. Les deux types de signaux (peptidiques et soufrés) sont colocalisés sur l'ensemble du cheveu et légèrement moins abondants dans la *medulla*. Cette observation concorde avec l'analyse de Li en mode d'ionisation négative et avec la localisation des fragments d'acides aminés en mode d'ionisation positive.

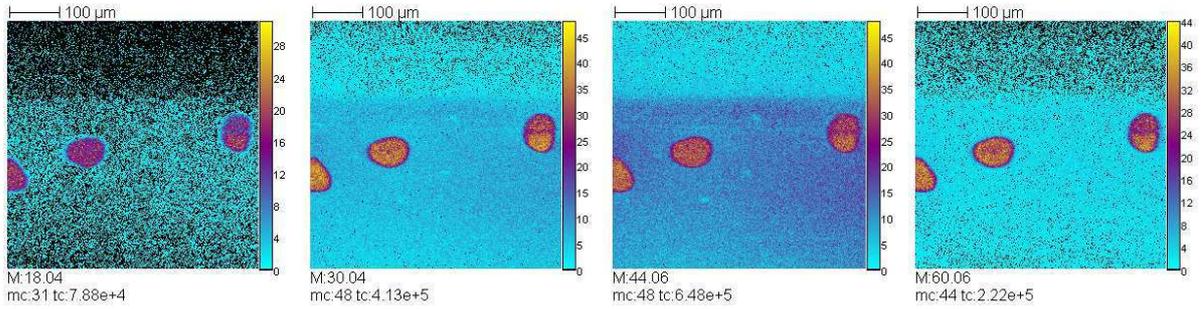
La composition lipidique du cheveu est bien connue : ici nous avons identifié les ions déprotonés des acides gras saturés et insaturés classiques en C16 et C18, en faible quantité par rapport aux espèces de rapport m/z 265.15, 293.19, 309.18, 337.21 et 353.27. On constate que le premier type d'ion est localisé dans la *medulla* et le cortex (Figure 2-4) tandis que les ions « inconnus » sont localisés dans la partie périphérique correspondant à la cuticule et à la partie externe du cortex (Figure 2-4). Notons que certaines de ces espèces ont été observées dans les analyses de Debois (en particulier l'ion à m/z 265). Certains ions pourraient correspondre à des fragments de céramides comme par exemple m/z 265.24. Les ions m/z 265.15, 293.19 et 309.18 ont également été détectés dans les os anciens et modernes, l'ion 265.15 présentant toujours l'intensité la plus importante. Dans son étude sur les cheveux en TOF-SIMS, Poleunis observe toute la série de pics (y compris ceux correspondant aux alkylbenzènesulfonates linéaires ou LABS). Il les attribue à des surfactants soufrés comme le Laureth sulfate de sodium³ ou l'acide dodécylbenzènesulfonique⁴. La superposition des images correspondant aux deux types d'ions montre bien qu'ils ne sont pas colocalisés (Figure 2-4). Les spectres des ROI correspondant à chacune des deux zones montrent de légères différences, en particulier la présence d'acide oléique (C18:1, m/z 281.28) en quantité plus importante dans la zone centrale du cheveu. Ceci concorde avec les observations de Debois (Debois, 2008). Notons que Cotte (Cotte, 2004) trouve également une concentration des lipides « classiques » (C16:0 et C18:1) au niveau de la partie centrale, la *medulla* en particulier (Cotte, 2004).

Des ions phosphates ont été détectés, en faible quantité, dans les cheveux comme on le voit sur la Figure 2-4. Ils sont localisés au niveau du cortex et de la *medulla*.

³ Un des premiers ingrédients des shampoings.

⁴ Il s'agit d'un LABS.

Polypeptides



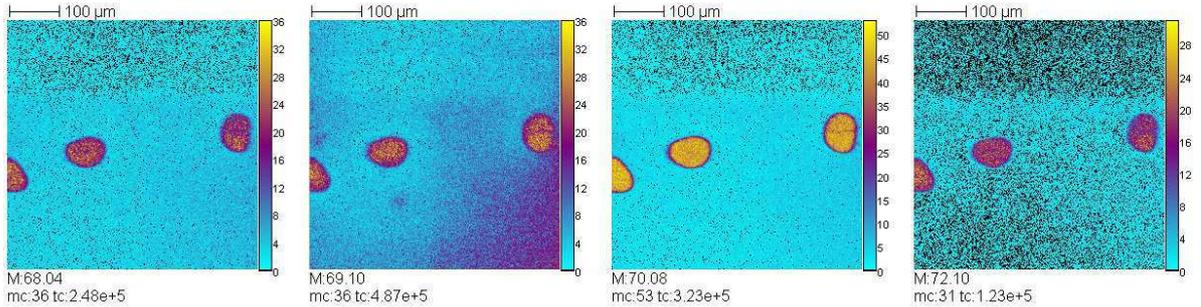
m/z 18.04
NH₄⁺

m/z 30.04
Gly

m/z 44.06
Ala

m/z 60.06
Ser

ions > 0

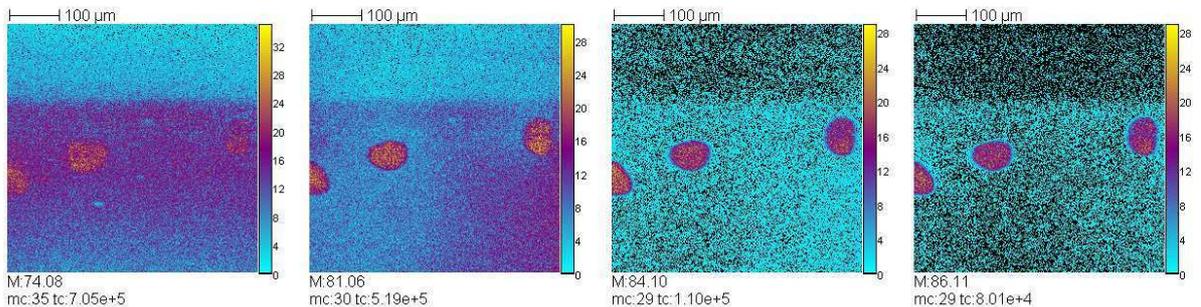


m/z 68.04
Pro

m/z 69.10
Thr

m/z 70.08
Pro

m/z 72.10
Val



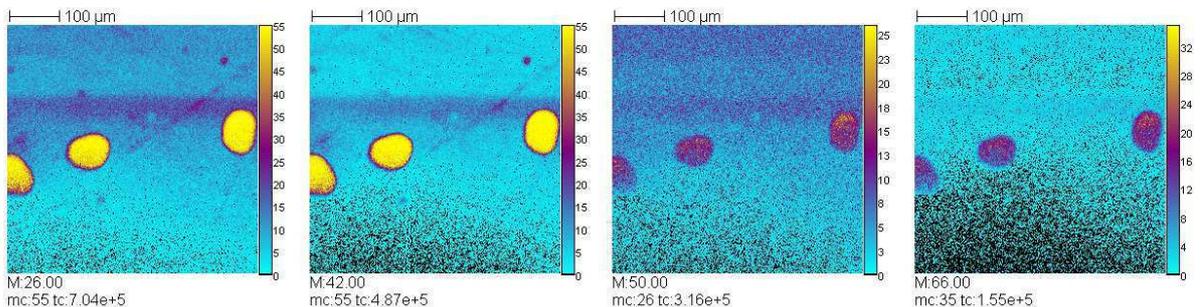
m/z 74.08

m/z 81.06

m/z 84.10
Glu

m/z 86.11
Leu/Ileu

ions < 0



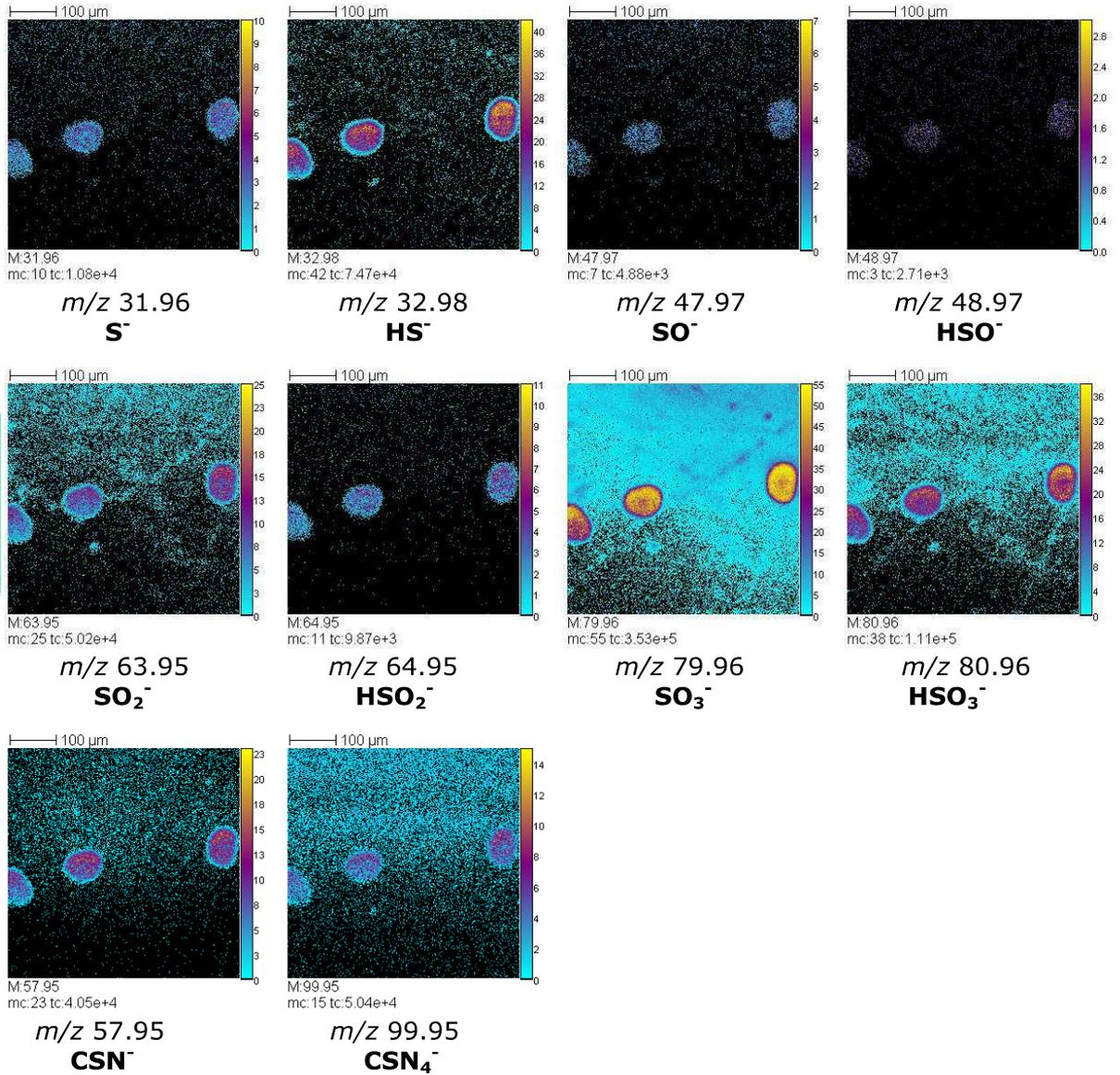
m/z 26.00
CN⁻

m/z 42.00
CNO⁻

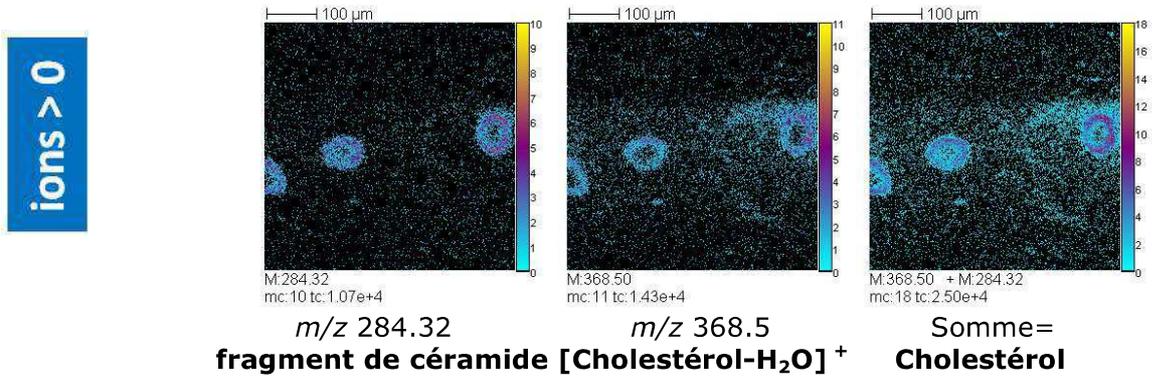
m/z 50.00
C₃N⁻

m/z 66.00
C₂N₃⁻

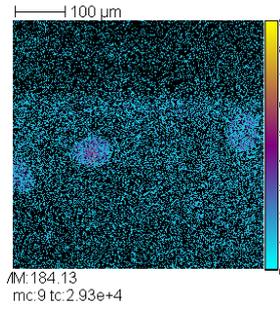
Espèces sulfurées



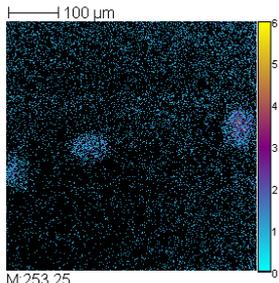
Lipides



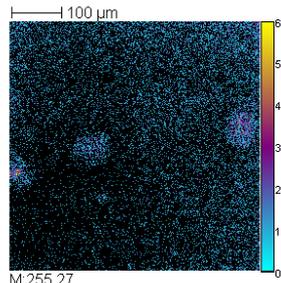
2- Analyses de cheveux et de poils animaux



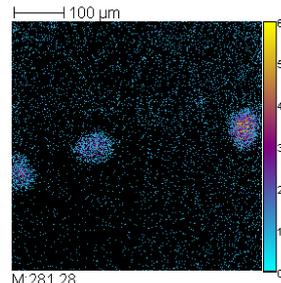
m/z 184.13
 $C_5H_{15}NO_4P^+$



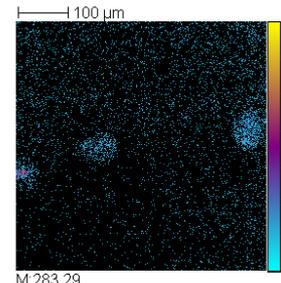
m/z 253.25
C16:1



m/z 255.27
C16:0

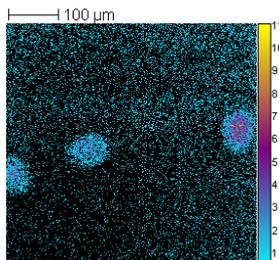


m/z 281.28
C18:1

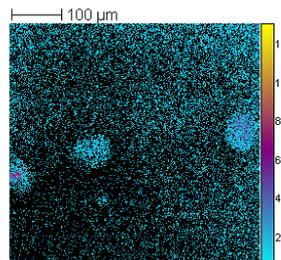


m/z 283.29
C18:0

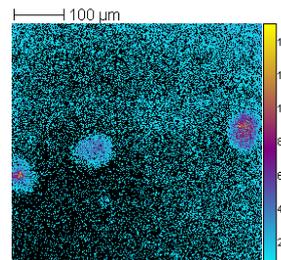
ions < 0



m/z 253.25+281.28
C16 :1 + C18 :1

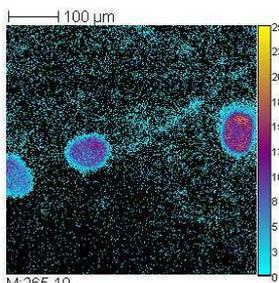


m/z 255.27+283.29
C16 :0 + C18 :0

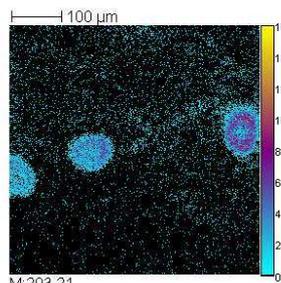


Somme =
Lipides en C16 et C18

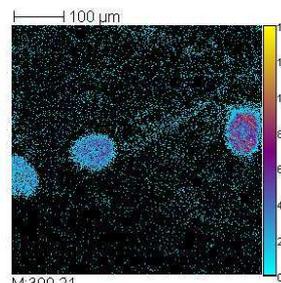
ions < 0



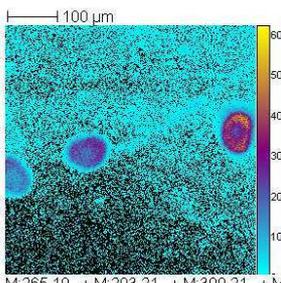
265.19



293.21



309.21



Somme « inconnus »

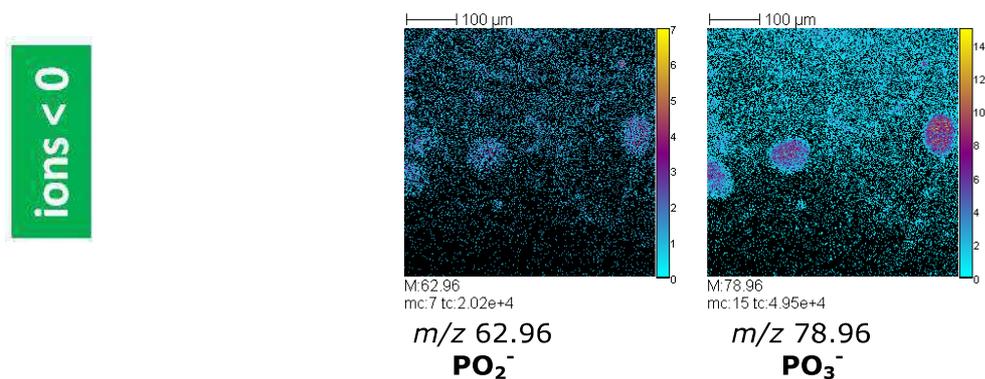
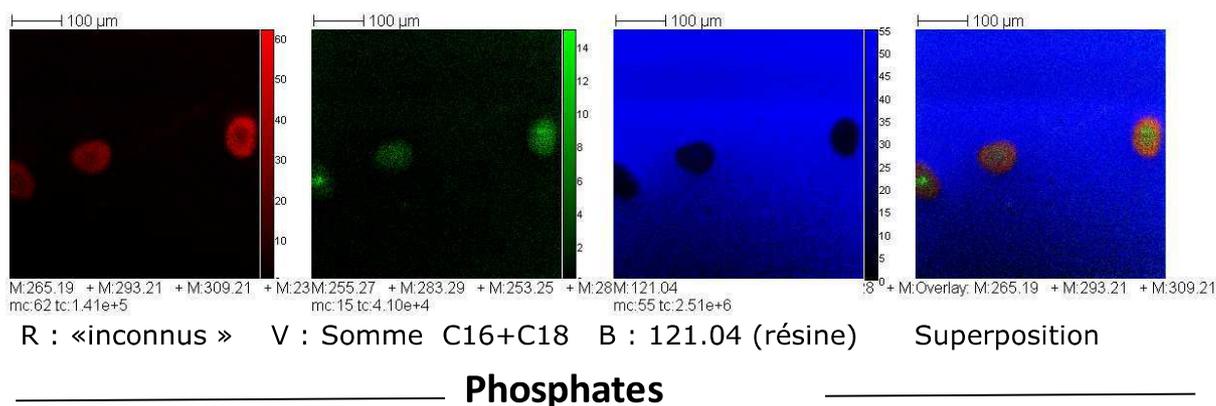


Figure 2-4 : Analyse TOF-SIMS des cheveux modernes. Images ioniques, en mode d’ionisation positif et négatif des protéines, des lipides et des phosphates contenus dans le cheveu et superposition des images correspondant aux ions de la cuticule (rouge), aux acides gras C16-C18 (vert) et à un ion caractéristique de la résine d’inclusion à m/z 121.04 (bleu)

2.2.4 Analyse TOF-SIMS de cheveux anciens

La région d’intérêt (ROI) correspondant aux échantillons a été délimitée afin d’extraire le spectre correspondant, avec une contribution minimale de la résine d’inclusion. Les spectres TOF-SIMS correspondants, dans les deux modes d’ionisation, sont présentés Figure 2-5.

Le spectre des cheveux anciens, en mode d’ionisation positif (Figure 2-5 a), présente les mêmes types de pics que le cheveu moderne, correspondant à :

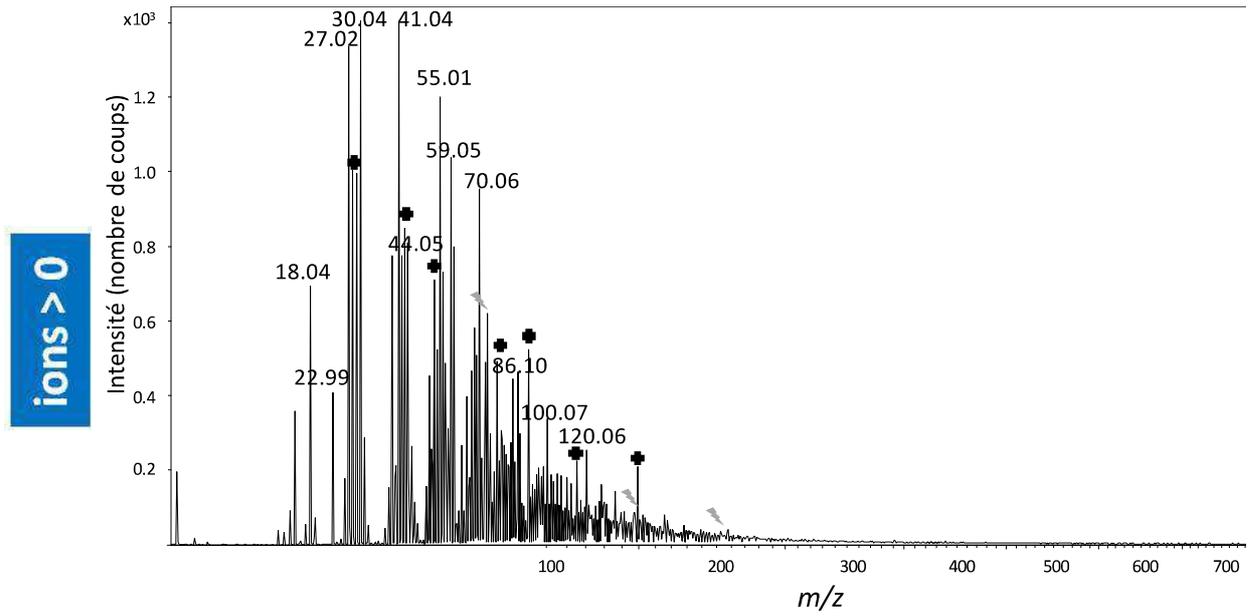
- des peptides ou protéines (fragments d’acides aminés) en proportions relatives un peu différentes
- la résine d’inclusion (croix noires)
- une pollution PDMS (éclairs gris)
- quelques minéraux (sodium, potassium, traces de calcium).

On remarque que la proportion relative de glycine semble plus importante tandis que celles de proline et d’alanine semblent plus faibles.

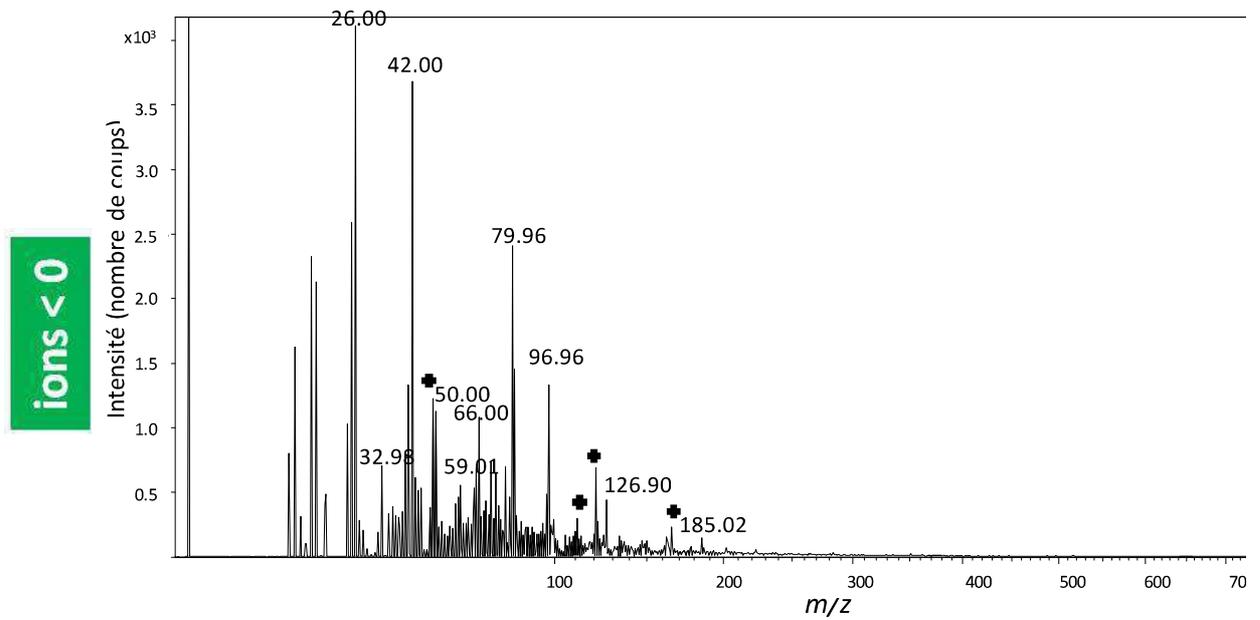
En revanche les pics correspondants à un après-shampooing (fragment m/z 284.32) et au cholestérol (m/z 369.30) sont absents.

En mode d’ionisation négatif, le spectre (Figure 2-5 b) est aussi très semblable à celui obtenu pour un cheveu moderne. On observe cependant une augmentation relative des pics C_3N^- et $C_2N_3^-$ correspondant à des fragments polypeptidiques.

On ne détecte pas en revanche de pics correspondant à des lipides, ni de pollution de type LABS. Les images ioniques correspondant aux ions phosphates montrent une localisation dans la cuticule et la partie externe du cortex.



(a)



(b)

Figure 2-5 : Spectres TOF-SIMS des cheveux anciens en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b).

2.3 Analyses de poils animaux

2.3.1 Analyse de crins de chevaux teints

Les crins de chevaux présentent la particularité d'être plus épais donc plus faciles à manipuler et à inclure que les cheveux. C'est pour cette raison qu'ils ont été choisis dans le cadre d'une étude sur la coloration à l'ancienne des cheveux avec du plomb. Cette étude menée au sein de l'UMR 171 depuis plusieurs années se poursuit actuellement au sein du LAMS (UMR 8220). Les crins dont l'étude est présentée ici ont été préparés par Marie Radepont dans le cadre de son stage de fin d'étude. La coloration des crins, choisis blancs, consiste à les immerger dans une solution contenant de la chaux pour briser les ponts disulfure et dans une autre contenant de la litharge PbO permettant la formation de nanocristaux de galène PbS, responsables d'une coloration noire du cheveu. Les détails peuvent être trouvés dans (Walter, 2006).

Afin d'effectuer l'analyse en TOF-SIMS, les crins avaient préalablement été préparés en ultramicrotomie, selon le protocole décrit dans le chapitre 1 (paragraphe 2.4.2.4.1). L'aspect de la coupe étudiée est présentée Figure 2-6 : on remarque que la *medulla* est plus épaisse que dans le cas des cheveux et l'on note la forme ovoïde de la plupart des sections, caractéristique des poils de la queue (Textile Institute, 1958).

Les données obtenues en TOF-SIMS ont été retraitées pour être comparées à celles acquises dans le cadre de cette thèse. Les résultats obtenus (Figure 2-7) sont similaires : en particulier, les localisations de phosphates et de phosphocholine, d'acides palmitique et oléique ont été confirmées. En outre, les espèces soufrées sont absentes de la partie centrale du cheveu et la *medulla* contient de la phosphocholine. En mode d'ionisation négatif, on détecte, comme précédemment, des ions phosphates dans la *medulla* correspondant à la présence de ce phospholipide.

La localisation du calcium est, en revanche, modifiée car le traitement de coloration nécessite l'emploi d'eau de chaux, source de calcium diffusant dans le cheveu depuis la cuticule.

Les images montrent également la répartition du plomb à la périphérie du cheveu, au bout de 6h de traitement. On constate que celui-ci a réussi à diffuser dans la cuticule et une partie du cortex.

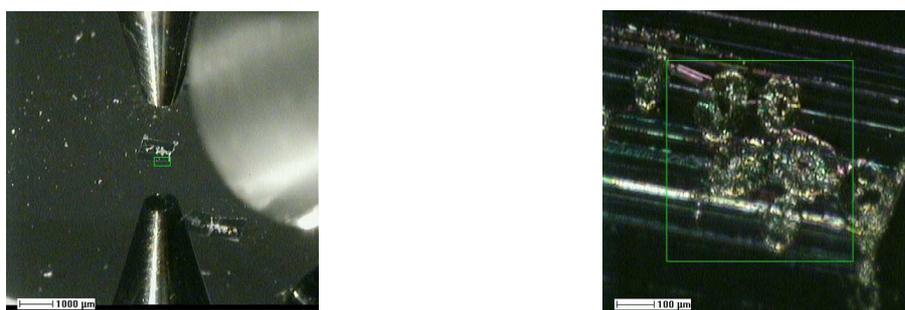


Figure 2-6 : Analyse de crins de cheval. Photographies de la coupe étudiée dans la chambre d'ionisation du SIMS.

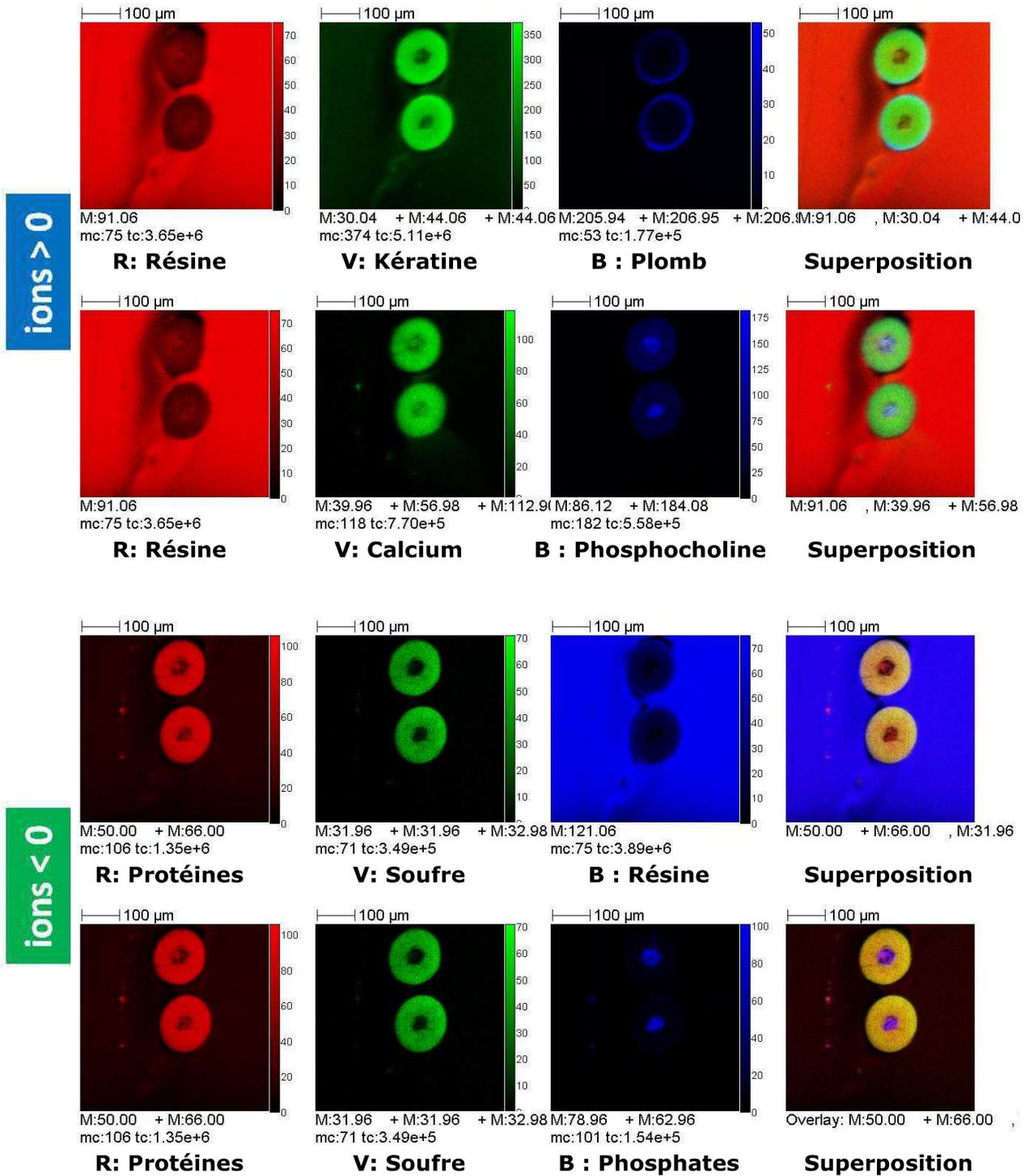


Figure 2-7 : Analyse de crins de cheval. Superposition d'images en mode d'ionisation positif et négatif. Taille des images : 500x500 µm².

2.3.2 *Comparaison entre laine et soie*

Parmi les tissus retrouvés sur le corps ou dans le tombeau des momies, deux textiles sont composés de fibres naturelles d'origine animale : la laine et la soie.

La laine, très proche du point de vue structural des cheveux, est issue le plus souvent du mouton tandis que la soie est produite par un ver à soie, le plus souvent domestique, *Bombyx mori* (Textile Institute, 1958). La laine correspond à un tissu kératinisé tandis que la fibroïne de la soie a une composition en acides aminés particulièrement simple, comme nous l'avons vu au chapitre 1 (paragraphe 1.3.3). Le Tableau 2-1 rappelle la composition en acides aminés des protéines de ces deux textiles. Il semble donc aisé de différencier les deux types de textile chimiquement.

2.3.2.1 *Techniques d'études des fibres animales*

Comme les autres fibres textiles (végétales ou synthétiques), la laine et la soie peuvent être étudiées directement (aspect extérieur de la fibre entière) ou en coupe transverse.

La microscopie optique permet de distinguer rapidement les fibres. En effet la soie se présente comme un fil lisse, transparent et sans écaille (Jauzein, 2009) tandis que la laine possède de grandes écailles. En coupe, les brins de soie de forme triangulaire sont caractéristiques tandis que les sections de fils de laine sont rondes. Les protéines de la soie sont également colorées en histologie par le rouge de ruthénium ou le vert d'iode (Moulherat, 2001). Au microscope électronique à balayage, on peut distinguer les deux couches principales de la structure de la soie, si l'enveloppe de grès est partiellement abimée. En coupe, on peut voir si les brins sont maintenus étroitement ensemble par le grès. On peut également mesurer les dimensions des brins.

La spectroscopie IR permet de distinguer chimiquement soie et laine. En effet, les intensités relatives des bandes amide varient entre les deux types de fibres animales du fait de leur composition protéique différente (fibroïne et sérécine pour la soie, kératine pour la laine). Elle permet également de déterminer la structure secondaire des protéines. Pour cette étude, il est possible d'écraser la fibre dans une cellule diamant (ce qui augmente la surface d'analyse) mais si la fibre est épaisse, il est plus facile de travailler en ATR (Ling, 2011). La spectroscopie Raman permet en outre d'évaluer l'état de dégradation de la fibre car l'intensité de la bande CH₂ varie.

La chromatographie d'exclusion stérique permet de séparer et d'analyser les différentes protéines en présence (Stuart, 2007).

Aucune étude en TOF-SIMS sur la soie n'a été publiée à ce jour à notre connaissance. Lee (Lee, 2008) a toutefois étudié en TOF-SIMS différents colorants fixés sur des fils de soie mais l'article ne montre pas le spectre de la soie non colorée.

	Ala	Arg	Asp	Cys	Glu	Gly	His	Leu/Ileu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	OH-Pro	Autres
Cheveu	6.9	7.2	9.2	7.5	16.6	5.2	0.7	13.9	3.5	0.4	2.0	3.8	9.0	5.5	0.0	2.5	6.1	0.0	0
Laine	5.5	6.4	5.9	9.8	11.3	8.4	0.9	11.1	2.6	0.4	2.8	6.8	11.6	6.9	0.5	3.5	5.6	0.0	0
Soie	28.8	0.5	1.3	0.2	1.0	43.7	0.2	1.2	0.3	0.1	0.6	0.5	11.9	0.9	0.3	5.1	2.2	0.0	0

Tableau 2-1 : Comparaison de la composition en acides aminés des kératines du cheveu (Akhtar, 1997) et de la laine ainsi que de la fibroïne de soie (Saravanan, 2006).

2.3.2.2 Échantillons étudiés et préparation

La laine étudiée est de la laine de mouton et la soie provient d'un fil continu d'organza⁵. Il s'agit de fils non teintés.

La Figure 2-8 permet de comparer la laine et la soie en observation directe et en coupe. Le fil de soie apparaît brillant, lisse et translucide sous la loupe binoculaire (Figure 2-8 e et f) tandis que le fil de laine est mat (Figure 2-8 a). L'observation au microscope permet de visualiser plus précisément les écailles de la fibre de laine (Figure 2-8 b).

Pour la réalisation de coupes, les fils ont été sectionnés en plusieurs petits brins à l'aide d'un scalpel puis inclus en résine polyester en orientant les brins parallèlement aux bords du bloc, et préparés en ultramicrotomie pour obtenir une section transverse. Sur un faisceau de 10 fils de soie inclus, nous avons pu observer 4 fils affleurant au même niveau avec une section parfaitement transverse. Cette technique est similaire à celle utilisée par Jauzein (2009), Moulherat (2001) et Shen (1998) et pour l'étude de la structure de la soie en microscopie optique et électronique. Dans le cas de la laine, les mêmes précautions doivent être prises qu'avec les cheveux et les mêmes problèmes de retrait et de rétraction se posent.

En coupe, la proximité des brins de soie au sein du fil varie en fonction de la préparation du tissu. A titre d'exemple, la Figure 2-8 g présente une coupe transverse de fil de soie moderne décreusé et la Figure 2-8 h, un fil de soie de cocon, non préparé. Pour ce dernier, les brins sont plus rapprochés car la colle d'origine (grès) est toujours présente. Selon les lieux et les époques, le grès peut être retiré et les brins réunis par la suite pour le tissage. La laine présente, en coupe, des sections rondes (Figure 2-8 c et d) tandis que les brins de soie se présentent sous la forme de sections triangulaires (Figure 2-8 g et h), comme nous l'avons présenté au chapitre 1 (paragraphe 1.3.3).

⁵ Merci à M. Frédéric Beauprêtre, responsable de l'atelier de restauration tapisserie-garniture au C2RMF, site Carrousel, Flore (Paris) ainsi qu'à Christophe Moulherat, chargé de la conservation préventive et de l'analyse des collections au musée du quai Branly, spécialisé dans l'étude des textiles, pour ses conseils sur la préparation et l'observation des fils de soie.

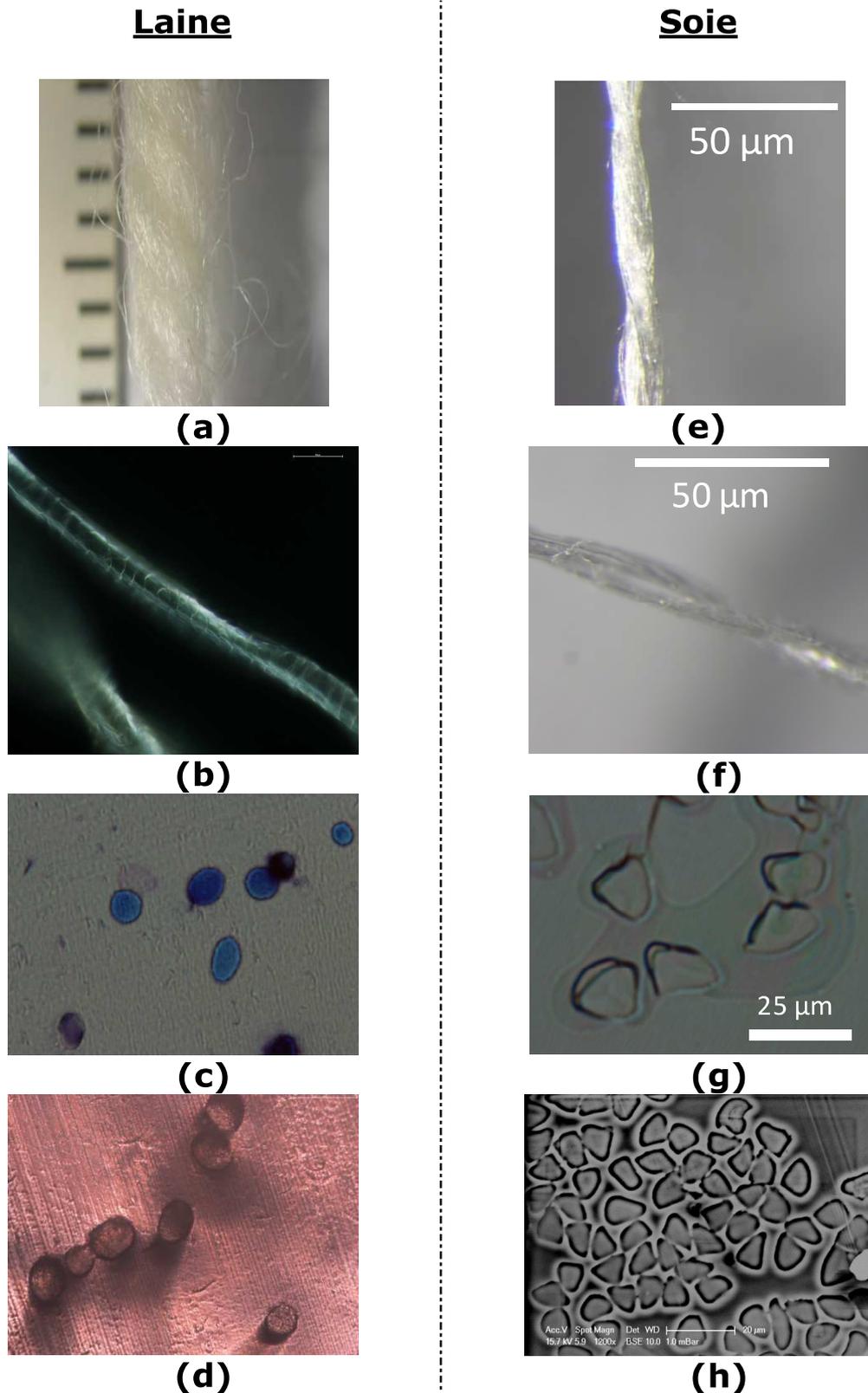


Figure 2-8 : Comparaison des structures de la laine et de la soie. Laine (a-d) Photographie à la loupe binoculaire d'un fil (a), vue longitudinale d'un fil au microscope optique (b), vue de fils, en coupe transverse, colorés au bleu de méthylène (c) et vue de la surface du bloc d'inclusion des fils au microscope optique. Soie (e-h). Photographies d'un fil de soie à la loupe binoculaire (e-f), Photographie au microscope optique d'une coupe avec zoom sur les brins (g) et image au MEB, en mode BSE, de brins d'un fil de soie de cocon (h).

2.3.2.3 Comparaison en TOF-SIMS

Les spectres obtenus pour la laine et la soie moderne, dans les deux modes d'ionisation, sont présentés Figure 2-10 b et c. Dans les deux cas, les fibres occupaient une faible partie de l'image et il était indispensable d'extraire le spectre total de la zone d'intérêt des fibres, pour minimiser le signal de la résine, comme montré Figure 2-8 a.

En mode d'ionisation positif (Figure 2-10 b), le spectre de la soie est particulièrement simple, dominé par les fragments de deux acides aminés majoritaires de la fibroïne : l'alanine et la glycine. Le spectre de la laine est plus complexe, dominé par le fragment caractéristique de la proline mais il contient aussi de la glycine et de l'alanine ainsi que de la sérine, de la leucine, de l'arginine et de la tyrosine.

En mode d'ionisation négatif, le spectre de la soie (Figure 2-8 c) ne peut être distingué de celui d'une protéine puisqu'il ne comporte, outre les signaux de la résine, que de petits fragments polypeptidiques. La kératine de la laine se distingue, en revanche, par la présence de fragments soufrés.

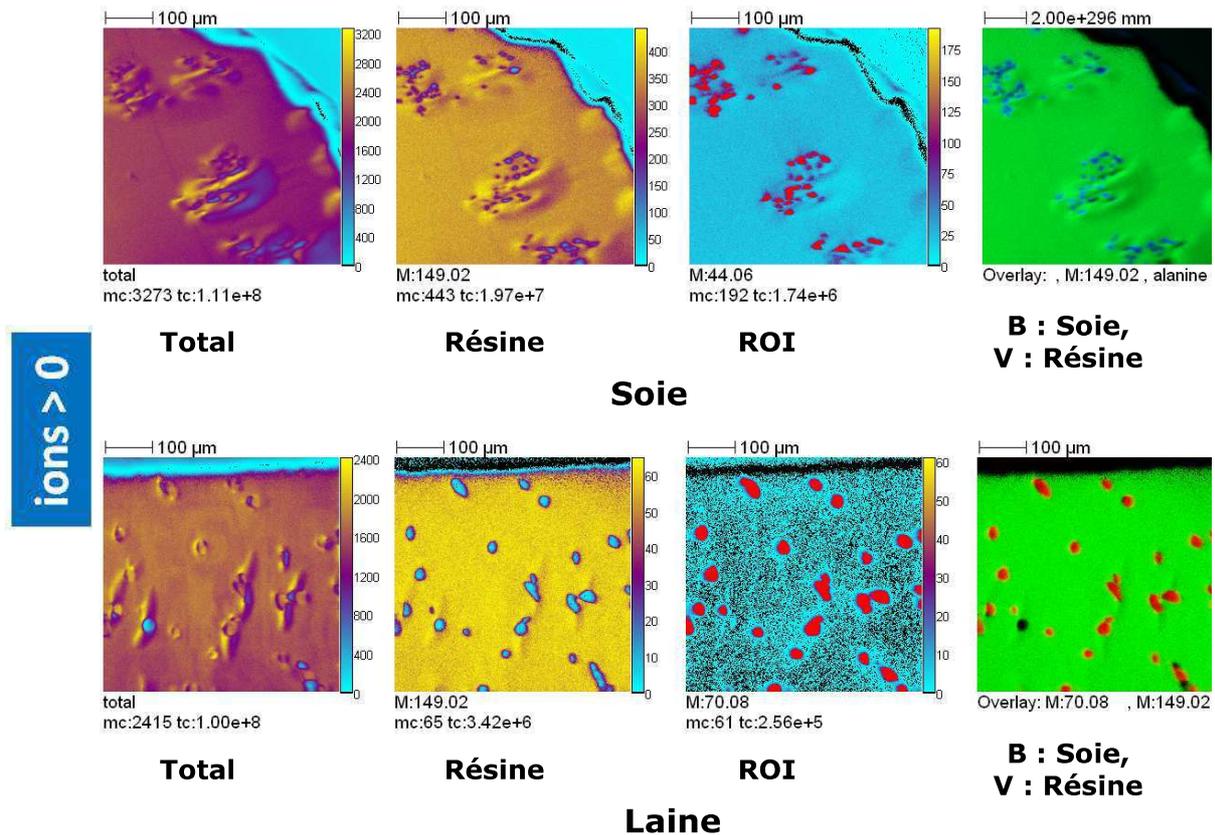


Figure 2-9 : Comparaison de la laine et de la soie. Images ioniques et superposition correspondants aux choix de la ROI. Mode d'ionisation positif. Taille des images : 500x500 μm^2 .

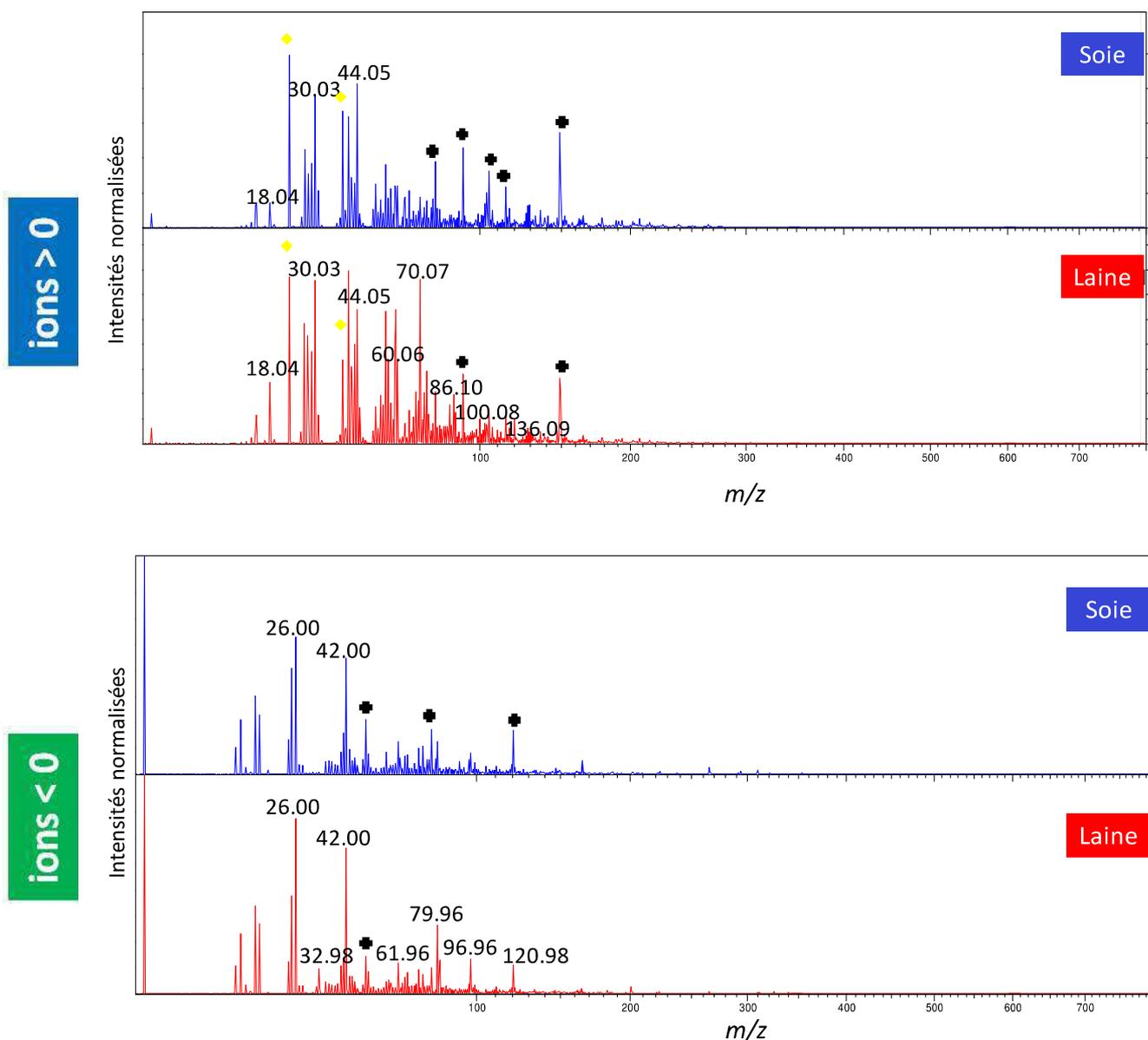


Figure 2-10 : Comparaison de la laine et de la soie. Spectres TOF-SIMS de la laine (en rouge) et de la soie (en bleu), en mode d'ionisation positif et négatif. ♦ Losanges jaunes : ions sodium et potassium (positif). + Croix noires : fragments correspondant à la résine d'inclusion.

Ainsi si l'on synthétise les résultats obtenus lors de nos études sur les fibres kératinisées :

- les protéines constituent la majeure partie des poils mais les composés soufrés sont absents de la partie centrale de la fibre (*medulla*) lorsque celle-ci est différenciée,
- les lipides sont présents en faible quantité, essentiellement dans la *medulla* en ce qui concerne les acides gras libres et les phospholipides, dans la cuticule pour le cholestérol et les céramides,
- les minéraux ne sont présents qu'à l'état de trace et la fibre est imperméable aux pollutions extérieures.

3 Analyses de cornes

Avant de présenter les analyses effectuées, nous rappelons l'anatomie des cornes de bovidé et de rhinocéros ainsi que la nature de la kératine de ces cornes.

3.1 Structure d'une corne de bovidé

3.1.1 Anatomie de la corne

Certains mammifères ongulés portent une⁶ ou plusieurs cornes sur la tête (Blainville, 1822). Celles-ci sont présentes en particulier par paire chez les bovidés. Ce phanère, important lors des combats, est cependant retiré sur le jeune bétail pour éviter des blessures sérieuses au sein du troupeau (Stafford, 2005).

Dans la plupart des cas, l'enveloppe cornée issue du derme papillaire (Marshall, 1991) recouvre un os, issu du crâne, appelé cornillon (Macgregor 1985). Ce dernier s'arrête au 2/3 de la corne, l'extrémité étant constituée de kératine uniquement (Delorme, 1958). Pour la confection de petits objets en corne (instruments de musique de type shofar, corne de berger ou alboka, corne à boire, peignes, manches de couverts) ou son utilisation dans la confection du mobilier (par exemple pour la marqueterie des meubles Boulle), l'os est retiré par immersion dans la chaux (Paris, 2004). Une autre technique consiste simplement à séparer l'étui corné de la cheville osseuse en frappant la corne contre une table. Enfin, si l'on ne souhaite pas récupérer l'ensemble de l'étui corné, une coupe transverse aux 2/3 de la hauteur permet de ne récupérer que de la corne (Krausz, 1992).

Dans le cas du rhinocéros, en revanche, la corne est uniquement constituée de fibres kératinisées (Ryder, 1962). Cette absence d'os central permet de distinguer les véritables cornes de rhinocéros, très prisées pour les manches de poignard, notamment dans le nord du Yémen (Singh, 2003) et surtout dans la médecine traditionnelle orientale (Huang, 1997), des imitations fabriquées à partir de cornes de bovidés (But, 1990). Outre l'utilisation de la poudre de corne de rhinocéros, supposée aphrodisiaque, Benítez rapporte l'utilisation de cornes comme amulettes. Ainsi, en Andalousie, les sections de corne de bouquetin sont supposées protéger contre le mauvais œil (Benítez, 2011).

L'anatomie des cornes de bovidés est souvent décrite de façon sommaire dans les ouvrages de biologie. Deux ouvrages⁷ de biologie vétérinaire décrivent cependant les structures histologiques de transition entre le cornillon et l'enveloppe cornée : l'os frontal de l'animal est recouvert, au niveau du périoste, d'un tissu conjonctif (de type derme papillaire et ectoderme) vascularisé et innervé (Doucet, 2001). La jonction avec l'enveloppe cornée, de nature épidermique, est assurée par une couche basale. La corne, lisse et régulière, est constituée d'un *stratum corneum* épais où la kératine est présente sous forme de tubule (cortex entourant une cavité médullaire centrale) et de zones intertubulaires. À la base du crâne, une fine peau, appelée *epikeras*, assure la jonction entre la peau du crâne et l'épiderme corné (Dellmann, 1981). Krölling décrit cette structure à l'aide d'un schéma annoté repris Figure 3-1. À notre connaissance, il n'existe pas de travaux présentant une coupe histologique de corne de bovidé avec son cornillon. L'atlas d'histologie vétérinaire de Bacha (Bacha, 2012)

⁶ C'est, par exemple, le cas du rhinocéros indien (*rhinoceros unicornis*).

⁷ Merci au Pr. J. Sautet (Anatomie-Embryologie-École Nationale Vétérinaire de Toulouse) pour ces indications. Notons qu'il existe cependant quelques études sur la morphologie de la corne de taureau. Celles-ci ont pour but de mettre en évidence les conséquences de l'*afeitado* sur la résistance mécanique des cornes lors des combats. L'*afeitado* consiste à éliminer la partie supérieure dure de l'étui corné afin de l'arrondir. Cette pratique est interdite par le règlement taurin espagnol et compromet la sélection de l'animal pour les corridas et les novilladas (Maillard, 1984).

présente une coupe colorée de la corne accrochée à la zone de transition (épiderme cornée, *stratum basale* et tissu conjonctif vascularisé).

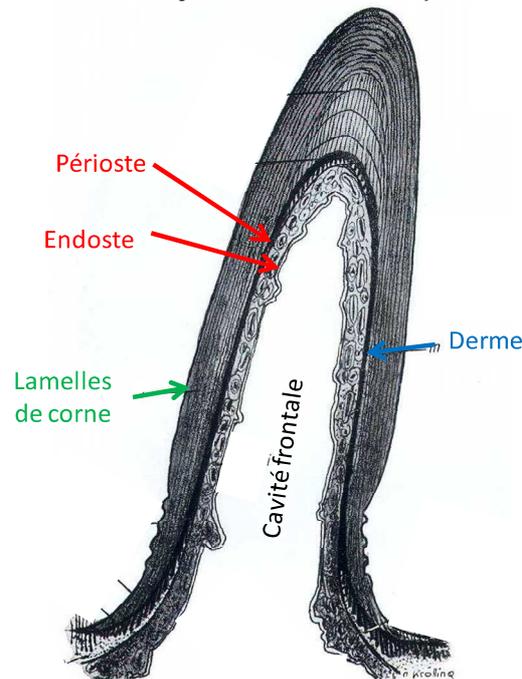


Figure 3-1 : Schéma, en coupe axiale, d'une corne de bovidé, d'après Krölling (Krölling, 1960). Les principales structures anatomiques sont indiquées.

3.1.2 Kératine de corne

Si l'étude macroscopique des cornes peut fournir quelques informations sur l'espèce et l'âge de l'animal concerné, la structure microscopique et la caractérisation chimique de la kératine de corne nécessite l'emploi de différentes méthodes d'analyse. Les études sur des cornes portent souvent sur leurs propriétés mécaniques afin de mieux comprendre leur résistance lors des combats entre animaux (Trimm, 2011). La modification des structures internes de la corne soumise à différentes contraintes sont alors souvent observées en microscopie électronique à balayage (Tombolato, 2010 et Li, 2011).

Pour l'étude chimique de la kératine, les spectroscopies vibrationnelles IR et Raman ainsi que la focalisation isoélectrique⁸ ont été utilisées. En spectroscopie Raman, l'étude d'Akhtar et Edwards (Akhtar, 1997a) s'intéresse, en particulier, à la conformation de la kératine dans différents matériaux kératinisés dont la corne (bandes amide I et amide III) et la configuration du pont disulfure. Paris (Paris, 2005) précise que cette technique permet de distinguer par exemple la corne (ou l'écaille) de l'os ou de l'ivoire qui contiennent, en plus, une bande d'élongation vers 960 cm^{-1} , liée à la présence de groupements phosphates. Pour la distinction de la corne et de l'écaille, d'aspects parfois très similaires, elle privilégie l'utilisation de la spectroscopie IR, en mode ATR. La décomposition spectrale de la bande amide I permet alors de caractériser la corne par une configuration de la kératine, majoritairement en hélice alpha. Le problème de fluorescence de ces matériaux, problématique en spectroscopie Raman, est aussi évité. La focalisation isoélectrique a quant à elle été utilisée pour distinguer les poudres de corne de buffle et de rhinocéros (Huang, 1997).

L'utilisation de la diffraction des rayons X est aussi rapportée (Singh, 2003) pour différencier les cornes, des os, des bois et de l'ivoire. En effet, la kératine de corne

⁸ Mise au point dans les années 1970, cette technique permet, grâce à un gradient de pH, de séparer les protéines d'un mélange, selon leur point isoélectrique ou pI (Vesterberg, 1971).

diffraite très mal au contraire des cristaux d'hydroxyapatite présents dans les autres matériaux étudiés.

La composition en acides aminés de la kératine de corne de bœuf a été publiée en 1954 (Ward, 1954) et celle de la corne de rhinocéros en 1966 (Crewther, 1966). Elles sont assez similaires, comme on le voit Tableau 3-1. La kératine de corne de bœuf se révèle néanmoins plus riche en glycine tandis que celle de corne de rhinocéros contient plus d'arginine et d'alanine dans sa séquence.

	Ala	Arg	Asp	Cys	Glu	Gly	His	Leu/Ileu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	OH-Pro	...
Rhinocéros	8.1	8.7	8.7	4.2	15.1	7.1	0.8	15.2	4.0	0.6	2.6	3.4	7.9	4.8	0.0	2.7	6.0	0.0	0
Bœuf	3.8	4.7	7.2	5.5	11.5	18.1	0.5	11.3	2.0	0.4	2.3	9.1	8.4	6.5	0.4	2.4	5.8	0.0	0

Tableau 3-1: Comparaison de la composition en acides aminés de la kératine de corne de bœuf (Ward, 1954) et de la kératine de corne de rhinocéros (Crewther, 1966).

3.2 Analyses de cornes de bovidés

3.2.1 Corne de bœuf moderne

3.2.1.1 L'échantillon et sa préparation

La corne de bœuf moderne (*Bos taurus*) étudiée ici (Figure 3-2 a) provient d'un masque de front de vache blanche charolaise de l'Allier. L'individu était un adulte âgé. Après la mort de l'animal, le front et les cornes ont été découpés afin de servir d'élément décoratif (trophée). Cette destination a permis d'obtenir une corne contenant encore l'os support (excroissance du crâne appelée cornillon), rarement conservé lorsque la corne est travaillée pour la décoration.⁹

Une section transverse de la corne, de 5 mm d'épaisseur, a été découpée à l'aide d'une scie à ruban: on voit sur la Figure 3-2 b la corne, de couleur beige, translucide, entourant l'os, mat et blanc. Puis des petits secteurs de la section quasi-circulaire ont été obtenus à la fraiseuse dentaire, autour de la zone de transition os/corne (Figure 3-2 c). La Figure 3-2 d permet de visualiser à l'échelle microscopique, de haut en bas de l'image, la corne, la fine zone de transition et l'os. On remarque, sur la droite de l'image que la zone de transition est fragilisée, probablement à cause des différentes contraintes mécaniques opérées par les opérations de découpe. Pour les analyses, nous nous sommes attachés à rechercher des zones de coupe et d'analyse où la zone de transition était peu détériorée.

L'échantillon, de plusieurs mm², a ensuite été préparé selon le protocole décrit au chapitre 1 (paragraphe 2.4.2.4.1). L'allure de coupes déposées sur différents supports (plaque de silicium, lame de verre et plot en inox) sont présentées Figure 3-2 (e-h). Les plis résiduels, en particulier dans la partie corne sont liés à la taille de coupe. Celle-ci peut difficilement être réduite compte tenu de la fragilité mécanique de la zone de transition. Nous avons donc déposé un grand nombre de coupes, en essayant d'optimiser la récupération sur l'eau et le dépôt sur les différents supports.

⁹ Merci à M. Jean-Paul Humez, éleveur à St-Hérent (Puy-de Dôme) de nous avoir permis d'effectuer un prélèvement sur cette corne.

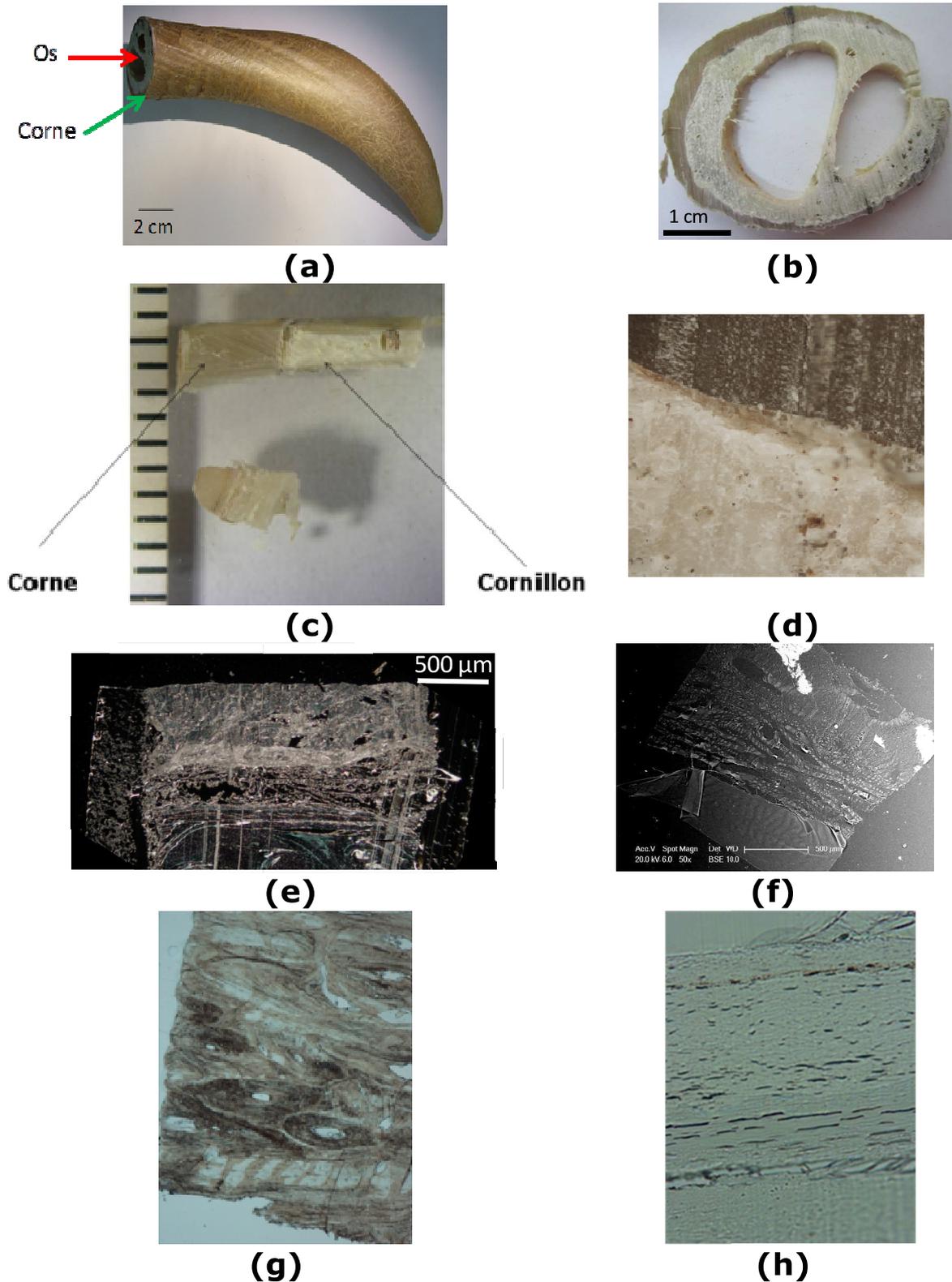


Figure 3-2 : Corne de vache moderne. (a) Photographie de la corne étudiée. Les localisations relatives de l'étui corné et de l'os (cornillon) sont indiquées. (b) Photographie de la tranche du prélèvement. (c) Photographie, sous loupe binoculaire, de sections fraisées dans la tranche. Chaque graduation noire de la mire est espacée d'1 mm. (d-e) Images, au microscope optique, de la zone de transition os/corne et (e) de la coupe déposée sur un wafer de silicium. (f) Image MEB, en mode BSE, de la coupe déposée sur un plot en inox. (g-h) Image au microscope optique de la coupe déposée sur une lame de verre (g) zoom sur la partie os (X10) et (h) sur la partie corne (x20).

3.2.1.2 Stratigraphie et composition en acides aminés

Afin de compléter l'étude structurale préliminaire de la corne, les deux zones (osseuse et cornée) repérées en microscopie optique et électronique ont été analysées en microspectroscopie infrarouge. Le bloc d'inclusion a été analysé en réflexion spéculaire à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier de type Digilab Excalibur FTS 4000, couplé à un microscope UMA 600 (Digilab-Varian, Holliston, USA). Les deux zones étudiées (Figure 3-3 a et b) ont une taille de $250 \times 125 \mu\text{m}^2$. 1024 balayages ont été effectués et les spectres ont été enregistrés avec une résolution de 4 cm^{-1} , entre 4000 et 400 cm^{-1} .

Les deux spectres acquis sur les zones présentées Figure 3-3 a (partie osseuse, en rouge) et b (partie corne, en vert) sont présentés Figure 3-3 c. Ils confirment la présence de protéines, dans les deux zones, comme attendu. On remarque en effet la présence des bandes de vibrations associées à la liaison peptidique (Barth, 2007), de type amide I (centrée à 1655 cm^{-1} pour la corne et 1657 cm^{-1} pour l'os), amide II (à 1545 cm^{-1} pour la corne et 1546 cm^{-1} pour l'os) et amide III (bien marquée, centrée à 1236 cm^{-1} dans le cas de la corne et plus faible, centrée à 1241 cm^{-1} dans le cas de l'os) ainsi que les bandes amide A (3288 cm^{-1} pour la corne et 3323 cm^{-1} pour l'os) et, dans une moindre mesure, amide B (3068 cm^{-1} pour la corne et 3085 cm^{-1} pour l'os). S'ajoutent, dans le cas de l'os, des bandes associées à la présence de la phase minérale composée d'hydroxyapatite : bande phosphate à 1009 cm^{-1} et carbonate à 872 et 1414 cm^{-1} . Ainsi les bandes d'absorption identifiées et la proportion relative des bandes protéiques et minérales dans le spectre rouge correspondent exactement à un tissu osseux (Boskey, 2007).

Les bandes à 2960 et 2930 cm^{-1} sont respectivement associées à la vibration asymétrique de la liaison C-H dans les groupements CH_3 et CH_2 . Ces signaux peuvent être associés soit aux lipides, soit aux protéines présents dans l'échantillon (Bantignies, 1998).

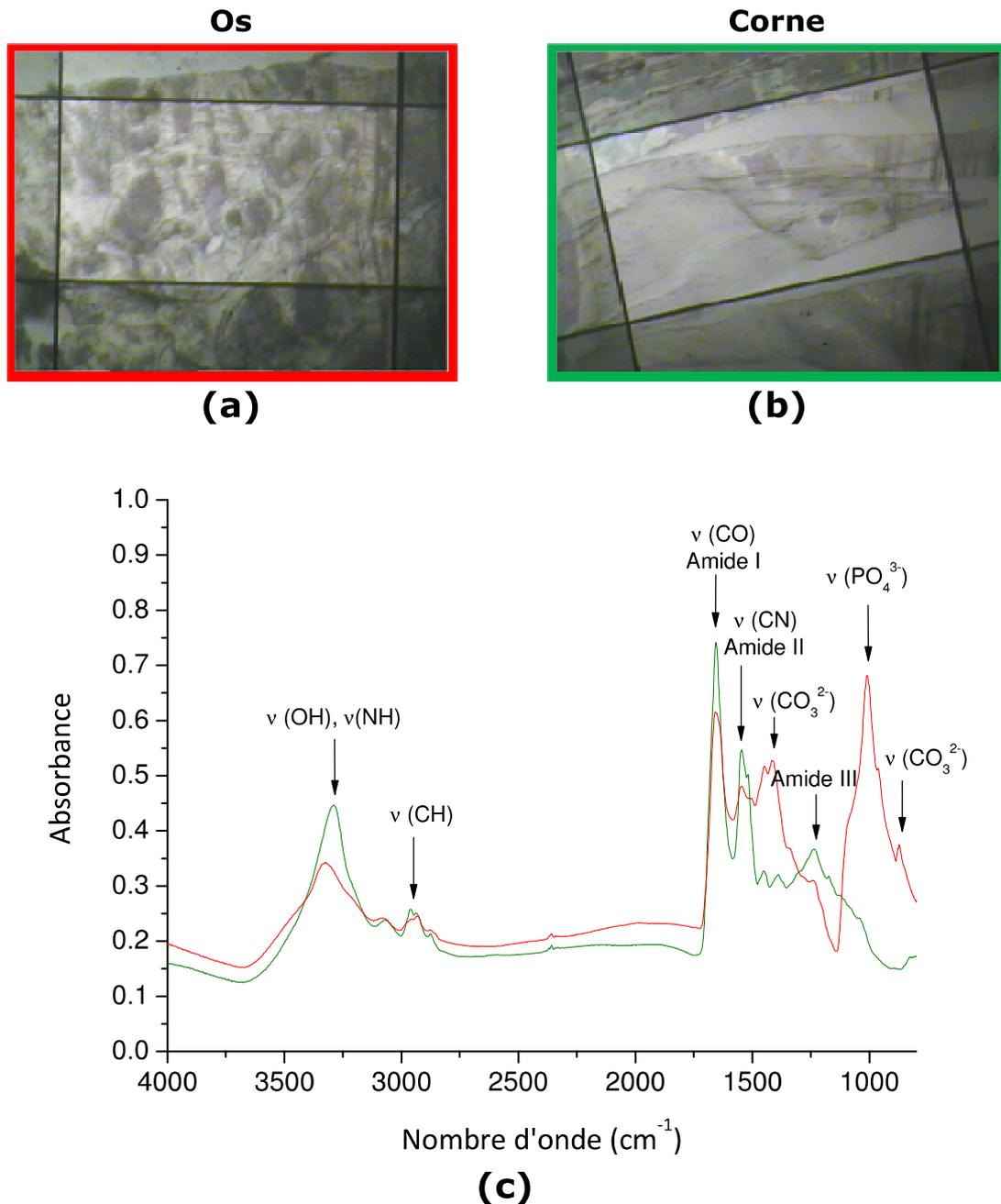


Figure 3-3: Analyse de la corne moderne en microspectroscopie infrarouge. (a) Vue sous le microscope de la zone osseuse (b) et de la zone de la corne analysées et (c) Spectres obtenus sur ces deux zones (os en rouge et corne en vert).

La coupe présentée Figure 3-2 e a été analysée en TOF-SIMS. En raison de sa taille, l'analyse a été réalisée en mode *stage scan*. Les spectres étant dominés dans les deux modes d'ionisation par des signaux correspondant à la résine d'inclusion, nous avons sélectionné la zone correspondant à l'échantillon uniquement. Celle-ci entoure en effet la coupe et consolide la zone de transition fragile. La sélection s'effectue grâce à l'image de l'ion de rapport m/z 149.02 en mode d'ionisation positif. La Figure 3-4 a présente, en mode d'ionisation positif, l'image ionique totale, l'image correspondant à la distribution de l'ion m/z 149.02 puis en rouge la sélection de la zone (ROI) correspondant à l'échantillon sur cette image, complémentaire de celle de la résine.

On extrait alors le spectre correspondant uniquement à l'échantillon, c'est-à-dire à la zone d'intérêt (ROI 1) présentée Figure 3-4 a. Celui-ci est également présenté Figure 3-4 a, dans un cadre jaune. Ce spectre, en mode d'ionisation positif, présente, outre quelques signaux résiduels ou communs avec la résine d'inclusion (croix noires), essentiellement des pics correspondant aux phases organiques et minérales de l'os (voir chapitre 1, paragraphe.2.5.2.3.3) : acides aminés majoritaires dans le collagène (carrés verts), calcium (triangles bleus) et hydroxyapatite (ronds rouges). Les images ioniques correspondant aux hydroxydes de calcium et aux fragments d'hydroxyapatite (Figure 3-5 d) permettent de délimiter la zone correspondant à l'os et d'extraire le spectre de cette zone (ROI rouge sur la dernière image de la Figure 3-4 a) : celui-ci est présenté Figure 3-4 a, dans le cadre rouge. Il correspond bien à la signature spectrale d'un os tel que présenté dans le chapitre 1.

Les images ioniques correspondant aux fragments d'acides aminés m/z 30.03 et m/z 70.07, traditionnellement attribués à la glycine et à la proline (Figure 3-5), permettent de délimiter à la main la zone correspondant à la corne (ROI verte sur la dernière image Figure 3-4 a), une fois les zones correspondant à l'os (ROI rouge) et à la résine (ROI bleue) connues. Le spectre extrait de cette ROI uniquement est présenté Figure 3-4 a, dans le cadre vert.

On détecte majoritairement des fragments d'acides aminés (carrés verts), dans l'ordre croissant de rapport m/z : glycine (m/z 30.03), alanine (m/z 44.05), sérine (m/z 60.06), proline (m/z 70.07), acide glutamique/glutamine (m/z 84.04) et leucine/isoleucine (m/z 86.10). Cette signature spectrale est cohérente avec la composition en acides aminés de la kératine de corne dominée par la glycine, la glutamine, leucine et proline. La Figure 3-4 b permet de comparer les spectres de la corne et de l'os : on constate que les deux matériaux ont bien des signatures spectrales différentes, liées pour une part à la présence d'une phase minérale dans l'os uniquement, et d'autre part par des compositions en acides aminés différentes pour le collagène de l'os et la kératine de corne. Le spectre de la Figure 3-4 (cadre vert) comporte, en outre, quelques pics supplémentaires aux rapports m/z plus élevés correspondant à des fragments lipidiques (Tahallah, 2008) : fragment $[C_5H_{15}NO_4P]^+$, m/z 184.10 (carré violet évidé) et ions correspondant au cholestérol (Touboul, 2004) : m/z 369.32 ($[M+H-H_2O]^+$) et m/z 385.32 ($[M-H]^+$) (ronds violets évidés).

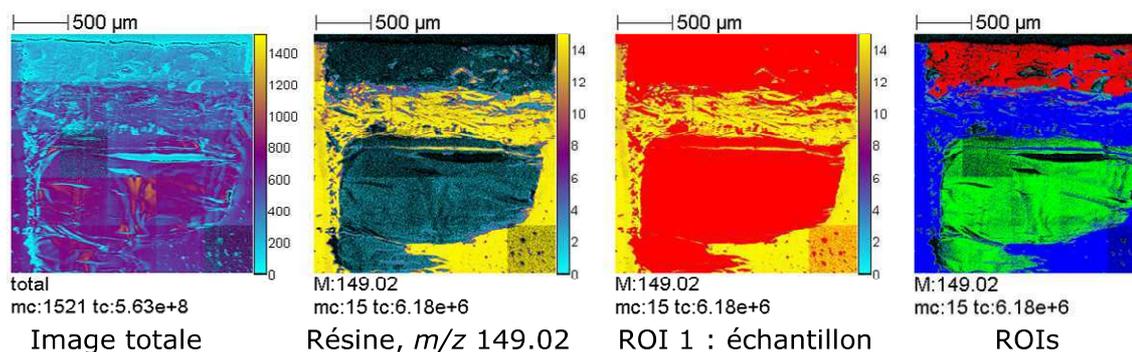
La répartition spatiale des différents fragments d'acides aminés dans la coupe est présentée Figure 3-5 a (acides aminés correspondant majoritairement à la kératine de la corne) et Figure 3-5 b (acides aminés correspondant majoritairement au collagène de l'os). On remarque cependant la localisation particulière du fragment m/z 86.13. La colocalisation de cet ion avec les autres ions correspondant à la phosphocholine- m/z 104.12 ; m/z 166.07 et m/z 184.10 (Figure 3-5 c)- permet l'identification de ce lipide dans la zone de transition (Tahallah, 2008). Il s'agit d'un phospholipide constituant les membranes cellulaires.

Ces images permettent ainsi de confirmer, du fait de la colocalisation des différents ions et fragments, la stratigraphie de la coupe : os en haut, corne en bas

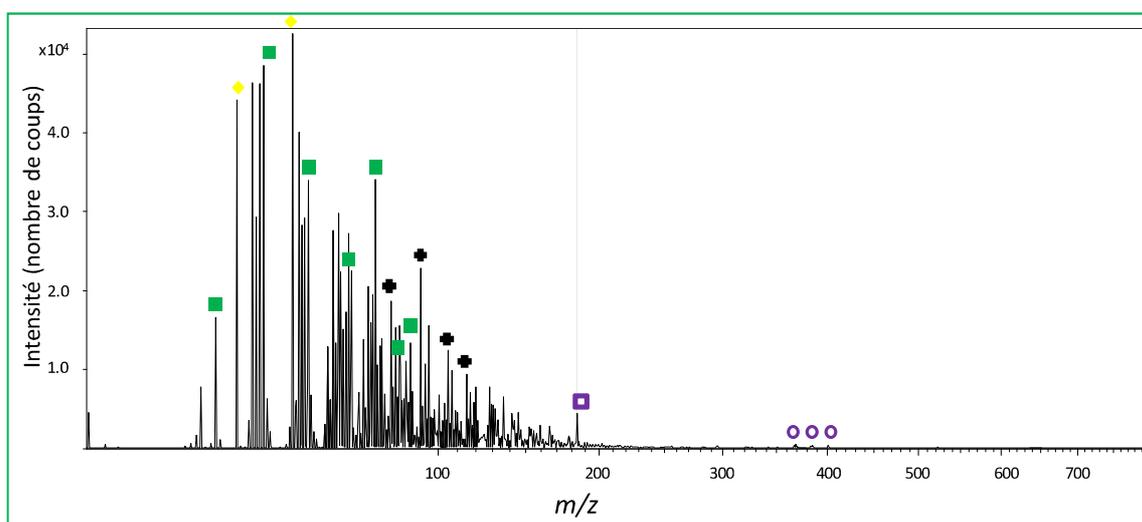
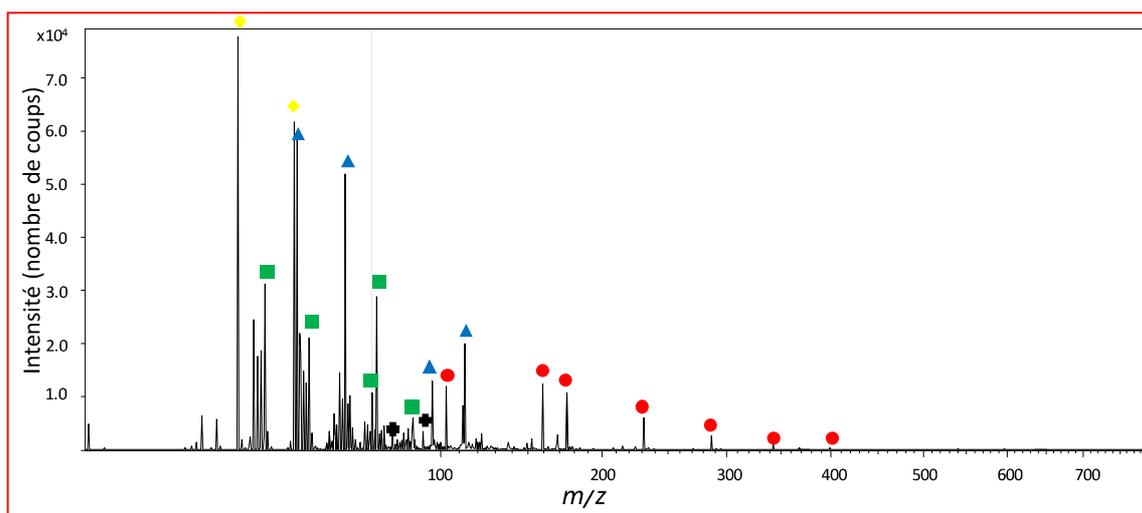
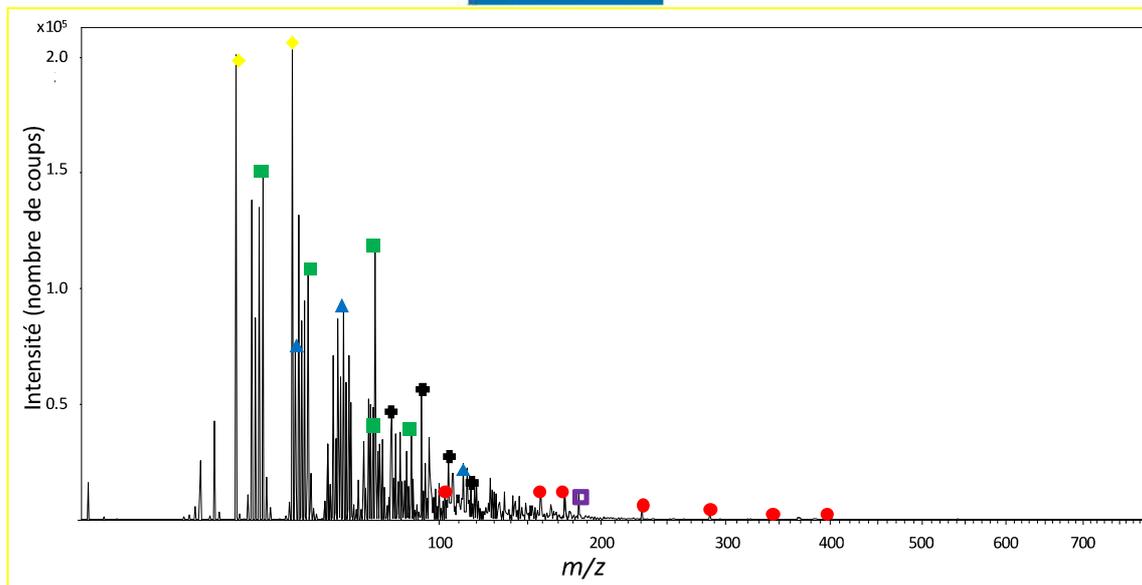
et zone de transition contenant (entre autres) de la phosphocholine, consolidée en grande partie par la résine d'inclusion.

En mode d'ionisation négatif, le spectre est dominé par les pics de la résine et on adopte la même méthode d'étude qu'en mode d'ionisation positif. Dans le spectre extrait de la ROI correspondant à l'échantillon uniquement, on identifie des ions correspondant à la présence de protéines (ions CN^- et CNO^-) et aux ions phosphates (PO_2^- et PO_3^-).

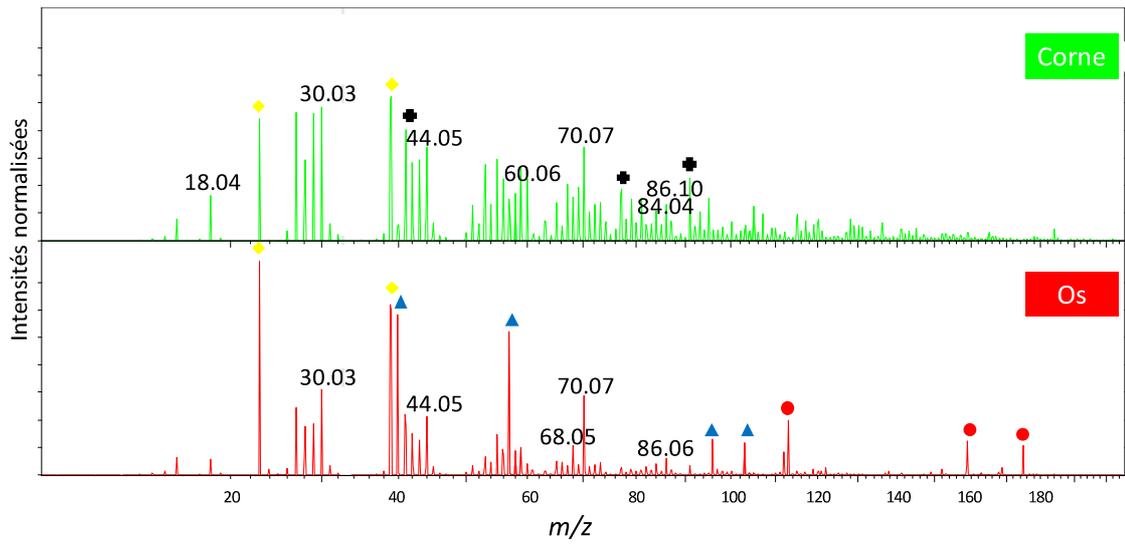
Si les ions correspondant aux fragments de la chaîne polypeptidique sont répartis sur l'ensemble de l'échantillon (Figure 3-5), les images ioniques des ions phosphates (Figure 3-5) montrent qu'ils sont localisés uniquement dans la partie supérieure de l'image correspondant à l'os. Du fluor et du chlore sont aussi localisés spécifiquement dans cette zone (Figure 3-5). L'image ionique du soufre (ion HS^- , m/z 32.98) montre que celui-ci est colocalisée avec la corne, ce qui est logique puisque la kératine est une protéine particulièrement riche en soufre du fait de la présence abondante de l'acide aminé cystine. Les autres ions soufrés, identifiés dans les acides aminés soufrés (voir chapitre 1, paragraphe 2.5.2.1.2) sont aussi localisés dans cette partie de la coupe (Figure 3-5). On localise enfin une légère pollution de type LABS (voir chapitre 1, paragraphe 2.3.3.2), dans la zone de transition consolidée par la résine d'inclusion, du côté de la partie osseuse.



ions > 0



(a)

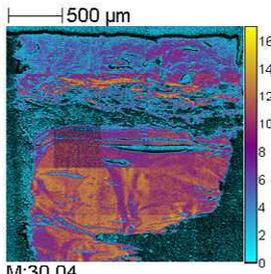


(b)

Figure 3-4 : Analyse TOF-SIMS de la corne moderne en mode d'ionisation positif : (a) Images ioniques globale, de la résine et des zones d'intérêt (ROI) et spectres correspondant à l'échantillon uniquement (résine exclue), extrait de la ROI 1 (cadre jaune), uniquement à l'os (cadre rouge) et à la corne (cadre vert). (b) Comparaison des spectres de la corne (vert) et de l'os (rouge) sur la gamme m/z 1-200. ● Ronds rouges : fragments d'hydroxyapatite. ▲ Triangles bleus : ions calcium et hydroxyde de calcium. ■ Carrés verts : fragments d'acides aminés. ◆ Losanges jaunes : ions sodium et potassium. ✚ Croix noires : fragments correspondant à la résine d'inclusion. □ Carré violet évidé : phosphocholine. ○ Ronds violets évidés : cholestérol.

Polypeptides

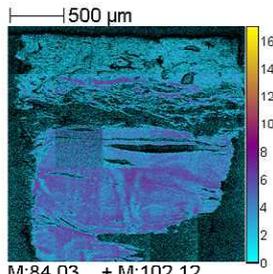
ions > 0



M:30.04
mc:17 tc:6.16e+6

m/z 30.04

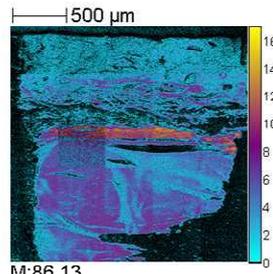
Gly



M:84.03 + M:102.12
mc:17 tc:2.50e+6

m/z 84.03+102.12

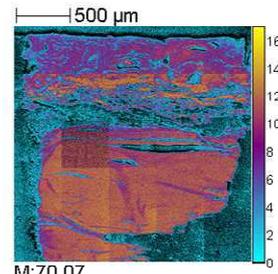
Glu



M:86.13
mc:17 tc:3.12e+6

m/z 86.13

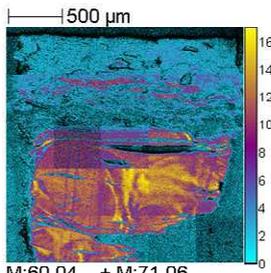
Leu/Ileu



M:70.07
mc:17 tc:7.22e+6

m/z 70.07

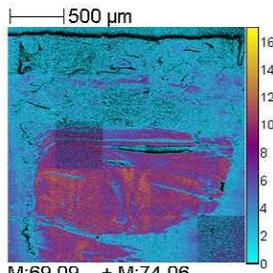
Pro



M:60.04 + M:71.06
mc:17 tc:5.43e+6

m/z 60.04+71.06

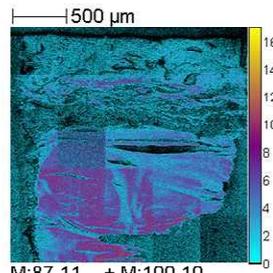
Ser



M:69.09 + M:74.06
mc:17 tc:5.13e+6

m/z 69.09+74.06

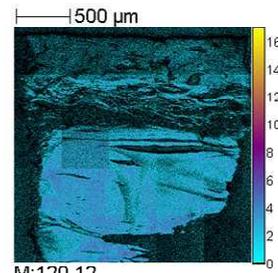
Thr



M:87.11 + M:100.10
mc:17 tc:2.77e+6

m/z 87.11+100.10

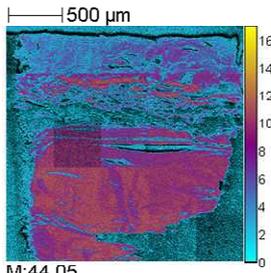
Arg



M:120.12
mc:17 tc:1.21e+6

m/z 120.12

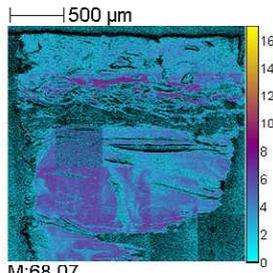
Phe



M:44.05
mc:17 tc:5.89e+6

m/z 44.05

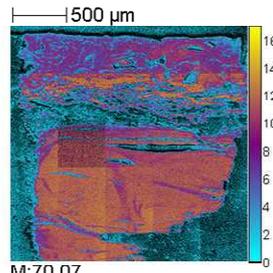
Ala



M:68.07
mc:17 tc:2.82e+6

m/z 68.07

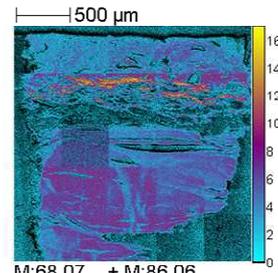
OH-Pro



M:70.07
mc:17 tc:7.22e+6

m/z 70.07

Pro

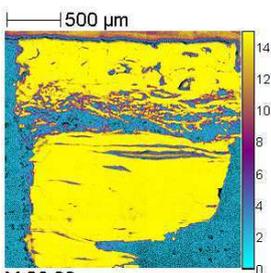


M:68.07 + M:86.06
mc:17 tc:3.86e+6

Somme=

OH-Pro

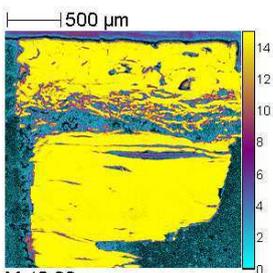
ions < 0



M:26.00
mc:15 tc:1.25e+7

m/z 26.00

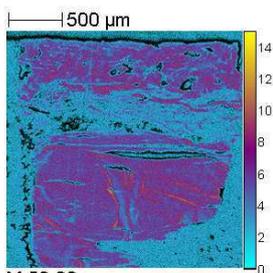
CN⁻



M:42.00
mc:15 tc:1.19e+7

m/z 42.00

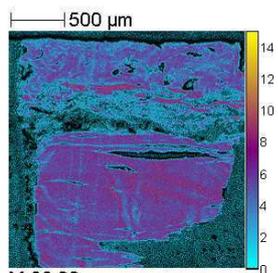
CNO⁻



M:50.00
mc:15 tc:4.89e+6

m/z 50.00

C₃N⁻

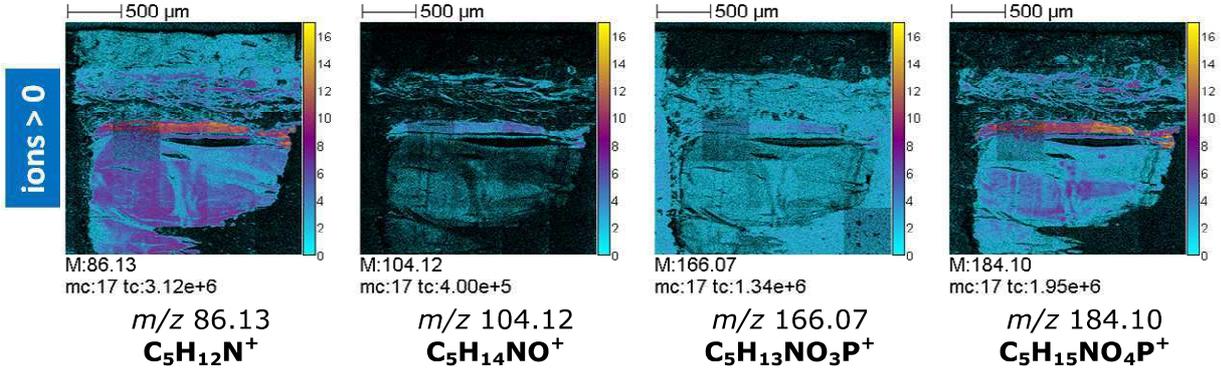


M:66.00
mc:15 tc:4.04e+6

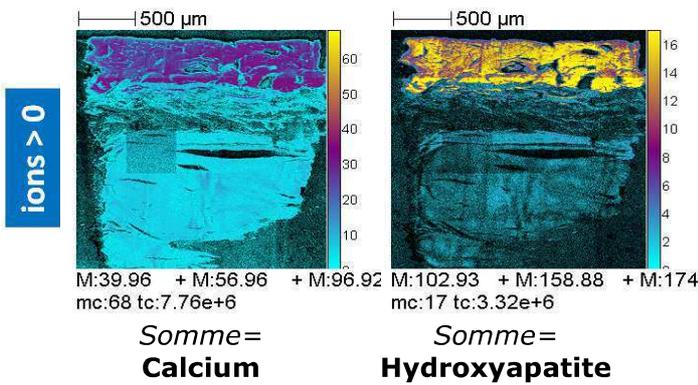
m/z 66.00

C₂N₃⁻

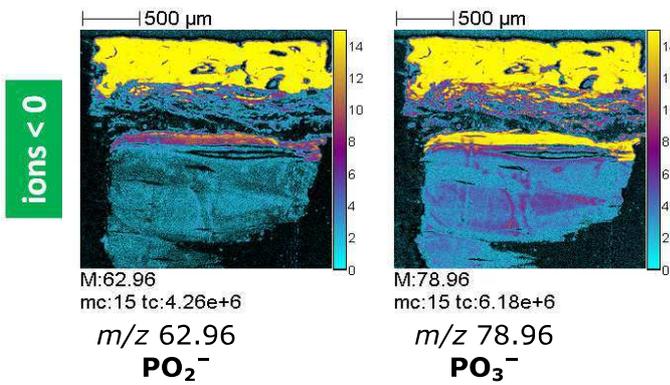
Phosphocholine



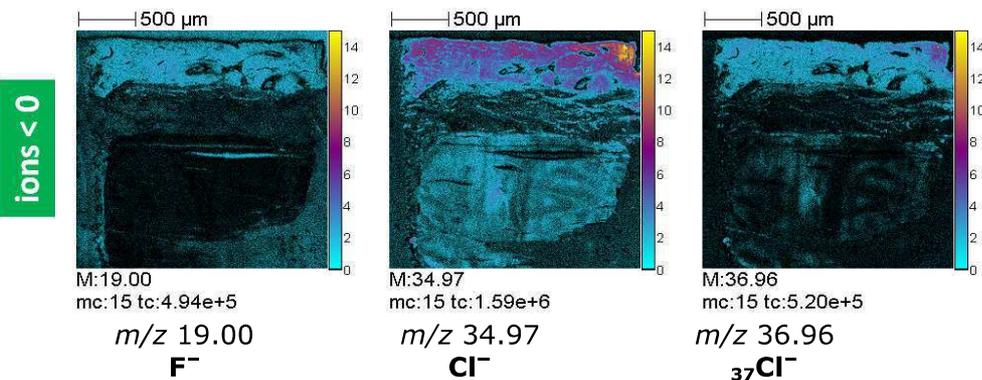
Hydroxyapatite



Phosphates



Minéraux



Espèces sulfurées

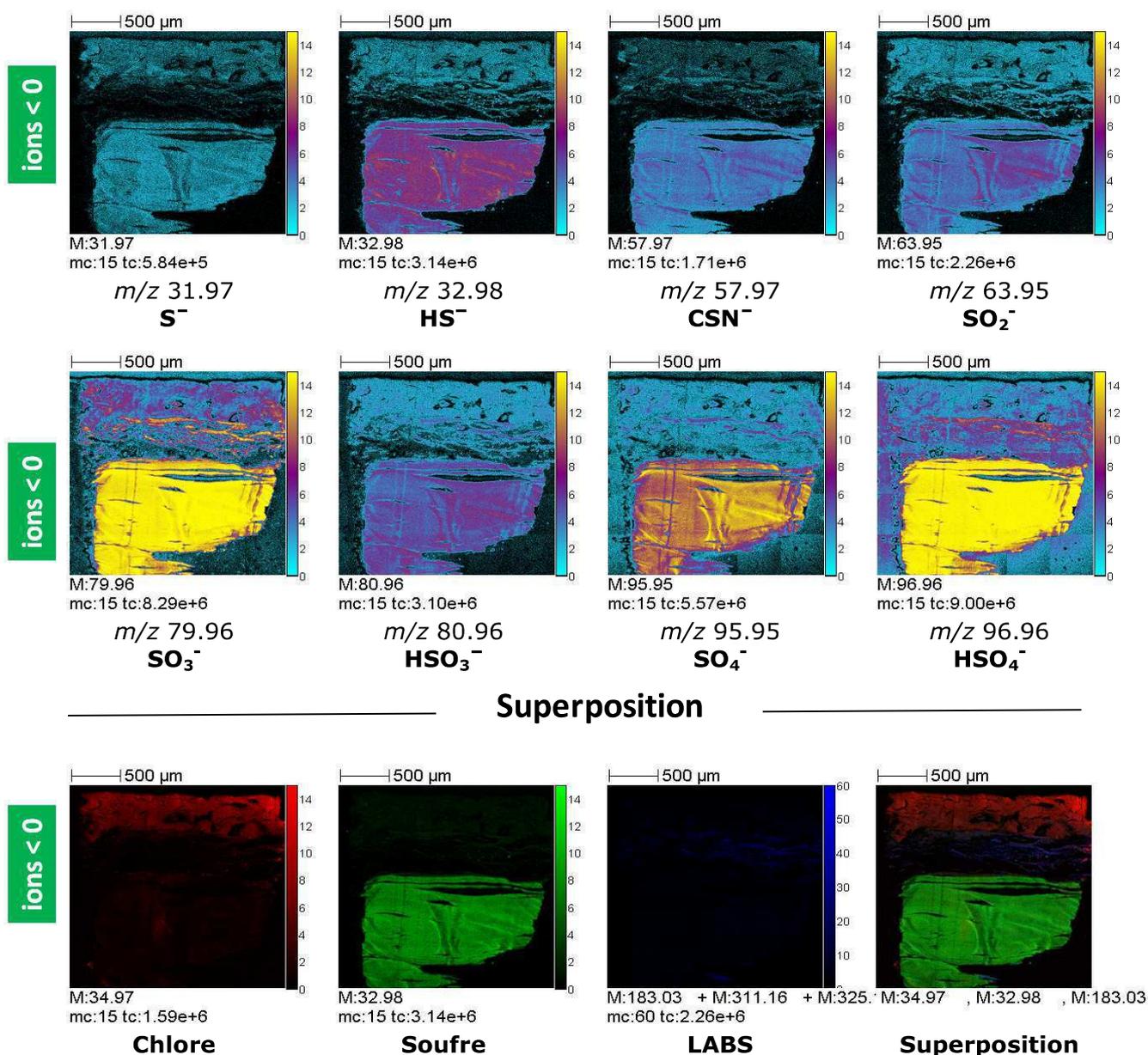


Figure 3-5: Images en mode d'ionisation positif de la corne moderne : répartition spatiale des différents fragments d'acides aminés majoritaires dans la corne (kératine) et dans l'os (collagène), des fragments polypeptidiques, de la phosphocholine, de la phase minérale de l'os (calcium et hydroxyapatite) et des espèces sulfurées (corne) puis superposition des images ioniques du soufre (vert), du chlore (rouge) et somme des images ioniques des ions fragments du LABS (en bleu). Les images ont été normalisées par rapport à l'image la plus intense. Taille des images TOF-SIMS : 2.2 x 2.2 mm.

Ainsi la stratigraphie de l'échantillon est confirmée, comme le montre la superposition des images ioniques correspondant au soufre caractéristique de la corne (en vert), au chlore présent dans l'os (en rouge) et à la somme des ions correspondant à la pollution au LABS (en bleu), Figure 3-5.

Les spectres extraits de la partie corne et de la partie os (grâce aux ROI définies à partir des images ioniques du soufre pour la corne et des ions phosphates pour l'os) sont comparés Figure 3-6. Comme les aires des zones d'intérêt correspondantes sont différentes, nous avons normalisé les intensités par rapport au courant ionique total. On constate que le spectre de la partie osseuse correspond effectivement à celui présenté pour un os contemporain au chapitre 1 (Figure 2-24, paragraphe 2.5.2.3 3). Le spectre de la corne se distingue par l'absence de signaux correspondant aux phosphates, absents dans la corne, et par la présence de pics correspondant aux sulfates. Notons toutefois que ces ions n'ont pas été détectés dans les références de kératine et d'acides aminés sulfurés, en mode d'ionisation négatif.

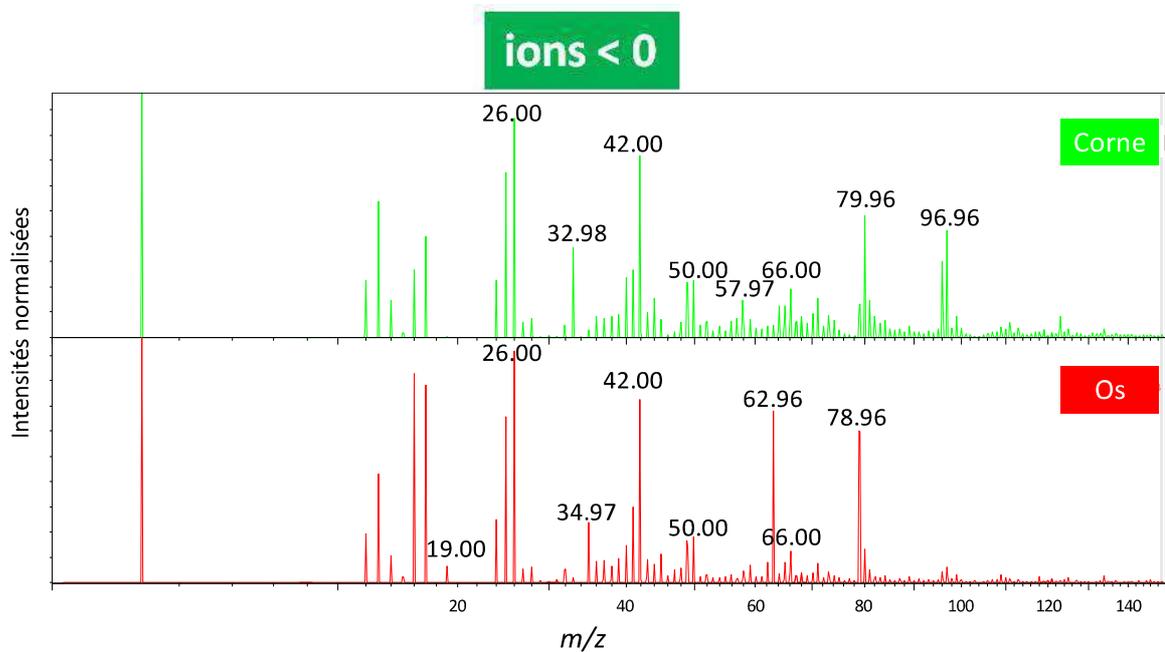


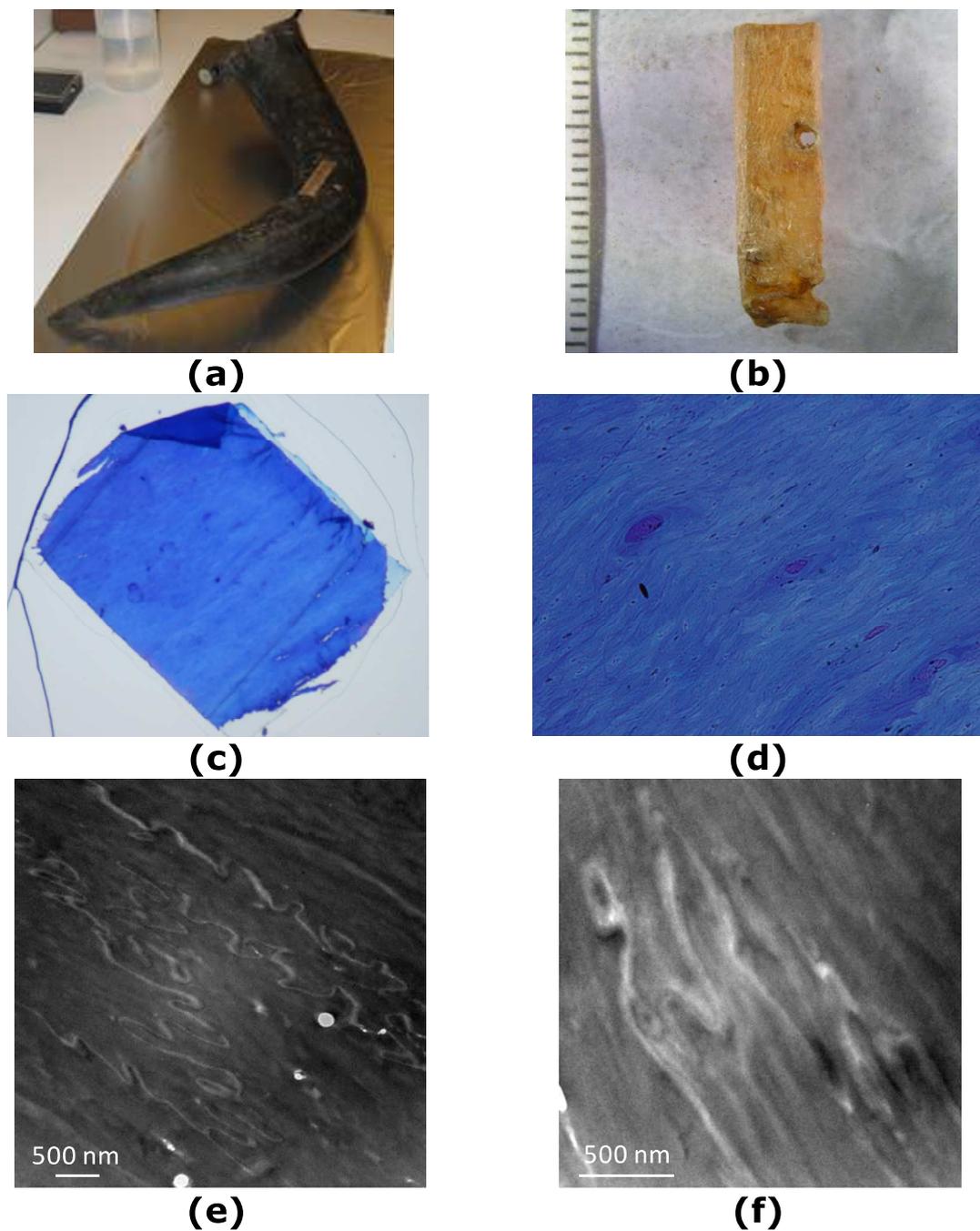
Figure 3-6 : Comparaison des spectres, en mode d'ionisation négatif, de la corne (en vert) et de l'os (en rouge) sur la gamme m/z 1-150.

3.2.2 Comparaison avec une corne de bœuf ancienne

L'échantillon de corne ancienne a été prélevé sur une corne à boire d'Europe centrale (Figure 3-7), provenant d'un auroch adulte. Représenté, comme le rhinocéros laineux (voir paragraphe suivant), sur les peintures des grottes ornées, à Lascaux par exemple (Brel, 2004), l'auroch ou urus (*Bos primigenius*) était un grand bovidé sauvage. Il s'est éteint au début du XVII^{ème} siècle (Rokosz, 1995 ; van Vuure, 2005). Apparu au Pléistocène moyen, il peuplait l'Europe, l'Asie et l'Afrique du Nord (Guintard, 2005). En raison de sa taille (1 m 50 à 1 m70 au garrot) et de sa force, cet animal sauvage était difficile à tuer et ses grandes et larges cornes (jusqu'à 1m de long et 55 cm de circonférence avec l'étui corné) étaient considérées comme des trophées et souvent décorées à l'aide d'éléments métalliques pour servir de corne à boire. Jules César, dans le passage de *la Guerre des Gaules* sur la forêt d'Orcynie (actuelle Forêt Noire), décrit cette pratique chez les peuples germains (Caesar, -52).

La taille (72 cm de long, 32 cm de circonférence) et la forme de la corne étudiée ont permis ici l'identification (Morel, 2003). Conservée au musée Vert du Mans, elle a fait l'objet d'une étude radiographique et a été datée au C2RMF, par le carbone 14, entre la moitié du XII^{ème} et la moitié du XIII^{ème} siècle après J.-C (Richardin, 2010). Il s'agit d'un spécimen très rare en France comme en Europe. La présence d'ornementations métalliques, vraisemblablement en cuivre, confirmerait l'utilisation en corne à boire (Morel, 2003).

L'échantillon inclus était de couleur jaune (Figure 3-7 b), le résidu noir inconnu visible sur la photographie de la Figure 3-7 a ayant été retiré par abrasion en vue de la datation radiocarbone. Le protocole de préparation suivi correspond à celui décrit au chapitre 1, paragraphe 2.4.2.4.1. L'allure des coupes obtenues, colorées au bleu de méthylène est présentée Figure 3-7 c. Un zoom permet d'observer un aspect strié, cohérent avec la structure lamellaire dense de la corne des bovidés (Figure 3-7 d). Certaines zones, elliptiques, apparaissent violettes : il s'agit vraisemblablement des tubules de la corne, incluses dans la matrice lamellaire (Tombolato, 2010). La bonne tenue du tissu à la coupe a permis la réalisation de coupes ultrafines (90 nm) et l'observation des structures au microscope électronique à transmission (Figure 3-7 e et f). On observe, à cette échelle, la présence de filaments torsadés orientés selon la même direction. Il pourrait s'agir, compte tenu de leur taille, des filaments intermédiaires constituant les tubules de la corne.



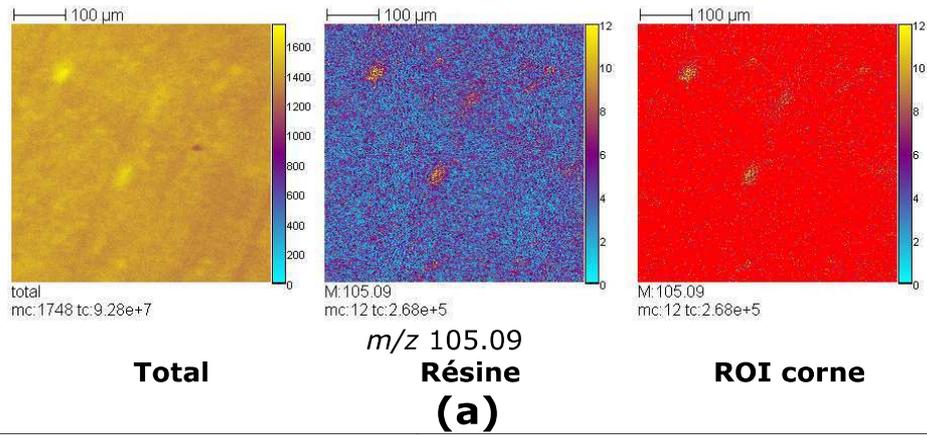
L'analyse TOF-SIMS a été réalisée sur la partie centrale de la coupe, sur une fenêtre de 500x500 μm^2 . Dans un premier temps, comme dans les autres études, nous nous sommes affranchis de la présence de la résine dans la coupe de tissu.

La Figure 3-8 a présente l'image ionique totale en mode d'ionisation positif, l'image ionique correspondant à un fragment de la résine polyester et la ROI complémentaire à cette image correspondant uniquement à la corne. Le spectre extrait de cette ROI est présenté Figure 3-8 b (spectre vert foncé) et comparé au spectre de la corne moderne (ROI correspondant à l'étui corné tel qu'expliqué au paragraphe précédent). On remarque que les deux spectres ont une allure très similaire : ainsi les pics correspondant aux fragments d'acides aminés majoritaires sont présents dans les deux cas. En revanche, leurs proportions relatives sont variables : les proportions d'arginine (m/z 100.08), de phénylalanine (m/z 120.08) et de tyrosine (m/z 136.09) semblent plus importantes dans le cas de la corne ancienne.

En mode d'ionisation négatif, le spectre extrait de l'image du tissu dépourvu de résine d'inclusion (Figure 3-8 c) est identique à celui obtenu pour la corne moderne (spectre vert, Figure 3-6) : fragments de chaîne polypeptidique, ion soufre et ions sulfates. La répartition de ces ions est, en outre, homogène sur l'ensemble de la coupe comme on peut le voir Figure 3-8 d. En revanche, les ions phosphates, détectés en faible quantité, se répartissent en grains (Figure 3-8 d). Ces grains correspondent aux tubules visualisés sur les images histologiques qui contiennent donc un composé phosphaté inconnu.

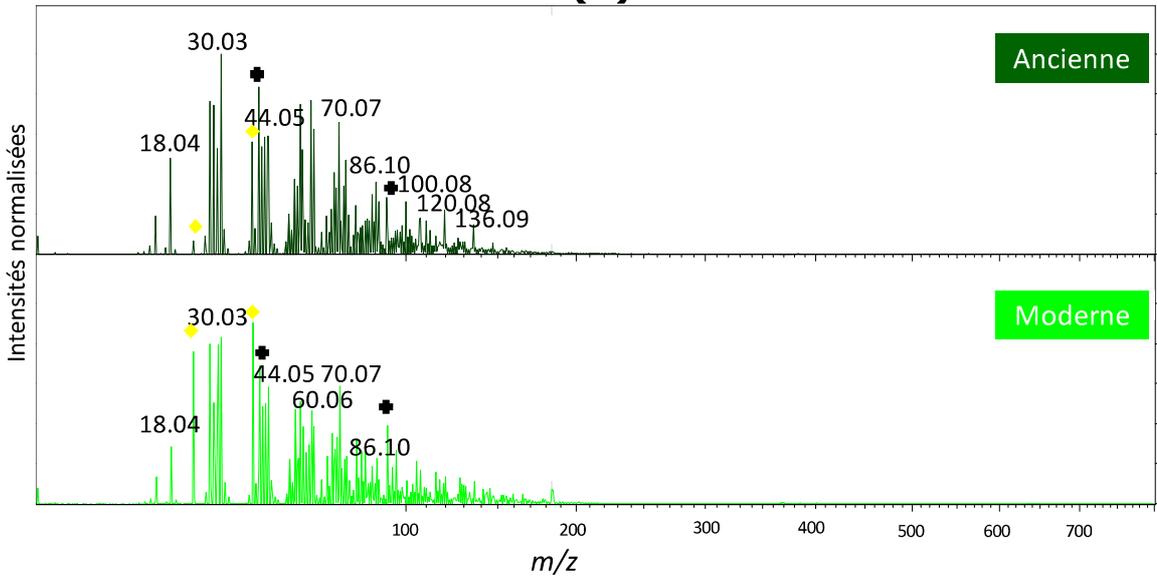
Le spectre en mode d'ionisation négatif fait aussi apparaître la présence de fragments lipidiques correspondant aux acides gras saturés C16 :0 (acide palmitique, m/z 255.24) et C18 :0 (acide stéarique, m/z 283.28). Ces pics sont cependant très faibles par rapport à ceux correspondant aux signaux protéiques provenant de la kératine de la corne.

ions > 0



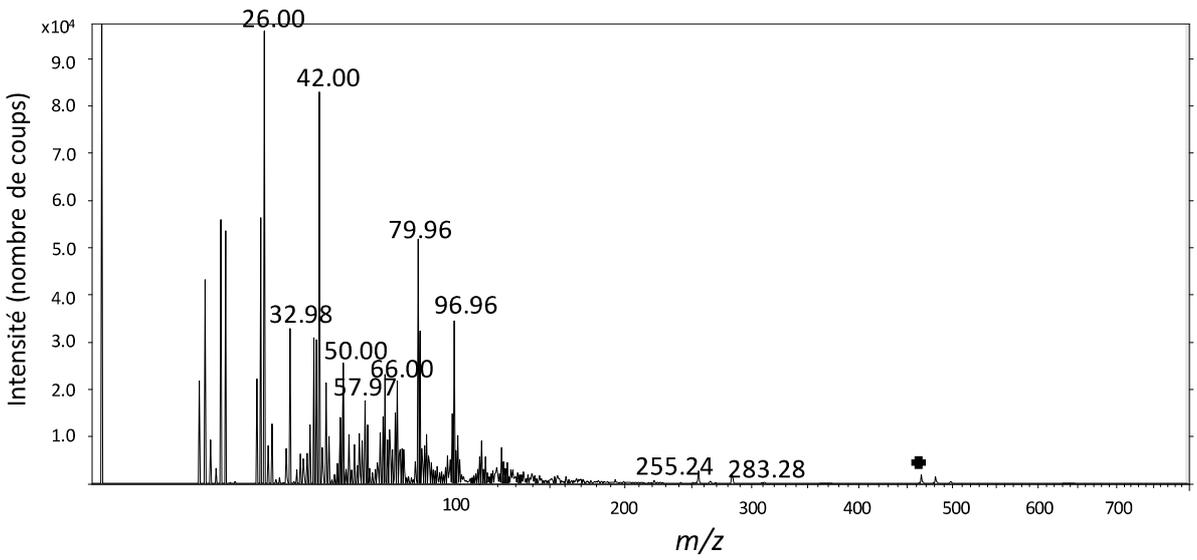
(a)

ions > 0



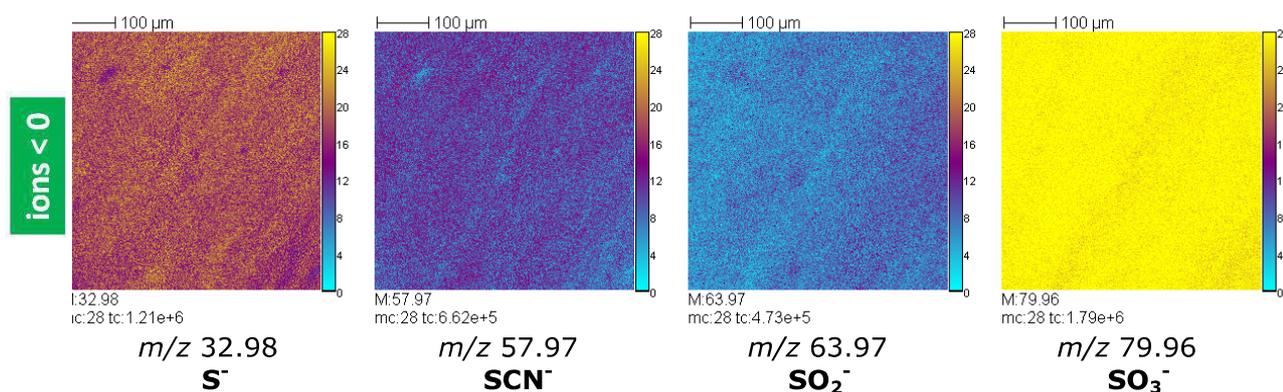
(b)

ions < 0

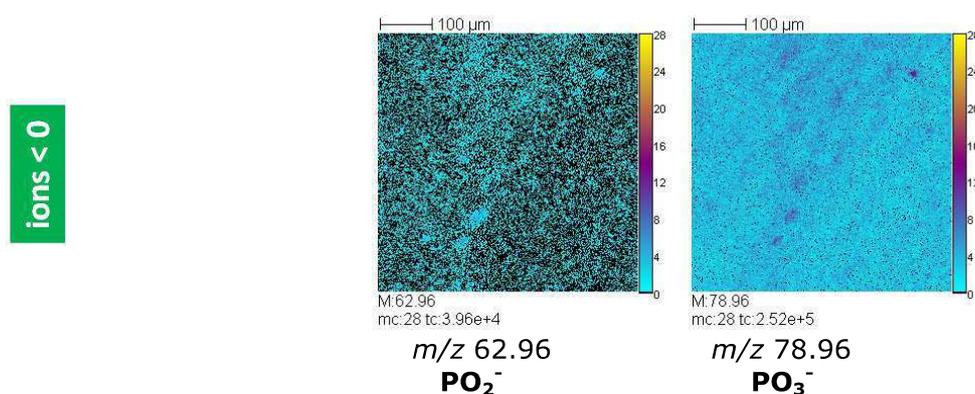


(c)

Espèces sulfurées



Phosphates



(d)

Figure 3-8 : Analyse TOF-SIMS de la corne ancienne d'Auroch : (a) Images ioniques totales, d'un fragment de la résine d'inclusion et ROI correspondant à la corne uniquement et (b) comparaison des spectres de la corne ancienne (vert foncé) et de la corne moderne (vert clair).. (c) Spectre correspondant à la corne d'Auroch (sans résine) et (d) images ioniques correspondant aux fragments sulfurés et aux ions phosphates. Les images ont été normalisées par rapport à l'image la plus intense. Taille des images TOF-SIMS : 500 x 500 μm^2 .

3.3 Analyses d'une corne de rhinocéros laineux

3.3.1 Structure particulière des cornes de rhinocéros

La corne de rhinocéros se distingue des autres cornes de mammifères (bovidés par exemple) par sa structure. En effet, elle est constituée de kératine uniquement et ne pousse pas autour d'un os (Sims, 2010). Plus précisément, la corne se compose de fibres lui conférant un aspect strié. Chacune de ces fibres ou *lamina* est composée de tubules rassemblées dans une matrice intertubulaire également kératinisée et contenant par endroit des proportions importantes de mélanine. Les tubules, de 300 à 500 μm de diamètre, prennent naissance dans le *stratum germinatum* de l'épiderme de la peau recouvrant l'os nasal, au-dessus de chaque papille dermique (Ryder, 1962). La matrice intertubulaire, amorphe, prend également naissance dans le *stratum germinatum*, entre les papilles dermiques (Lynch, 1973). Chaque tubule se compose d'une quarantaine de couches concentriques de cellules épidermiques, de 2 μm d'épaisseur environ tandis que la matrice est formée de cellules interstitielles kératinisées en forme de fuseaux (Hieronymus, 2006).

3.3.2 Présentation de l'échantillon

3.3.2.1 Origine

La corne étudiée provient d'un rhinocéros laineux ou *Coelodonta antiquitatis* (Blumenbach, 1799), à squelette complet, conservé à l'Institut de Paléontologie Humaine de Paris (Figure 3-9 a). Son nom vient du fait qu'il portait un épais pelage fait de longs poils rigides. Représenté sur les peintures rupestres des grottes, comme à Lascaux, Chauvet et Rouffignac (Fortelius, 1983), cet animal pouvait peser 3 t et mesurer 3,5 m de long pour 2 m de haut au garrot. Les premiers spécimens dateraient d'il y a 3,6 millions d'années et l'espèce semble s'être éteinte à la fin de l'ère glaciaire, il y a 11 000 ans. Elle peuplait l'Europe et l'Asie (Guthrie, 1990).

Deux têtes momifiées avec leurs cornes ainsi que deux corps momifiés complets ont été retrouvés en Yakoutie (rhinocéros de Verkhnevilynsk et Khalbui, momies de Churapachi et de la rivière Kolyma, conservés au musée zoologique de St Pétersbourg). Deux autres individus entiers ont été mis au jour en Ukraine et dans les Carpates (rhinocéros Starunia conservés au musée d'Histoire Naturelle de Cracovie et au musée d'histoire naturelle de Lvov). La plus grande collection de restes de rhinocéros laineux (squelettes et cornes) est présentée au musée paléontologique « L'Âge de glace » de Moscou (Boeskorov, 2011).

Achetée par un collectionneur français, Gérard Reynaud, puis donnée à l'IPH en 2010, le squelette exceptionnellement complet du rhinocéros a fait l'objet d'une vaste étude pluridisciplinaire (détermination de l'espèce, de l'âge, du sexe, du régime alimentaire).¹⁰ Dans ce cadre, la corne nasale étudiée ici (Figure 3-9 b) a été datée par carbone 14 au C2RMF par Pascale Richardin et Nathalie Gandolfo (Richardin, 2011a). Les résultats datent le fossile (une femelle d'une trentaine d'années) entre 17500 et 15000 avant J.-C. L'exceptionnelle préservation de la corne, de même que celle du collagène des os de l'animal, s'expliquerait par sa conservation dans le permafrost, probablement en Sibérie nord-orientale.

¹⁰ Les résultats de ces études, menées en 2010-2011, par une équipe de l'IPH en collaboration avec le Muséum d'Histoire naturelle de Paris, le C2RMF, l'université de Tübingen et l'université de Lyon sous la coordination d'Amélie Vialet (IPH) feront l'objet d'une publication prochaine dans un numéro spécial de l'Anthropologie.



(a)



(b)

Figure 3-9 : (a) Squelette complet du rhinocéros laineux avec au premier plan la grande corne nasale étudiée et (b) Photographie de la corne étudiée. ©C2RMF, Dominique Bagault.

3.3.2.2 Description des échantillons prélevés

La structure fibreuse de la corne est visible sur la photographie Figure 3-10a. Des fibres (ou *laminae*) ont été prélevées à la base (Figure 3-10 c). Certaines zones, en particulier, des parties creusées, présentaient une couleur rouge peu intense (Figure 3-10 b). La raison de cette coloration n'est pas connue mais la corne aurait pu être dorée lors d'une exposition surréaliste d'objets en 1936. Le squelette aurait été présenté alors comme un « hommage à Dali », que l'on savait fasciné par les rhinocéros (Descharnes, 2007). Une préparation de type colle animale et oxyde de fer aurait pu être utilisée pour réaliser cette dorure.

L'observation au microscope optique des fibres rouges permet de constater que la couleur rouge est liée à une fine couche entourant les tubules (Figure 3-10 d et e). Cette gangue est parfois absente sur certaines parties de la fibre. On remarque, de plus, la présence de petits cristaux noirs ou translucides à la surface (Figure 3-10 f).

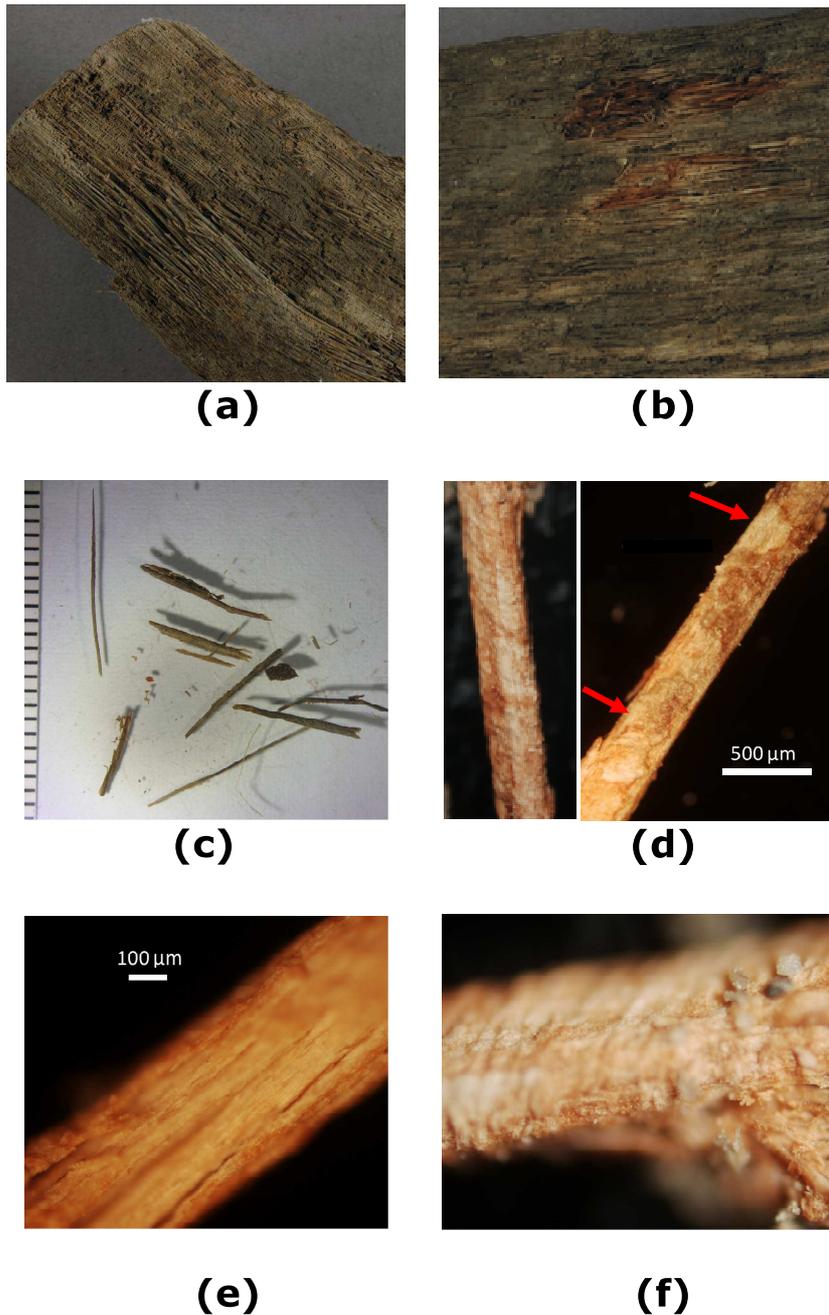


Figure 3-10 : (a-b) Photographie de détail de la corne nasale étudiée : (a) extrémité de la corne avec lamellae se détachant et (b) zone creusée laissant apparaître une zone de fibres rouges. © C2RMF, Dominique Bagault. (c) Photographies à la loupe binoculaire de fibres marron et (d-f) photographies au microscope optique de fibres rouges (d) Grossissement : x5. Les flèches rouges indiquent une zone de la fibre dépourvue de dépôt rouge. (e-f) Zoom, grossissement : x10 avec (f) détail des grains de surface.

3.3.3 Caractérisations structurales et élémentaires préliminaires

Dans un premier temps, des observations au microscope optique et électronique ainsi que des analyses chimiques en MEB-EDX ont permis de préciser la structure et la composition élémentaire des *laminae* de la corne étudiée.

3.3.3.1 Observations en microscopie

L'observation longitudinale des *laminae* en microscopie électronique permet, plus précisément qu'en microscopie optique, de voir les tubules les constituant. L'image électronique en mode BSE (Figure 3-11 a) montre l'homogénéité chimique de la surface de la fibre tandis que l'image en mode SE (Figure 3-11 b) permet de voir la topographie de la *lamina* et les différents tubules. Par rapport à l'étude en MEB de Lynch (1973), les fibres du rhinocéros laineux apparaissent plus abimées avec la présence de trous par endroits. Notons qu'en mode SE, le matériau se charge rapidement du fait de la présence de nombreux trous, de l'absence de métallisation (pour préserver l'échantillon) et de l'impossibilité de travailler en pression partielle dans ce mode avec le microscope utilisé.

Afin de préciser leur structure interne, des *laminae*, rouges et des marrons, ont été incluses en résine polyester et des coupes transverses préparées en ultramicrotomie selon le protocole décrit au chapitre 1. Les Figure 3-11 c et d, présentent l'allure d'une de ces coupes, observée au microscope optique. On identifie en particulier les tubules, délimitées en pointillés rouges, constituées de cellules et organisées en lamelles concentriques autour d'une *medulla* centrale (Figure 3-11 d) et la matrice intertubulaire de cellules épidermiques, aplaties et rangées parallèlement entre les tubules (entre les tubules, Figure 3-11 c).

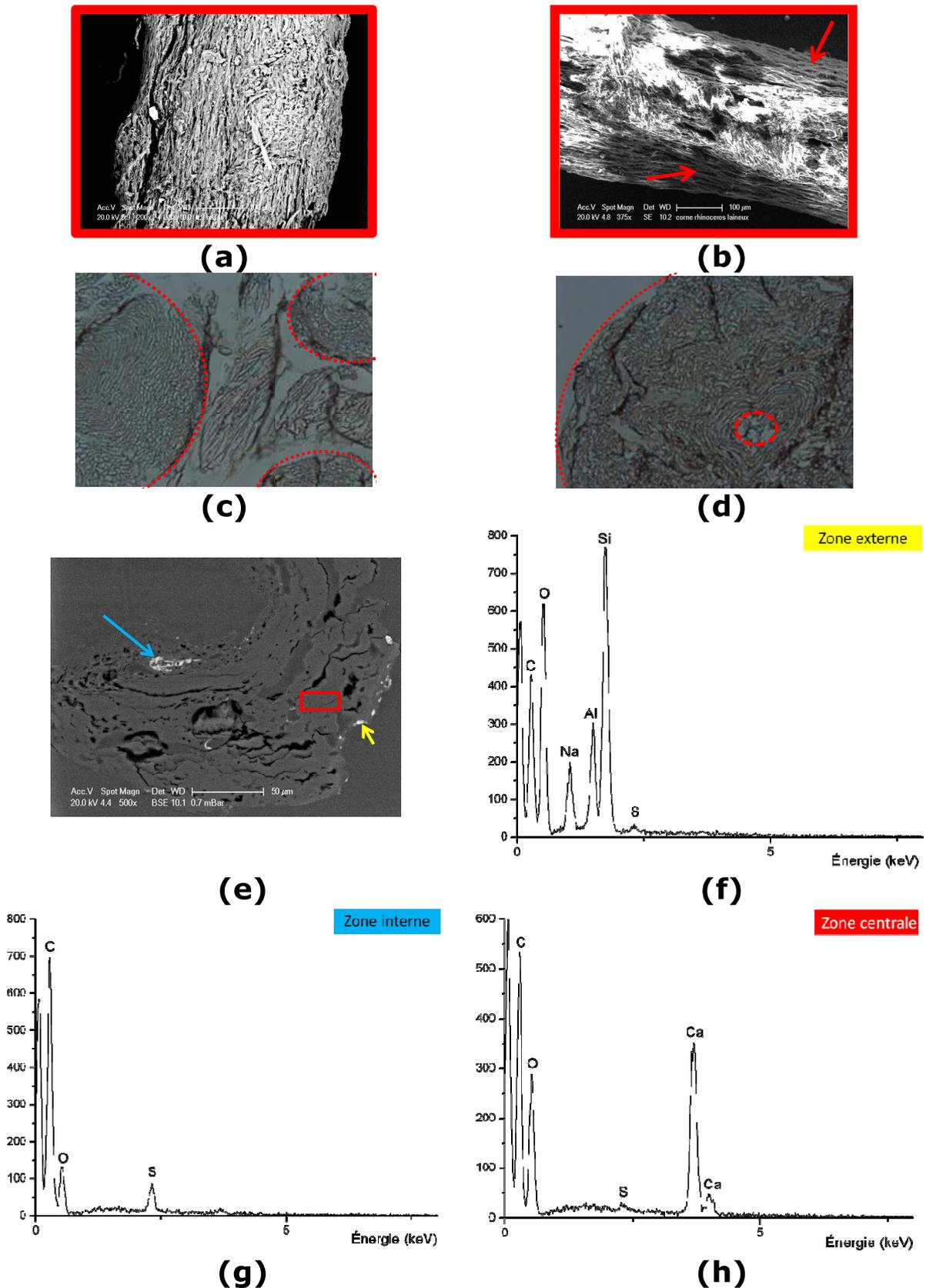


Figure 3-11 : Analyse structurale de fibres de la corne : (a-b) Images MEB de la surface de fibres rouges en mode BSE (0.9 mbar) (a) et en mode SE (b). (c-d) Photographies au microscope optique de coupes transverses de fibres marron avec (c) 3 parties de tubules, la matrice intertubulaire et (d) un tubule avec son canal médullaire (pointillés rouges). (e) Image MEB en mode BSE d'un tubule d'une fibre marron (0.7 mbar) et (f-h) spectres EDX correspondants aux zones externe (jaune), interne (bleu) et centrale (rouge).

3.3.3.2 Analyses chimiques en MEB-EDX

L'image MEB, en mode BSE, de la coupe transverse d'un tubule de fibre rouge est présentée Figure 3-11 e. L'image a été acquise en pression partielle (0.7 mbar), à une tension d'accélération de 20 kV, directement sur le bloc d'inclusion surfacé en ultramicrotomie.

Sur cette image en contraste chimique, trois zones se distinguent et ont été analysées en EDX :

- une zone externe claire (donc contenant des éléments plus lourds, de numéro atomique Z plus élevé), fine et constituée de grains
- une zone centrale, plus sombre, correspondant aux lamelles concentriques des cellules épidermiques du tubule. Certaines zones y apparaissent abimées et la résine polyester, peu fluide et polymérisant rapidement, n'a pas pu les consolider. La coupe en ultramicrotomie les a sans doute aussi détériorées. Un problème similaire est observé entre les tubules, sur une coupe transverse de *lamina*, dans l'article de Ryder (Ryder, 1962).
- une zone interne claire.

Sur les grains de la zone externe (flèche jaune sur la Figure 3-11 e et spectre Figure 3-11 f), on détecte majoritairement du silicium et de l'aluminium ainsi que du sodium, en plus du carbone et de l'oxygène. Ceci permet de supposer la présence de quartz parmi les grains visualisés à la surface de la fibre. On détecte, en outre, un peu de soufre présent a priori dans le tubule kératinisé central. Cette détection est liée à l'utilisation de la pression partielle qui engendre un halo d'électrons autour de la zone analysée.

La zone centrale (carré rouge sur la Figure 3-11 e et spectre Figure 3-11 h) contient essentiellement du carbone, de l'oxygène et du soufre ce qui est logique puisqu'elle correspond à la partie kératinisée.

L'analyse EDX de la zone interne claire (flèche bleue Figure 3-11 e et spectre Figure 3-11 g) traduit la présence de calcium, associée au carbone et à l'oxygène. La présence de calcium dans la corne de rhinocéros est évoquée par Hieronymus (Hieronymus, 2006). Selon lui, celui-ci est associé par endroit à de la mélanine et présent sous forme de phosphates de calcium, de type hydroxyapatite ou phosphates d'octacalcium. Cette minéralisation conférerait à la corne sa résistance, la mélanine protégeant quant à elle les fibres des dégradations liées aux UV en absorbant ces rayonnements. Nous n'avons toutefois pas détecté de phosphore lors de cette analyse en MEB-EDX.

3.3.4 Analyse TOF-SIMS

3.3.4.1 Analyse d'une fibre marron

Les premières analyses ont révélé, en particulier en haute résolution spatiale, de nombreux plis dans les coupes au niveau des tubules étudiés (Figure 3-12 a et b). On peut cependant voir à cette échelle, sur les images ioniques de 200 µm de côté, les cellules constituant la structure feuilletée du tubule, tel que mis en évidence par Ryder en 1962 sur une coupe transverse de *lamina* à l'aide d'une coloration histologique à l'orthochlorophénol (Ryder, 1962). Les analyses ont été refaites, sur un bloc, en prenant soin, en outre, de conserver la matrice intertubulaire (Figure 3-12 c et d).

Les spectres, dans les deux modes d'ionisation, sont dominés par des fragments correspondant à la kératine : fragments d'acides aminés en mode d'ionisation positif et fragments de la chaîne polypeptidique et soufrés en mode d'ionisation négatif.

Comme on peut le voir sur les images ioniques correspondant aux fragments d'acides aminés en mode d'ionisation positif (Figure 3-13), il ne semble pas y avoir de distinction chimique entre les tubules (à droite et à gauche) et la matrice intertubulaire (au centre). Les fragments majoritaires correspondent à la proline, l'alanine, la glycine, la thréonine et la sérine.

En mode d'ionisation négatif, les images ioniques des fragments polypeptidiques ainsi que du soufre et des sulfates confirment la localisation et l'absence de distinction protéique entre tubule et matrice (Figure 3-13).

3.3.4.2 Cas d'une fibre rouge

L'analyse de la fibre rouge a été effectuée sur une coupe qui présentait un bon état de surface (Figure 3-12 e). Les résultats sont similaires en ce qui concerne la kératine (Figure 3-13).

Des traces de fer et d'hydroxyproline (qui pourrait correspondre au collagène de la colle utilisée pour la dorure) sont également détectées mais leur localisation dans la fibre semble peu compatible avec l'hypothèse d'une dorure. De plus aucune trace d'or résiduel n'a été détectée.

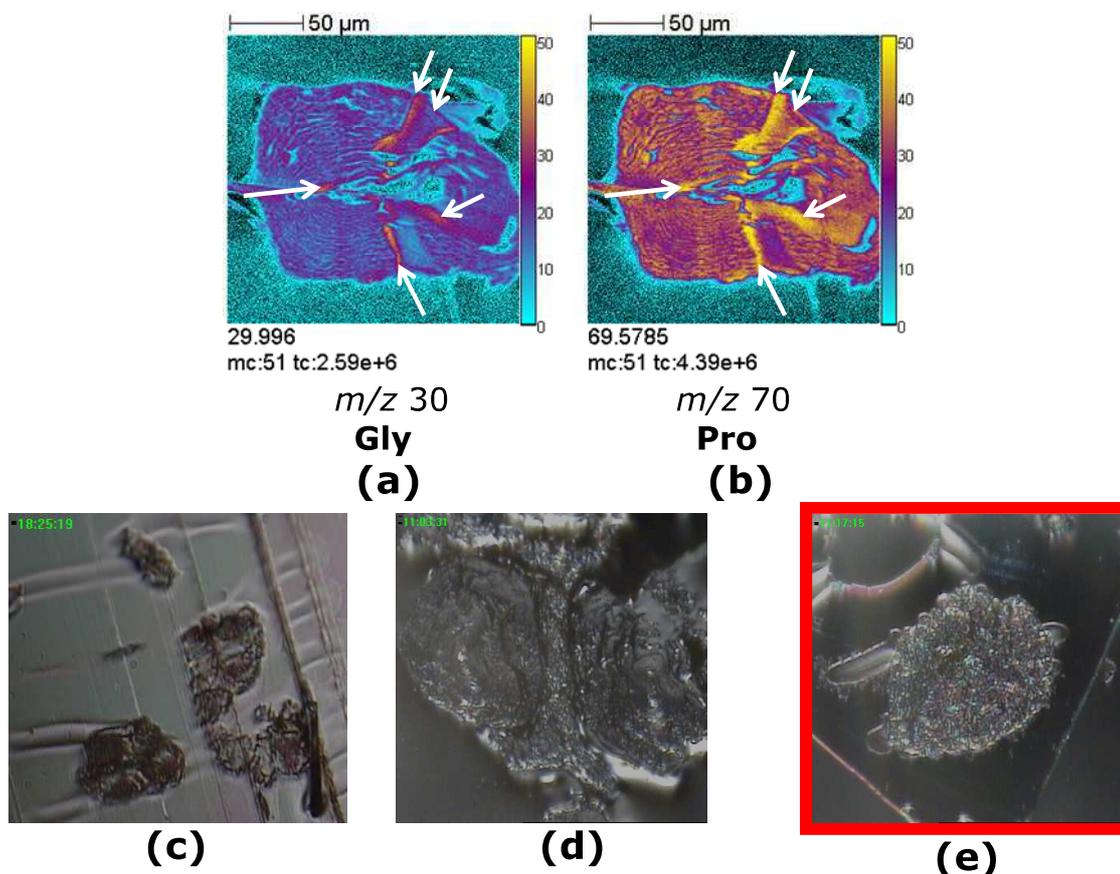
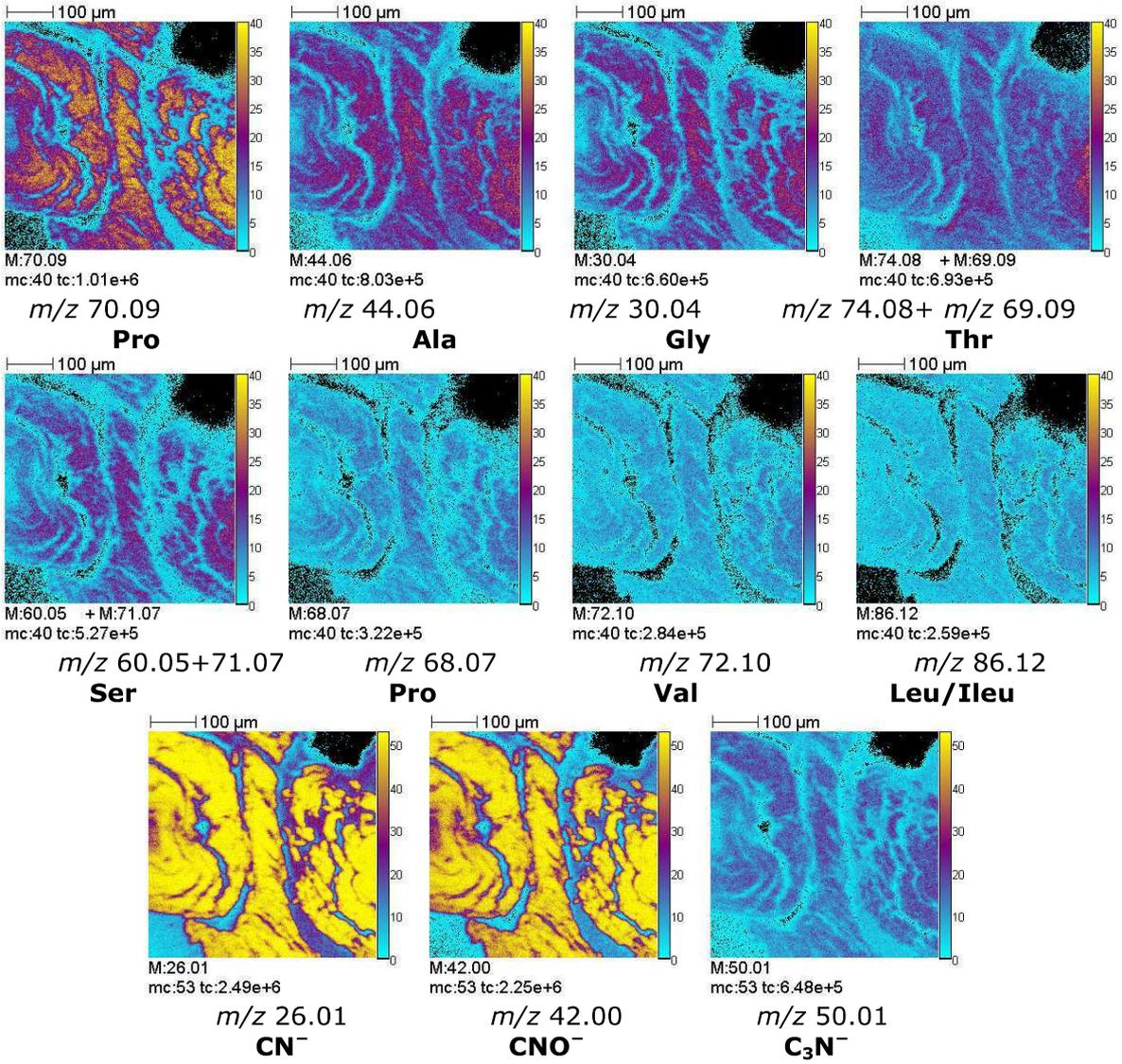


Figure 3-12 : Analyses TOF-SIMS de fibres de corne marrons et rouges : (a-b) Images ioniques en haute résolution spatiale des fragments de glycine et proline pour la première coupe de fibre marron analysée (c). Les flèches blanches indiquent les zones de plis. (d-e) Photographies dans la chambre d'ionisation du SIMS du bloc de fibre marron avec matrice intertubulaire (d) et (e) de la coupe de fibre rouge sur une plaque de silicium.

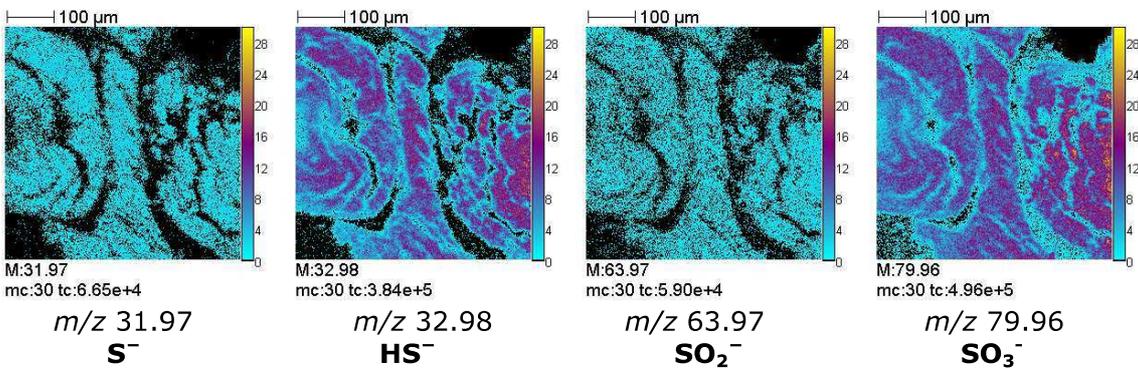
Polypeptides

ions > 0



ions < 0

Espèces sulfurées



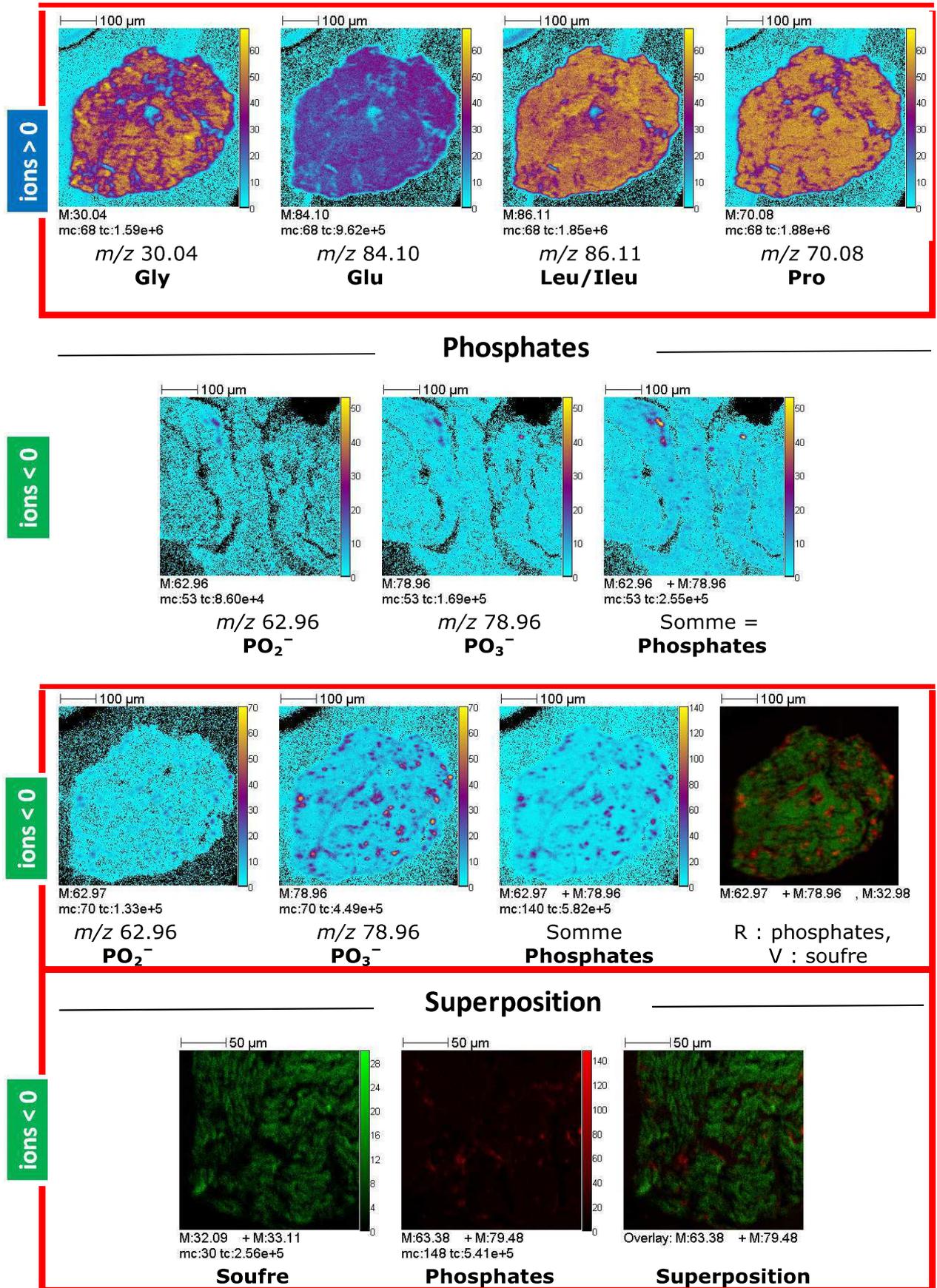


Figure 3-13 : Analyse TOF-SIMS de fibres de corne de rhinocéros laineux. Images ioniques correspondant aux protéines, aux espèces sulfurées et aux phosphates dans des fibres marron et rouge avec zoom en haute résolution spatiale sur une fibre rouge.

3.3.4.3 Phosphates de calcium

En mode d'ionisation positif, on constate également la présence de pics correspondant au calcium et à ses hydroxydes.

En mode d'ionisation négatif, des pics correspondant à des phosphates (PO_2^- , m/z 62.96 et PO_3^- , m/z 78.96) sont détectés. Ils sont localisés dans des grains répartis dans l'ensemble des tubules des fibres rouges (Figure 3-13) comme des fibres marron mais qui semblent absents de la matrice intertubulaire (Figure 3-13). La colocalisation de ces grains et des signaux correspondant au calcium en mode d'ionisation positif suggère la présence de phosphate de calcium. Toutefois aucun fragment de type hydroxyapatite (voir chapitre 1, paragraphe 2.5.2.3 et annexe 2) n'est détecté en mode d'ionisation positif. L'étude en haute résolution spatiale confirme l'imbrication des grains de phosphates de calcium avec les cellules du tubule de corne, à base de kératine (Figure 3-13).

Le rapport $\text{PO}_3^-/\text{PO}_2^-$ permet de caractériser en principe les phases des phosphates de calcium (Chusuei, 1999). D'après Chusuei, qui a effectué l'étude de différentes poudres de phosphates de calcium en TOF-SIMS, il est possible de distinguer entre eux, grâce à ce rapport, les hydroxyapatites, les phosphates tricalciques (α et β), les phosphates octocalciques, les phosphates amorphes de calcium et la brushite.

Ce rapport, calculé dans le cas de l'os contemporain étudié au chapitre 1 (paragraphe 2.5.2.3), donne une valeur de 0.84 correspondant à une hydroxyapatite, comme attendu pour un os. Le calcul est effectué en considérant l'aire des pics correspondant aux ions PO_3^- et PO_2^- , sur lesquels une correction de Poisson est réalisée. Dans le cas des os anciens, ce rapport est légèrement supérieur, intermédiaire entre les valeurs données par Chusuei pour une hydroxyapatite et un phosphate d'octocalcium, suggérant une modification de la phase des phosphates de calcium au cours de la diagénèse. Dans le cas de la corne de rhinocéros laineux, ce rapport, calculé pour une ROI correspondant aux grains de phosphates, est compris entre 1,4 et 1,6 (Figure 3-14). Ceci suggère donc que les phosphates de calcium, évoqués par Hieronymus (Hieronymus, 2006), seraient présents dans le cas du rhinocéros laineux sous forme de phosphates de calcium amorphe. Il serait intéressant de pouvoir calculer ce même rapport dans le cas d'une corne moderne de rhinocéros, afin de savoir d'une part la phase native des phosphates de calcium dans la corne de rhinocéros (et de valider éventuellement les hypothèses de Hieronymus) et de voir si celle-ci est différente de celle de la corne ancienne.

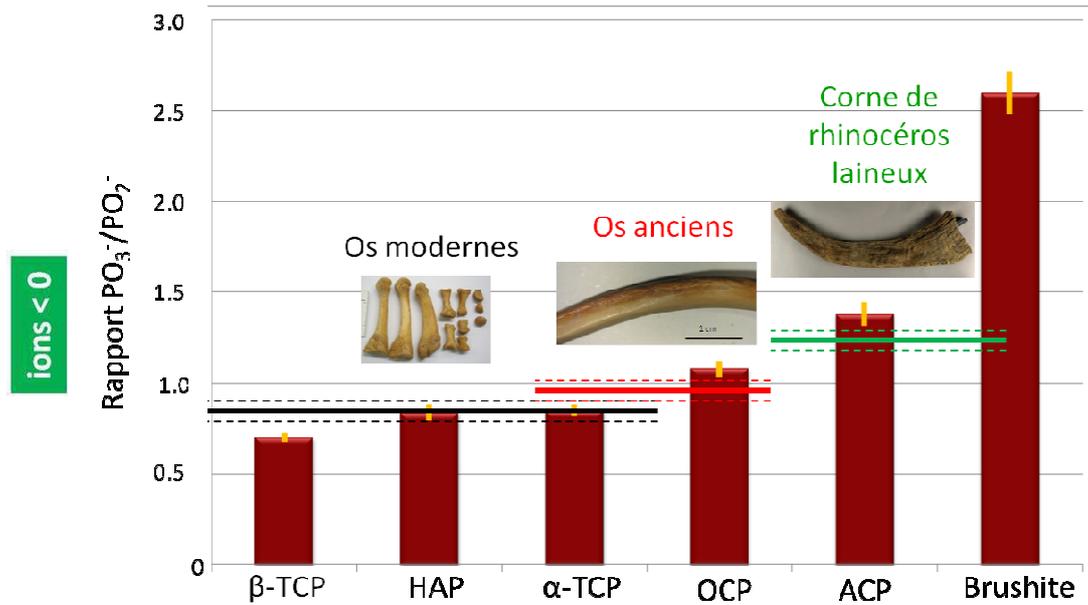


Figure 3-14 : Graphique représentant les valeurs du rapport PO_3^-/PO_2^- en TOF-SIMS selon la phase des phosphates de calcium, avec les barres d'erreur (en jaune) d'après (Chusuei, 1999) et position des rapports calculés dans notre cas pour la corne de rhinocéros (ligne verte) et aux os du chapitre 1 (ligne noire pour l'os moderne et rouge pour l'os ancien). Les lignes pleines correspondent à la valeur moyenne, les lignes en pointillés délimitent les barres d'erreurs correspondantes. β -TCP : phosphate tricalcique β , HAP : hydroxyapatite, α -TCP : phosphate tricalcique α , OCP : phosphate octocalcique, ACP : phosphate amorphe de calcium, brushite ou phosphate dicalcique hydraté.

3.3.5 Analyse complémentaire en DRX

Les analyses TOF-SIMS sur des coupes transversales n'ont pas détecté d'aluminosilicates. De l'aluminium et du silicium a cependant été détecté en MEB-EDX, dans certains grains présents, par endroits, à la surface de la fibre. Afin de connaître la nature de ces aluminosilicates, des analyses ont été effectuées en microdiffraction des rayons X avec Hélène Rousselière (C2RMF, UMR 171). Plusieurs échantillons ont été analysés et comparés : des fibres marron, incluses en résine (analyse de la surface préparée en ultramicrotomie où l'échantillon affleure en coupe transverse) et des fibres marron et rouge placées dans un capillaire.

Après 45 minutes d'accumulation, l'analyse du bloc d'inclusion où affleurent 2 fibres marron ne révèle que la présence d'une large bosse (pas de raies de diffraction discrètes), correspondant à la résine d'inclusion de la fibre, amorphe ($15^\circ < 2\theta < 20^\circ$).

L'analyse des fibres placées dans un capillaire apporte davantage d'informations. La figure de diffraction des fibres marron présente peu d'anneaux marqués mais quelques tâches correspondant à la diffraction de grains (Figure 3-15 a). Le spectre correspondant comprend des pics fins associés aux tâches de diffraction de grains (spectre noir, Figure 3-15 b). Ceux-ci correspondent à des silicates (quartz, silice- SiO_2), à un aluminosilicate (l'albite, $NaAlSi_3O_8$) et à un minéral argileux dérivé d'aluminosilicates (l'illite, $(K,H_3O)(Al,Mg,Fe)_2(Si,Al)_4O_{10}[(OH)_2,(H_2O)]$). Les trois premiers minéraux sont très communs, présents partout dans le monde et souvent associés ensemble. L'illite est une argile commune dans les sédiments. Il n'est donc pas étonnant de retrouver ces minéraux à la surface des fibres de corne d'un squelette enterré pendant plus de 10000 ans. Quelques pics de diffraction supplémentaires sont détectés dans le spectre des fibres rouges (spectre orange, Figure 3-15 b) mais ceux-ci n'ont pas pu être attribués.

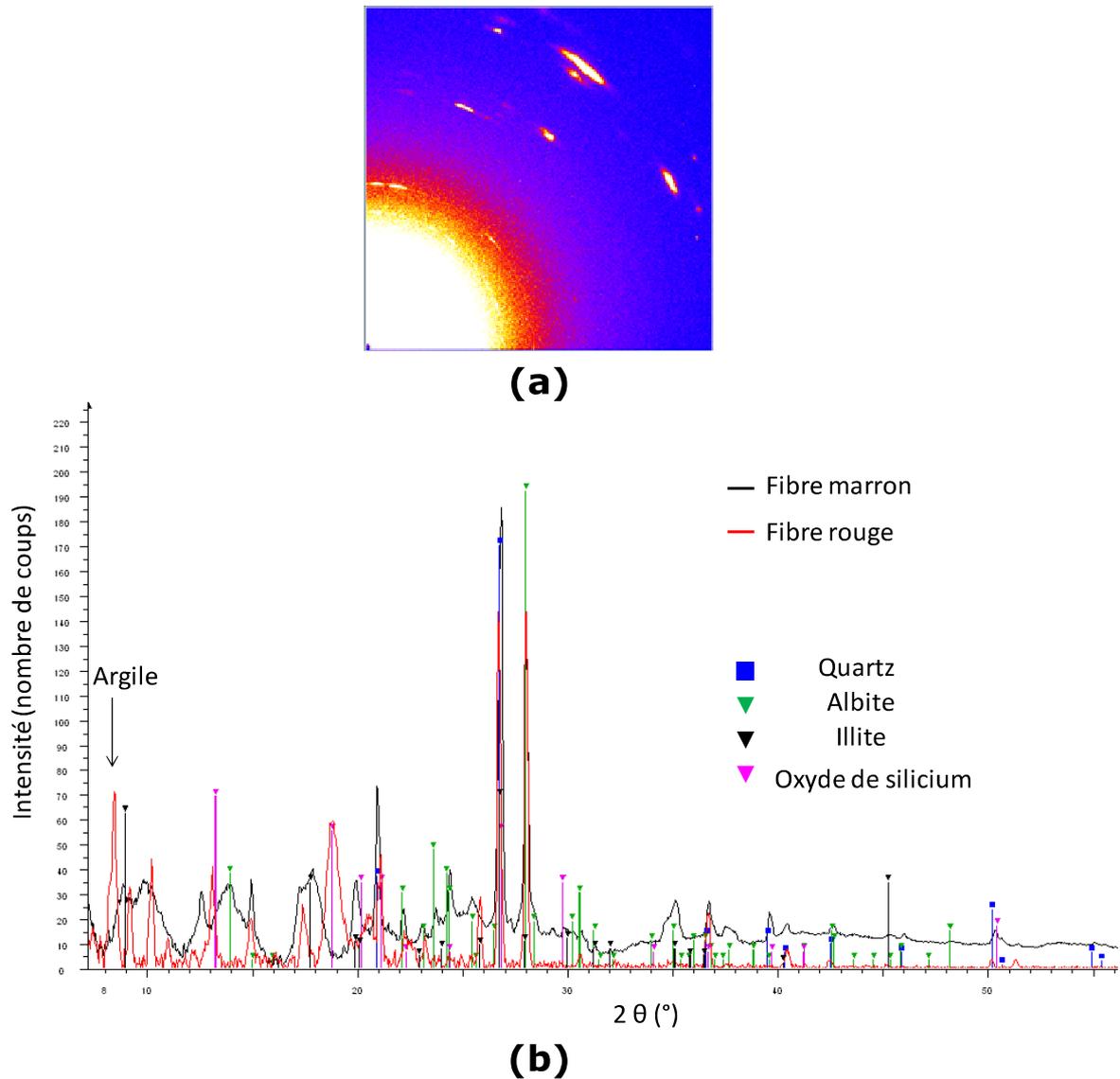


Figure 3-15 : Analyse en microdiffraction des rayons X. (a) Figure de diffraction d'une fibre marron en capillaire et (b) spectre correspondant à une fibre marron (en noir) et à une fibre rouge (en orange) en capillaire. Sur ces spectres sont identifiés le quartz (en rouge), la silice (en violet), l'albite (en bleu) et l'illite (en bordeaux).

4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié des tissus kératinisés de nature différente. Nous avons montré que, outre la distinction avec d'autres types de protéines (la fibroïne de soie par exemple ou le collagène de l'os), l'analyse TOF-SIMS permettait de mettre en évidence des variations de composition en acides aminés pour un même type de protéine. En outre, nous avons vu que la kératine dure de ces tissus ne semblait pas subir de dégradation chimique au cours du temps.

Grâce à l'utilisation de l'imagerie chimique, par TOF-SIMS, la localisation des composés d'origine biologique (protéines et lipides) des différents tissus a été confirmée ou précisée. Dans le cas des cheveux par exemple,

Nous avons également mis à profit la capacité du TOF-SIMS à analyser simultanément les phases minérales pour localiser les composés présents à la surface des échantillons anciens résultant de l'enfouissement des tissus depuis de nombreuses années. La capacité à distinguer différentes phases minérales, ici des phosphates de calcium a pu être illustrée sur l'exemple de la corne de rhinocéros.

Bibliographie

A

AKHTAR W., EDWARDS H. G. M. (1997a) 'Fourier-transform Raman spectroscopy of mammalian and avian keratotic biopolymers.' *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 53(1): 81-90.

AKHTAR, W., EDWARDS, H. G. M. *et al.* (1997b) 'Fourier-transform Raman spectroscopic study of human hair.' *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 53(7): 1021-1031.

AUDINOT, J. N., S. SCHNEIDER, *et al.* (2004). 'Imaging of arsenic traces in human hair by nano-SIMS 50.' *Applied Surface Science* 231: 490-496.

B

BANTIGNIES, J. L., G. FUCHS, *et al.* (1998) 'Organic reagent interaction with hair spatially characterized by infrared microspectroscopy using synchrotron radiation.' *International Journal of Cosmetic Science* 20(6): 381-394.

BARTH, A. (2007) 'Infrared spectroscopy of proteins.' *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767(9): 1073-1101.

BATCHELLER, J.; HACKE, A. M.; MITCHELL, R.; CARR, C. M., 'Investigation into the nature of historical tapestries using time of flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS).' *Applied Surface Science* (2006), 252 (19), 7113-7116.

BENÍTEZ, G. 'Animals used for medicinal and magico-religious purposes in western Granada Province, Andalusia (Spain)' *Journal of Ethnopharmacology* (2011) 137(3), 1113-1123.

BLAINVILLE, H. M. D. (1822) 'De l'organisation des animaux: ou Principes d'anatomie comparée. Contenant la morphologie et l'aistésologie.' F. G. Levrault.

BLUMENBACH, J.F., (1799). *Handbuch der Naturgeschichte*. Dieterich, Göttingen.

BOESKOROV, G. G., LAZAREV, P.A. *et al.* (2011). 'Woolly rhino discovery in the lower Kolyma River.' *Quaternary Science Reviews* 30(17-18): 2262-2272.

BOSKEY, A., PLESHKO CAMACHO, N. (2007). 'FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage.' *Biomaterials* 28(15): 2465-2478.

BREL, X. (2004) 'Caractéristiques anatomo-morphologiques des aurochs de la grotte de Lascaux'. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Nantes

BUT, P. P.; LUNG, L. C.; TAM, Y. K. (1990) 'Ethnopharmacology of rhinoceros horn. 1. Antipyretic effects of rhinoceros horn and other animal horns.' *Journal of Ethnopharmacology* 30 (2), 157-168.

C

CAESAR, C. J., BERLIER T.(1825). Guerre des Gaules, Parmantier traduction 1825, écriture (52 av.J.C), livre VI, chapitre 28, p.227-229 de la traduction.

CARMINATI, P. Étude et conservation : problématiques de la restauration d'une momie andine des collections du musée de l'Homme. Dissertation; High School of Fine Art of Tours: (2010).

CERSONY, S., P. RICHARDIN, *et al.* (2012). 'Cluster TOF-SIMS imaging of human skin remains: analysis of a South-Andean mummy sample.' *Journal of Mass Spectrometry* 47(3): 338-346.

CHEN, B.-J., P.-L. LEE, *et al.* (2006). 'Hair dye distribution in human hair by TOF-SIMS.' *Applied Surface Science* 252(19): 6786-6788.

CHUSUEI, C. C.; GOODMAN, D. W.; VAN STIPDONK, M. J.; JUSTES, D. R., *et al.* (1999) 'Calcium phosphate phase identification using XPS and time-of-flight cluster SIMS'. *Analytical Chemistry* 71 (1), 149-153.

COTTE, M. (2004). Développement de la microscopie infrarouge avec rayonnement synchrotron pour l'étude des pratiques pharmaceutiques anciennes :exemple des emplâtres de plomb et des tissus humains Thèse de doctorat de l'université Paris 6.

CREWETHER, W. G., J. M. GILLESPIE, *et al.* (1966). 'Low-sulfur proteins from α -keratins. Interrelationships between their amino acid compositions, α -helix contents, and the supercontraction of the parent keratin.' *Biopolymers* 4(8): 905-916.

D

DEBOIS, D., Imagerie moléculaire d'échantillons biologiques par spectrométrie de masse TOF-SIMS In Thèse de doctorat de l'université Évreux - Val d'Essonne, (2008).

DELLMANN, H. D., BROWN, E.M. (1981). Textbook of veterinary .Histology. L. Febiger.

DELORME, J., Dictionnaire des matières plastiques et de leurs applications. Paris, A., Ed. (1958).

DESCHARNES, R. AND G. NÉRET (2007). Salvador Dalí: 1904-1989. The paintings, Taschen.

DOUCET J. (2001) 'Statique et dynamique de la corne du taureau de combat et de la corne du taureau de course camarguaise.' *Bulletin de la société vétérinaire pratique de France*, 85(4), 238-248

F

FORTELIUS, M. (1983). 'The morphology and paleobiological significance of the horns of *Coelodonta antiquitatis* (Mammalia: Rhinocerotidae).' *Journal of Vertebrate Paleontology* 3 (2) : 125-135.

FRASER, R. D. B., T. P. MACRAE, *et al.* (1972). Keratins: their composition, structure, and biosynthesis, Thomas.

G

GILLEN, G., S. ROBERSON, *et al.* (1999). 'Elemental and molecular imaging of human hair using secondary ion mass spectrometry.' *Scanning* 21(3): 173-181.

GUINTARD, C. (2005) Le cornage primigène (ou *primigenius*), caractéristiques, variabilité et intérêt pour l'aurochs-reconstitué. *Revue de Paléobiologie du Muséum d'histoire naturelle de la Ville de Genève*.10, 259-269

GUTHRIE, R. D. (1990). Frozen Fauna of the Mammoth Steppe: The Story of Blue Babe, University of Chicago Press.

H

HALLÉGOT, P., R. PETERANDERL, *et al.* (2004). 'In-Situ imaging mass spectrometry analysis of melanin granules in the human hair shaft.' *Journal of Investigative Dermatology* 122(2): 381-386.

HALLÉGOT, P.; WALTER, P.; COTTE, M.; AUDINOT, J. N., *et al.*(2008) 'Accumulations of Ca/P in the core of hairs from Taklamakan desert mummies.' *Applied Surface Science* 255 (4), 1154-1157.

HIERONYMUS, T. L., L. M. WITMER, *et al.* (2006). "Structure of white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) horn investigated by X-ray histology with implications computed tomography and for growth and external form." *Journal of Morphology* 267(10): 1172-1176.

HUANG, T. AND P. YU (1997). "Analysis of α -keratins in the horns of rhinoceros and buffalo by non-native capillary isoelectric focusing." *Chromatographia* 46(7): 437-439.

J

JAUZEIN, V.; COLOMBAN, P., Types, structure and mechanical properties of silk. Woodhead Publ Ltd: Cambridge, (2009); Vol. 91, p 144-178.

K

KEMPSON, I. M., W. M. SKINNER, *et al.* (2003a). "Calcium distributions in human hair by TOF-SIMS." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1624(1-3): 1-5.

KEMPSON, I. M.; SKINNER, W. M.; KIRKBRIDE, P.; NELSON, A. J., *et al.* (2003b) Time-of-flight secondary ion mass spectrometry analysis of hair from archaeological remains. *European Journal of Mass Spectrometry* 9 (6), 589-597.

KIRILLOVA, I. V. AND F. K. SHIDLOVSKIY (2010). "Estimation of individual age and season of death in woolly rhinoceros, *Coelodonta antiquitatis* (Blumenbach, 1799), from Sakha-Yakutia, Russia." *Quaternary Science Reviews* 29(23-24): 3106-3114.

KRAUSZ S. (1992). L'exploitation artisanale de la corne de bovidés à l'époque gauloise : le témoignage des chevilles osseuses de corne de Levroux (Indre) / The use of cattle horn in the gaulish period : the evidence of horn cores from Levroux (Indre). *Revue archéologique du Centre de la France* 31, 41-55.

KREPLAK, L., F. BRIKI, *et al.* (2001). "Profiling lipids across Caucasian and Afro-American hair transverse cuts, using synchrotron infrared microspectrometry." *International Journal of Cosmetic Science* 23(6): 369-374.

KROL, E. S. AND D. C. LIEBLER (1998). "Photoprotective actions of natural and synthetic melanins." *Chemical Research in Toxicology* 11(12): 1434-1440.

KRÖLLING, O.; GRAU, H.; TRAUTMANN, A.; ELLENBERGER, W., *Lehrbuch der Histologie und vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Haustiere*. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg (1960).

L

LEE, Y.; LEE, J.; KIM, Y.; CHOI, S., *et al.* (2008) Investigation of natural dyes and ancient textiles from korea using TOF-SIMS. *Applied Surface Science* (2008), 255 (4), 1033-1036.

LI, B-W., ZHAO, H.-P., FENG, X.-Q. (2011) 'Static and dynamic mechanical properties of cattle horns' *Materials Science and Engineering C* (2011), 31, 179-183.

LI, L.; TOUBOUL, D.; HALLÉGOT, P. *et al.*, (2005). Analysis of Chinese Mummy Hair from Taklamakan Desert by Imaging Cluster-TOF-SIMS. Poster – 1er Symposium de Chimie et Biologie Analytiques : de la molécule au protéome, 26-29 septembre 2005, Montpellier.

LING, S. J., QI, Z. M., KNIGHT, D. P., SHAO, Z., *et al.* (2011) 'Synchrotron FTIR Microspectroscopy of Single Natural Silk Fibers.' *Biomacromolecules* (2011), 12 (9), 3344-3349.

LYNCH, L. J., ROBINSON, V. *et al.* (1973). 'Scanning electron-microscope study of morphology of rhinoceros horn.' *Australian Journal of Biological Sciences* 26(2): 395-399.

M

MACGREGOR, A. (1985) 'Bone, Antler, Ivory and Horn : the technology of skeletal materials since the roman period'. Croom Helm: London.

MAILLARD, R, (1984). 'Détection des fraudes exercées chez le taureau de combat.' Thèse de doctorat vétérinaire de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort.

MARSHALL, R. C., ORWIN, D. F. G., *et al.* (1991). 'Structure and biochemistry of mammalian hard keratin.' *Electron Microscopy Reviews* 4(1): 47-83.

MILLS, J. S., WHITE, R. (1999). 'The organic chemistry of museum objects', Butterworth-Heinemann.

MOULHERAT, C. (2001) 'Archéologie des textiles protohistoriques. Exemple de la Gaule celtique : anthropologie, ethnologie, préhistoire.' Thèse de doctorat. Université de Paris 1 Panthéon-Sorbonne.

MOREL, N., GUINTARD, C., BRAGIER, S., CHAIX, L. (2003), 'Étude de l'étui corné conservé au Musée Vert', Musée d'histoire naturelle de la ville du Mans.

N

NOFSINGER, J. B., S. E. FOREST, *et al.* (2000). 'Probing the building blocks of eumelanins using scanning electron microscopy.' *Pigment Cell Research* 13(3): 179-184.

P

PANAYIOTOU, H., KOKOT, S. (1999). 'Matching and discrimination of single human-scalp hairs by FT-IR micro-spectroscopy and chemometrics.' *Analytica Chimica Acta* 392(2-3): 223-235.

PARIS, C. (2004) 'Méthodologies spectroscopiques pour l'étude de matériaux : objets du patrimoine de la fin du 19ème au début du 20ème siècle' Thèse de doctorat de l'université Paris 6.

PARIS, C., LECOMTE, S. *et al.* (2005) 'ATR-FTIR spectroscopy as a way to identify natural protein-based materials, tortoiseshell and horn, from their protein-based imitation, galalith.' *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 62(1-3): 532-538.

POLEUNIS, C., EVERAERT, E. P., DELCORTE, A.; BERTRAND, P. (2006) 'Characterisation of human hair surfaces by means of static TOF-SIMS: A comparison between Ga+ and C-60(+) primary ions.' *Applied Surface Science*, 252 (19), 6761-6764.

R

RICHARDIN P., GANDOLFO N., (2010). 'Datation par le carbone-14 d'une corne d'auroch conservé au Musée d'histoire naturelle du Mans', C2RMF, Rapport interne.

RICHARDIN P., GANDOLFO N., (2011a). 'Datation par le carbone-14 et étude morphologique de la corne d'un rhinocéros laineux conservé à l'Institut de Paléontologie Humaine à Paris', N° C2RMF 69779 à C2RMF 69790 – Rapport interne - 20609.

RICHARDIN, P.; GANDOLFO, N.; CARMINATI, P.; WALTER, P. (2011b) 'A new protocol for radiocarbon dating of hair and keratin type samples—application to an Andean mummy from the National Museum of Natural History in Paris'. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 1-6.

ROBBINS, C. R. (1994). 'Chemical and physical behavior of human hair', Springer-Verlag.

ROKOSZ, M. (1995). 'History of the aurochs (*Bos taurus primigenius*) in Poland.' *Animal Genetic Resources / Ressources génétiques animales / Recursos genéticos animales* 16: 5-12.

RYDER, M. L. (1962). 'Structure of rhinoceros horn.' *Nature* 193: 1199-1200.

S

SARAVANAN, D. (2006). 'Spider silk - Structure, properties and spinning.' *Journal of Textile and Apparel, Technology and Management* 5(1): 1-20.

SHEN, Y.; JOHNSON, M. A.; MARTIN, D. C., Microstructural characterization of *Bombyx mori* silk fibers. *Macromolecules* (1998), 31 (25), 8857-8864.

SHIDLOVSKIY, F. K., I. V. KIRILLOVA, *et al.* (2012). 'Horns of the woolly rhinoceros *Coelodonta antiquitatis* (Blumenbach, 1799) in the Ice Age Museum collection (Moscow, Russia).' *Quaternary International* 255(0): 125-129.

SIMS, M. E., YATES, B.C. (2010). 'Macroscopic Identification of Rhinoceros Horn versus Cattle Horn.' *Identification Guides for Wildlife Law Enforcement* 13.

SINGH, R. R., GOYAL, S.P. *et al.* (2003) 'Application of X-ray diffraction to characterize ivory, antler and rhino horn: Implications for wildlife forensics.' *Forensic Science International* 136: 376-377.

STAFFORD, K. J.; MELLOR, D. J. (2005) 'Dehorning and disbudding distress and its alleviation in calves'. *The Veterinary Journal*, 169 (3), 337-349.

STUART, B. H., Ed. (2007). 'Analytical techniques in Materials Conservation', John Wiley and Sons.

T

TAHALLAH, N., BRUNELLE, A. *et al.* (2008). 'Lipid mapping in human dystrophic muscle by cluster-time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging.' *Journal of Lipid Research* 49(2): 438-454.

TEXTILE INSTITUTE (1958). 'Identification of textile materials', The Textile Institute, Manchester.

TILANUS, J.W.R. (1850) 'Sur la composition de la corne' In *Annuaire de chimie*, Libraire de l'Académie royale de médecine, Paris, Millon, E., Reiset, J., Ed. Baillière, J.B, Paris.

TIUNOV, A.V., KIRILLOVA, I.V. (2010). 'Stable isotope (C-13/C-12 and N-15/N-14) composition of the woolly rhinoceros *Coelodonta antiquitatis* horn suggests seasonal changes in the diet.' *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24(21): 3146-3150.

TOMBOLATO, L., NOVITSKAYA, E.E. *et al.* (2010). 'Microstructure, elastic properties and deformation mechanisms of horn keratin.' *Acta Biomaterialia* 6(2): 319-330.

TOUBOUL, D., HALGAND, F. *et al.* (2004). 'Tissue molecular ion imaging by gold cluster ion bombardment.' *Analytical Chemistry* 76(6): 1550-1559.

TRIM, M.W. *et al.* (2011) 'The effects of water and microstructure on the mechanical properties of bighorn sheep (*Ovis canadensis*) horn keratin.' *Acta Biomaterialia* ,7, 1228-1240.

V

VAN VUURE, C. (2005). 'Retracing the aurochs: history, morphology, and ecology of an extinct wild ox', Pensoft.

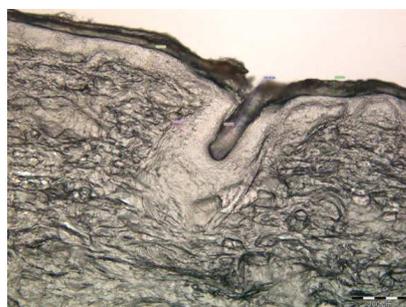
VESTERBERG, O. (1971) 'Isoelectric focusing of proteins'. *Methods in Enzymology*. 22: 389-412.

W

WALTER, P., WELCOMME, E. *et al.* (2006). 'Early use of PbS nanotechnology for an ancient hair dyeing formula.' *Nano Letters* 6(10): 2215-2219.

WARD, W. H., LUNDGREN, H.P. (1954). 'The Formation, Composition, and Properties of the Keratins.' *Advances in Protein Chemistry*. 9: 243-297.

Chapitre 3 : Imagerie chimique et structurale de la peau de momie



1	Analyse de la peau moderne en TOF-SIMS	162
1.1	Échantillon de peau de porc	162
1.2	Comparaison avec une peau humaine	166
2	Imagerie chimique de la peau de momie	168
2.1	Momies et momification	168
2.2	L'étude scientifique des momies	180
2.3	Analyse de la peau de momies naturelles et artificielles	190
	Bibliographie	229

La peau de momies naturelles et artificielles¹ a été analysée, en vue d'évaluer l'état de dégradation des protéines dans ces échantillons. A titre de comparaison, de la peau moderne a également été analysée.

1 Analyse de la peau moderne en TOF-SIMS

Comme dans le cas des autres tissus anciens, l'étude de la peau de momie nécessite l'analyse préliminaire d'un échantillon moderne. Dans un premier temps, nous avons analysé une peau d'origine porcine, plus facile à obtenir et qui constitue un bon modèle animal. Dans un second temps, il nous a été possible de comparer les résultats obtenus aux données acquises sur une peau humaine, dans le cadre d'un projet mené par l'équipe de spectrométrie de masse de l'ICSN (Gif/Yvette).

1.1 Échantillon de peau de porc

1.1.1 Pertinence du modèle

Le choix du porc comme animal modèle pour l'étude de la peau se fait sur plusieurs critères :

- même structure de la peau que chez l'homme (nombre de couches et épaisseurs similaires, mêmes structures vasculaires et immunitaires, présence de dermatoglyphes),
- durée de renouvellement de la peau similaire (30 jours chez le porc contre 27 jours chez l'homme),
- pilosité proche,
- mêmes facultés de cicatrisation (Guichaoua, 1977),
- même degré d'imperméabilité vis-à-vis des substances chimiques et même vitesse de pénétration (Dick, 1992).

La souris ou le rat ne présentent pas de telles similitudes avec l'homme (si l'on excepte le cas très particulier des souris *hairless* greffées avec de la peau humaine pendant six à huit semaines).

Ces caractéristiques ont permis d'utiliser la peau de porc (et plus particulièrement celle de l'oreille) pour effectuer notamment des tests de pénétration de produits cosmétiques avant les tests *in vivo* sur l'homme (Barbero, 2009). Cette pratique tend cependant à disparaître pour des raisons éthiques (risques de souffrance de l'animal), et l'on privilégie maintenant les expérimentations sur des modèles de peau artificielle (Kowalska-Pyłka, 2009).

1.1.2 Prélèvements

La peau a été prélevée *post mortem* à l'hôpital-abattoir expérimental de l'INRA à Nouzilly (Plateforme de chirurgie expérimentale de l'UMR Physiologie de la Reproduction et des comportements)². L'abattage de l'animal a été réalisé en

¹ Ces termes seront définis au 2.1.2.

² Merci à Gilles Gomot, responsable de la plateforme de chirurgie expérimentale de Nouzilly pour son accueil et sa prévenance ainsi qu'à Nicolas Bertho, chercheur à

conformité avec les lois sanitaires et éthiques, françaises et européennes. Les bouchers spécialisés de l'abattoir ont effectué, à notre demande et sous notre contrôle, un prélèvement, à l'aide d'un couteau de boucher au centre de l'oreille (peau et cartilage). L'individu sur lequel le prélèvement a été réalisé est une cochette de 7 mois, de race Large White. La fiche Abattoir de l'animal se trouve à l'Annexe 3.

1.1.3 Préparation des échantillons

L'échantillon a été placé dans du papier d'aluminium et transporté dans de la carboglace avant d'être conservé dans un congélateur à -80°C. Des coupes de 16 µm ont été effectuées quelques jours plus tard, en cryomicrotomie à -20°C. L'échantillon a été maintenu à l'aide de colle O.C.T, comme on le voit sur les photographies des Figure 1-1 a et b. La colle ne recouvrait pas l'échantillon donc était absente des coupes. Celles-ci ont été déposées sur un wafer de silicium conservées à -80°C jusqu'à l'analyse TOF-SIMS le lendemain.

Les coupes obtenues se composent de trois couches : deux couches de peau de part et d'autre d'une couche centrale blanche de cartilage (Figure 1-1 c). Quelques follicules pileux ont pu être visualisés dans la partie supérieure de la peau (Figure 1-1 d) ainsi que les fibres plus profondes (élastiques et de collagène), en contact avec le cartilage au niveau de l'hypoderme (Figure 1-1 e).

1.1.4 Analyses TOF-SIMS

Les spectres TOF-SIMS de la peau de porc sont dominés, surtout en mode d'ionisation positif, par les pics correspondant à des lipides (carrés évidés violets, Figure 1-2). Les quatre fragments correspondant à la phosphocholine sont présents : $C_5H_{12}N^+$ (m/z 86.11), $C_5H_{14}NO^+$ (m/z 104.12), $C_5H_{13}NO_3P^+$ (m/z 166.08) et surtout $C_5H_{15}NO_4P^+$ (m/z 184.09). Les autres pics détectés en mode d'ionisation positif correspondent au sodium et au potassium (losanges jaunes) ainsi qu'aux fragments de la glycine et de l'alanine (carrés verts).

En mode d'ionisation négatif, le spectre est dominé par les fragments protéiques CN^- et CNO^- (carrés verts, Figure 1-2) ainsi que par les ions phosphates PO_2^- et PO_3^- (triangles bleus). On détecte également du fluor, du chlore et un peu de soufre (losanges jaunes) et des fragments polysaccharides (carrés magenta). Les fragments lipidiques correspondent au phosphatidylinositol (présent dans les membranes cellulaires), aux sphingomyélines (présente dans les nerfs) et à la phosphocholine, également détectée en mode d'ionisation positif (et présente dans les membranes cellulaires et les nerfs). La présence de ces phospholipides peut expliquer l'intensité importante des pics phosphates. Les carboxylates d'acides gras majoritaires correspondent, à part égale, à l'acide palmitique C16:0 et l'acide oléique C18:1. Le cholestérol et son sulfate, composants importants des membranes cellulaires avec les phospholipides, sont également identifiés (ronds violets évidés). La Figure 1-3 permet de visualiser la localisation des différents composés lipidiques de la peau : le cholestérol est uniquement présent dans la barrière hydrolipidique de l'épiderme tandis que les autres lipides (en particulier les composés de la membrane cellulaire) sont présents dans toute l'épaisseur de la peau, plus particulièrement dans l'hypoderme. Les fragments lipidiques correspondants aux acides gras C16:0 et C18:1 sont présents dans l'hypoderme sous forme de gouttelettes.

Ces résultats sont compatibles avec la description de la structure de la peau présentée au chapitre 1.

l'Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires de l'INRA de Jouy-en-Josas, pour ses conseils sur le transport de la peau de porc.

Il est ainsi possible de distinguer certaines couches de la peau, du fait des différences de composition lipidique : le *stratum granulosum* de l'épiderme, riche en cholestérol, et l'hypoderme contenant des acides gras et de nombreux lipides (Figure 1-3).

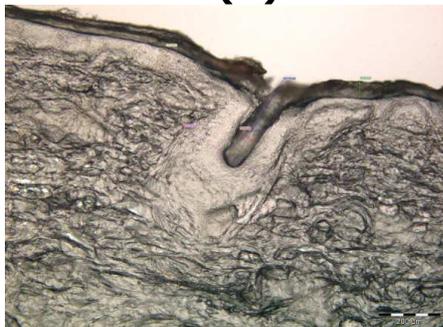
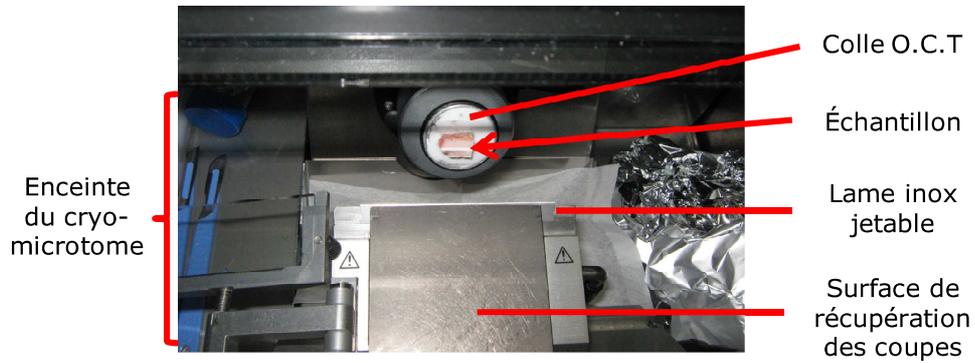


Figure 1-1 : Préparation de la peau de porc en cryomicrotomie. (a) Échantillon dans le cryomicrotome et (b) zoom sur la fixation à l'aide de la colle O.C.T. (c-e) Coupes obtenues avec (d) zoom sur un follicule pileux et (e) sur les fibres de l'hypoderme et le cartilage.

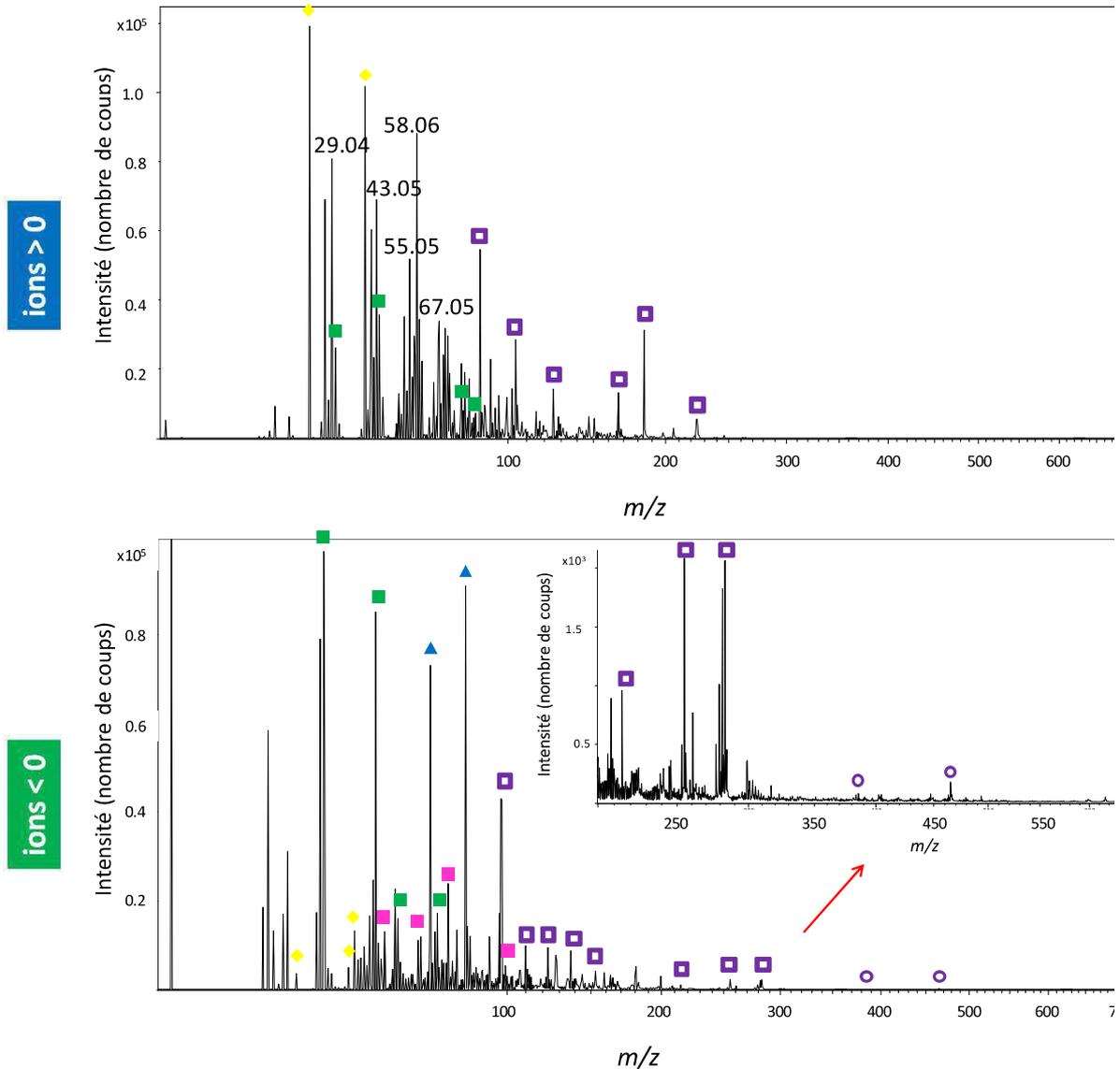


Figure 1-2 : Analyses TOF-SIMS d'une peau de porc : spectres totaux en mode d'ionisation positif et négatif. ■ Carrés verts : fragments protéiques. ◆ Losanges jaunes : ions sodium et potassium (positif) et fluor et chlore (négatif). □ Carrés violets évidés : lipides. ■ Carrés magenta : fragments polysaccharides. ▲ Triangles bleus : ions phosphates (en négatif). ○ Ronds violets évidés : cholestérol.

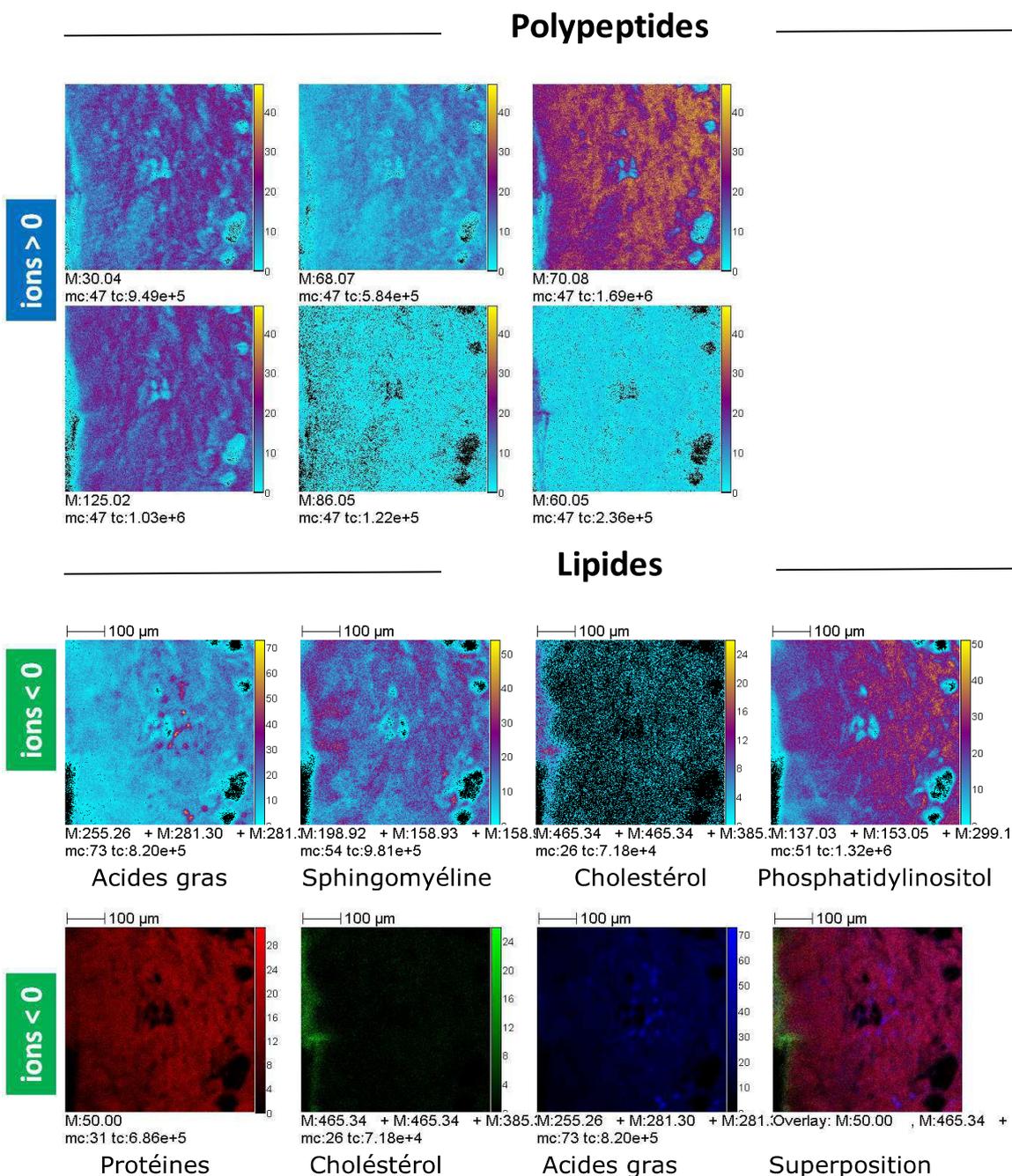


Figure 1-3 : Analyses TOF-SIMS d'une peau de porc : images ioniques correspondant aux principaux fragments d'acides aminés (mode d'ionisation positif), aux composés lipidiques (mode d'ionisation négatif) et superposition des images sommes correspondantes.

1.2 Comparaison avec une peau humaine

Les mêmes résultats que ceux établis dans le cas de la peau de porc ont pu être confirmés par le retraitement des données obtenues sur une peau humaine (Figure 1-4). Les différentes couches ont pu être délimitées sur la base de leur composition lipidique et un spectre a été extrait de chacune des ROIs correspondantes en mode d'ionisation positif. La comparaison des trois spectres est présentée Figure 1-4 (gamme de masse m/z 1-200). On constate que les trois spectres ont des aspects très similaires, les spectres de l'épiderme et de l'hypoderme contenant toutefois une part plus importante de fragments lipidiques que protéiques par rapport au derme.

1- Analyse de la peau moderne en TOF-SIMS

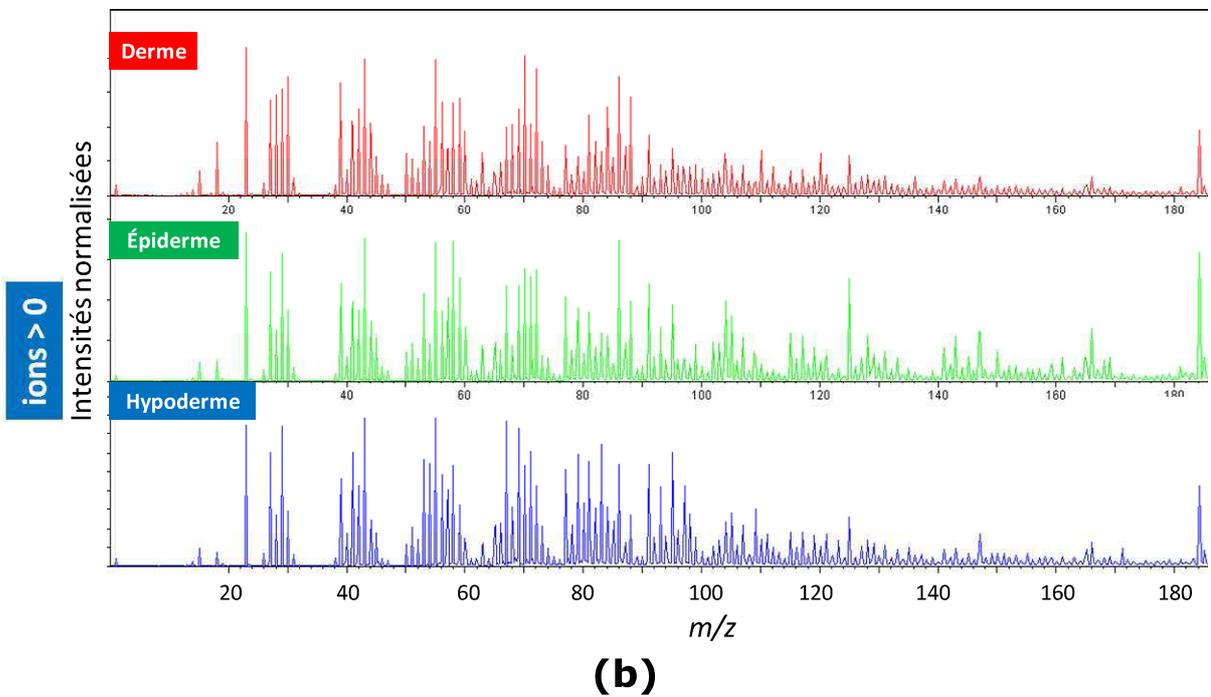
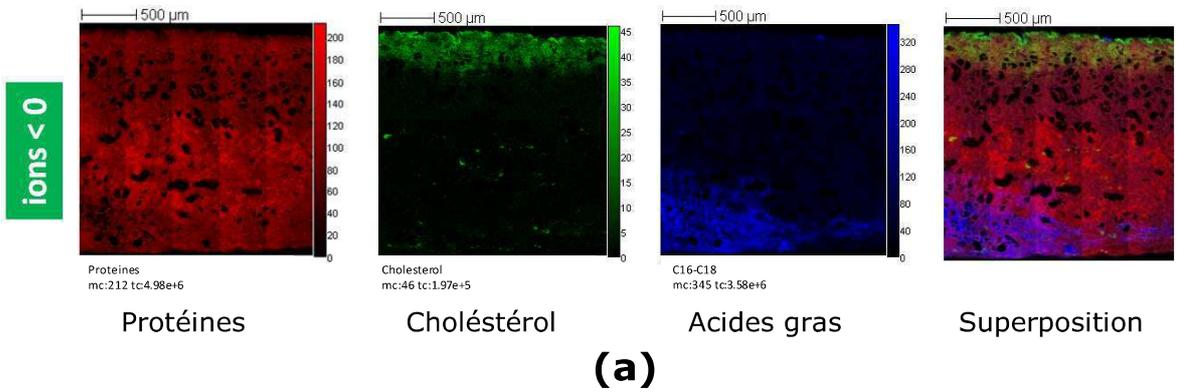


Figure 1-4 : Analyses TOF-SIMS d'une peau humaine moderne : (a) Images somme correspondant aux principaux fragments d'acides aminés, au cholestérol, aux carboxylates d'acides gras en C16 et C18 et superposition de ces images. (b) Comparaison des spectres extraits des trois couches principales (derme, épiderme, hypoderme), gamme de masse m/z 1-200.

2 Imagerie chimique de la peau de momie

2.1 Momies et momification

2.1.1 Qu'est-ce qu'une momie ?

On donne le nom de momie à un cadavre, humain ou animal, qui a été préservé de la destruction et de la putréfaction, totalement ou partiellement, depuis sa mort jusqu'à sa découverte. Plus précisément, il s'agit d'un corps dont les tissus mous sont encore présents, pour des raisons naturelles (environnementales) ou du fait d'une intervention humaine.

Le mot vient du perse *mum* qui désigne une substance cireuse, noire et dure : le bitume naturel. Abondant au Moyen-Orient, le bitume est devenu un remède très répandu en médecine à partir du XVI^{ème} siècle. En raison de la ressemblance d'aspect avec les momies embaumées égyptiennes, le terme momie a commencé alors à désigner ces corps conservés. Puis, par extension, le terme a été appliqué à toutes sortes de corps (voire de parties de corps) dont les chairs étaient préservées, au-delà du temps normal de décomposition, que ce soit naturellement ou artificiellement (Wieczorek, 2010 ; Aufderheide, 2003).³

On considère en général qu'un corps enterré à 1 m sous terre sera réduit à l'état de squelette (disparition totale des tissus mous) au bout de cinq à sept ans. Cette durée est réduite à un an environ en l'absence d'inhumation du corps voire à quelques semaines si la mort intervient en période estivale. La momification (naturelle) peut, quant à elle, commencer dès le deuxième jour suivant la mort, si les conditions environnementales adéquates sont réunies, mais le processus prend en général plusieurs semaines (Madea, 2010).

2.1.2 Typologie et exemples de momies

On a retrouvé et l'on retrouve encore aujourd'hui des momies dans le monde entier, sur tous les continents. Les plus anciennes momies humaines retrouvées à ce jour ont 7000 ans (momies de la culture Chinchorro).

Si les plus connues et les plus étudiées sont les momies égyptiennes, d'autres civilisations ont attaché une grande importance à la conservation des corps des défunts. Des corps momifiés nous sont aussi parvenus sans qu'il y ait eu volonté de préservation.

³ Notons qu'un grand nombre de momies égyptiennes ont été détruites entre le XVII^{ème} et le XIX^{ème} siècle afin de récupérer la substance noire d'embaumement, supposée avoir des vertus médicinales similaires à la *mumia* (Pommerening, 2010). Son utilisation est aussi attestée en peinture, comme pigment brun permettant de réaliser les carnations foncées ou les ombres (Jürgen-Fischer, 2010), pour l'alimentation des locomotives et comme engrais.

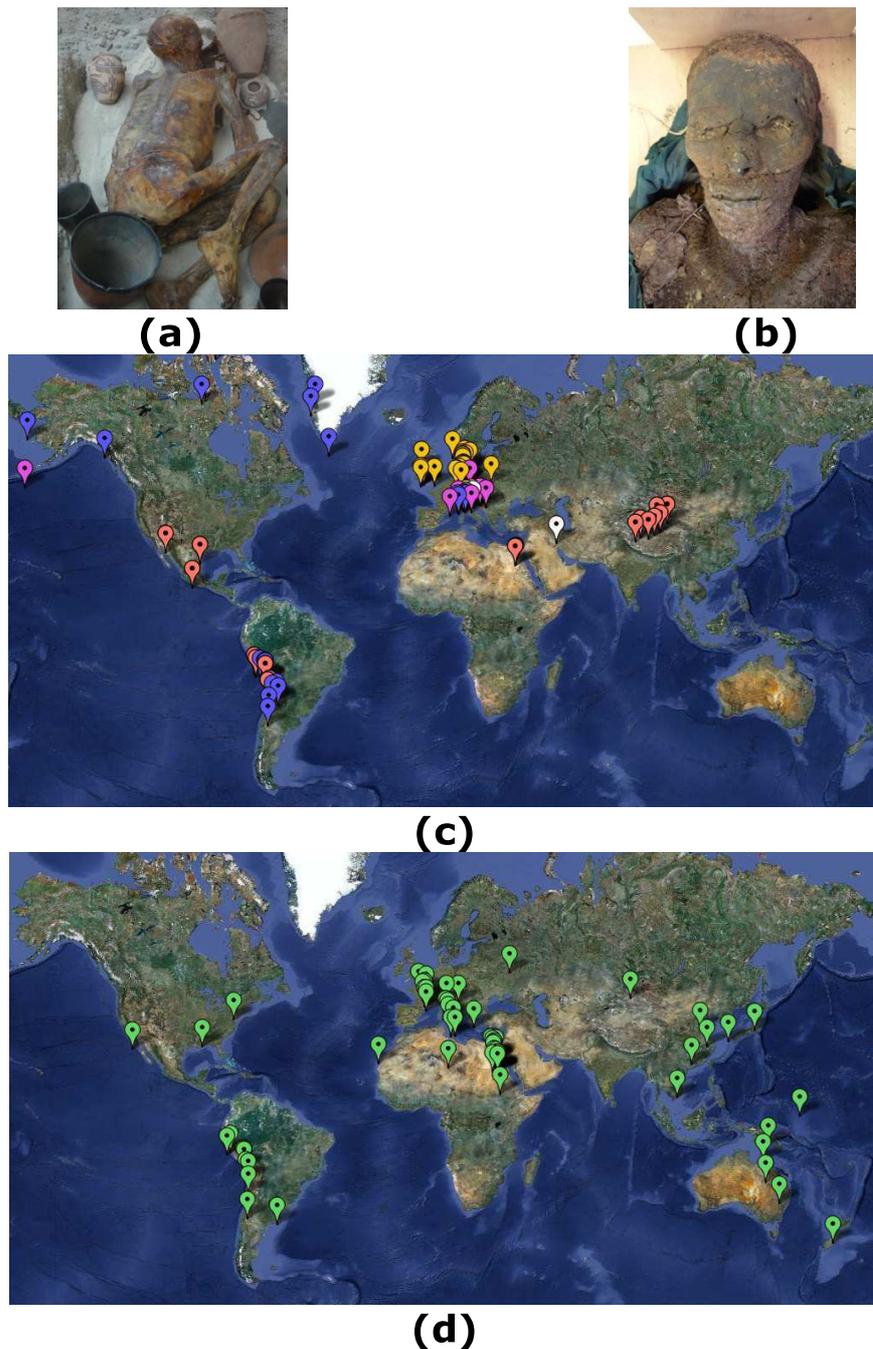


Figure 2-1 : Typologie des momies : (a) Momie naturelle égyptienne de l'époque prédynastique dite « Ginger » (b) Momie artificielle égyptienne de l'époque copte, provenant du site d'Antinoë © Pascale Richardin (c) Carte présentant la répartition des principales découvertes de momies naturelles à travers le monde. **Bleu** : momies glacées, **Rouge** : momies des déserts chauds. **Jaune** : momies des tourbières. **Violet** : momies des mines de sel. **Violet** : momies desséchées (cryptes, abris) et (d) Carte présentant la répartition des principales découvertes de momies artificielles. Les cartes ont été réalisées à l'aide de l'application Quickmap. ©Ken Hoetmer, à partir des références suivantes : (Wieczorek, 2010), (Aufderheide, 2003) et (Spindler, 1996).

On classe ainsi souvent les momies selon deux types :

- les momies artificielles pour lesquelles la préparation du corps après la mort a permis la préservation,
- les momies naturelles lorsque l'environnement seul a permis la conservation (Aufderheide, 2003).

Toutefois notons que cette typologie ne prend pas en compte le caractère intentionnel ou non de la momification : ainsi, dans certains cas, le corps n'est pas préparé mais placé dans un environnement local particulier afin de permettre la préservation (Edwards, 2002). Il semblerait donc plus judicieux de différencier les momies intentionnelles (dont la préservation a nécessité une intervention humaine particulière) et les momies naturelles, corps dont la momification est accidentelle, non recherchée.

Les Figure 2-1 a et b présentent respectivement une momie naturelle et une momie artificielle égyptiennes tandis que les cartes Figure 2-2 c et d permettent de visualiser la répartition des découvertes de momies naturelles et artificielles faites à travers le monde.

2.1.2.1 Momies naturelles

Shin distingue deux types de momies naturelles (Shin, 2003) :

- Les momies du permafrost
- Les momies des déserts chauds

À ces deux types d'environnements favorables à la momification naturelle, il faut ajouter, les tourbières, les mines de sel et certains abris favorisant la dessiccation (Wieczorek, 2010).

Nous détaillons brièvement ces différents environnements et donnons quelques exemples de momies qui y ont été découvertes.

2.1.2.1.1 Momies glacées

Comme indiqué sur la carte Figure 2-1c (balises bleues), les momies glacées ont été découvertes essentiellement dans la région Arctique, dans la Cordillère des Andes et dans les Alpes. Le plus souvent, c'est le froid et l'air sec qui ont permis la conservation des corps de manière exceptionnelle. Dans ce cas les tissus mous sont particulièrement bien conservés (Aufderheide, 2003).

La momie des glaces la plus célèbre est l' « homme de Hauslabjoch » (plus connu sous le nom d'Ötzi) retrouvé par des alpinistes sous un glacier, entre l'Italie et l'Autriche, le 19 septembre 1991. Les tissus biologiques, les os et les objets associés à la momie indiquent que l'individu aurait vécu entre 3400 et 3100 av. J.-C. (Prinoth-Fornwagner, 1994 et Kutschera, 2003). Il a fait l'objet de nombreuses études à cause de l'exceptionnel état de conservation de ses tissus (une soixantaine ont fait l'objet d'une publication depuis 1994). Il est conservé à -6.5°C sous une humidité

relative de 98% au musée de Bolzano, en Italie (Spindler, 1996). Plus généralement, des alpinistes et des soldats des deux Guerres Mondiales (comme les soldats autrichiens de Pejo) ont été retrouvés momifiés suite à des accidents dans les Alpes (Fleckinger, 2010).

Des corps également momifiés naturellement dans les glaces ont été retrouvés à Qilakitsoq au Groenland en 1972. Ce sont huit corps de nourrissons, enfants et femmes, protégés des prédateurs par des rochers, qui auraient vécu au XV^{ème} siècle (Hart-Hansen, 1996). Parmi les autres découvertes de corps momifiés dans la région arctique, on peut également citer le cas de la momie du XV^{ème} siècle nommée Kwäday Dän Ts'inchì, un homme de 20 ans découvert en 1999 au nord-ouest du Canada (Dickson, 2004), ainsi que les membres de l'expédition arctique menée par Sir John Franklin, disparus en 1848 (Fleckinger, 2010).

En Amérique du Sud, de nombreux corps d'enfants et d'adolescents ont été retrouvés dans des sanctuaires glacés, situés sur de hauts sommets de la Cordillère des Andes. Il s'agirait d'enfants issus de la noblesse, sacrifiés pour apaiser le courroux des dieux Incas. Les momies les plus connues sont l'enfant de Cerro El Plomo, la jeune fille surnommée « Juanita » retrouvée sur le mont Ampato ainsi que les trois enfants de Lullaillaco. Les feuilles de coca ou les traces de bière de maïs retrouvées auprès d'eux indiqueraient qu'ils ont été drogués avant le sacrifice (Tellenbach, 2010).

Il est intéressant de noter que l'utilisation du froid (cryogénéisation) est aujourd'hui la technique privilégiée pour conserver les corps à long terme (Graefen, 2010).

2.1.2.1.2 **Momies des déserts**

Les conditions de température et la grande sécheresse régnant dans les déserts (Sahara, Atacama, Gobi...) peuvent permettre une excellente conservation des corps qui y sont laissés. Ceux-ci sont en effet desséchés très rapidement du fait des conditions environnementales particulières. Le retrait de l'eau du corps ralentit voire inhibe le processus de putréfaction (voir paragraphe 2.1.3). La présence de sable ou de sel, sur ou dans le sol est aussi un facteur important favorisant la dessiccation du corps (Rosendahl, 2010).

Les premières momies égyptiennes connues étaient des momies naturelles. Datant de la fin de l'époque prédynastique (3300 av. J.-C.), elles ont été retrouvées notamment près du site de Gebelein, au sud de Thèbes. La plus connue de ces momies a été surnommée « Ginger » et est conservée au British Museum, à Londres (Aufderheide, 2003). Les plus anciennes momies de la civilisation Chinchorro (nord du Chili et sud du Pérou) auraient également été momifiées naturellement dans le sable du désert au sixième millénaire avant notre ère (Arriaza, 1996).

Le climat sec et le sol riche en sel du désert du Taklamakan, à l'ouest de la Chine, ont aussi favorisé la momification. Le cas de ces momies est présenté plus en détail au paragraphe 2.3.1.

Enfin, on retrouve aussi des momies pré-incaïques bien conservées dans les déserts côtiers d'Amérique du Sud. Des individus momifiés de la civilisation Chiribaya (X^{ème}-XIV^{ème} siècle ap. J.-C.) ont par exemple été retrouvés dans le désert de la vallée de l'Osmore, au sud du Pérou (Aufderheide, 2003).

2.1.2.1.3 **Momies des tourbières**

Des centaines de corps momifiés ont été retrouvés dans le nord de l'Europe (en Allemagne mais également en Irlande, au Danemark, au Pays-Bas et au Royaume-Uni), dans des écosystèmes particuliers appelés tourbières. Elles sont formées de déchets de mousses et autres matières végétales accumulés et fossilisés. Les marécages acides favorisent la conservation de la peau, des muscles et des tissus conjonctifs et donnent une couleur bronze aux visages tandis que les os sont déminéralisés ou absents (Aufderheide, 2003).

Le processus de momification n'est pas encore compris mais l'acidité de l'eau, l'absence d'oxygène et la présence de sphaigne pourraient expliquer totalement ou en partie l'exceptionnelle conservation des tissus des individus qui y ont été inhumés (Painter, 1991). Des expériences de momification en laboratoire sont toujours en cours pour tenter de mieux comprendre ce processus (Gill-Frerking, 2010).

La plupart de ces momies datent de l'âge du fer et les plus célèbres sont l'homme de Tollund (Danemark, II^{ème} siècle av. J.-C.) et l'homme de Lindow (Angleterre, I^{er} siècle av. J.-C.). L'existence de ce type d'inhumation, uniquement attesté en Europe du Nord, n'est évoquée que par l'historien romain Tacite (Tacite, 98). Il pourrait s'agir d'une punition à l'encontre de criminels ou d'une forme d'offrande aux dieux (Gill-Frerking, 2010).

2.1.2.1.4 **Momies des mines de sel**

Comme précisé précédemment, le sel est un bon agent desséchant. Il permet, en outre, la destruction des micro-organismes nécrophages. C'est pourquoi les corps des mineurs piégés accidentellement dans les mines de sel sont retrouvés momifiés. Leur conservation une fois excavés, ne peut être assurée que s'ils sont gardés dans le sel.

Au XVIII^{ème} siècle, l'« homme de sel » a été retrouvé dans la mine d'Hallstatt en Autriche puis enterré dans le cimetière municipal. Mais le cas le plus connu est celui des cinq mineurs de Chehrābād, en Iran. Trois ont été datés du IV^{ème} siècle av. J.-C., les autres des III-IV^{ème} et V-VI^{ème} siècles ap. J.-C. (Pollard, 2008). Suite aux fouilles entreprises sur le site depuis 1994, l'exploitation moderne de la mine a été stoppée et un large projet irano-germanique (the Chehrābād Saltmummy and Saltmine Exploration Project) de fouilles et d'études scientifiques des momies et des objets retrouvés sur place permet de mieux connaître ces momies et le mode de conservation de la matière organique dans cet environnement particulier (Ramaroli, 2010 ; ZEM, 2011). L'exploration d'autres mines de sel (par exemple la mine de Duzdagi en Azerbaïdjan ou la mine de Cardona en Catalogne) pourrait mettre au jour d'autres momies de ce type (Marro, 2010).

2.1.2.1.5 **Momies des abris et cryptes**

Les conditions environnementales stables des cavernes (naturelles), cryptes et catacombes ainsi que l'air sec qui y règne favorisent la momification naturelle. L'obscurité empêche en outre la prolifération de certaines bactéries responsables de la putréfaction, et ces lieux sont souvent difficilement accessibles aux éventuels prédateurs.

Ainsi l'on a retrouvé des corps momifiés dans la grotte de Spirit Cave (Nevada), dans les San Pedro Mountains (Wyoming), dans le cimetière de Guanajuato (Mexique) ainsi que dans l'église St Michael de Vienne, dans le monastère de Vác à

Budapest et l'église de Kampehl en Allemagne (corps du chevalier de Kahlbutz). Dans le cas des vingt momies de la crypte de la collégiale de Saint-Bonnet-le-Château (Loire), les momies du XV^{ème} siècle auraient été préservées, non seulement à cause des conditions environnementales de la crypte, mais aussi du fait de la présence d'arsenic et de pierre d'alun dans le sol (Rosendhal, 2010).

On a également retrouvé le corps momifié d'un ancien prisonnier arrêté au XIX^{ème} siècle, Elmer Mc Curdy, lors d'un tournage dans un parc d'attraction en 1976 (Aufderheide, 2003).

Les conditions réunies dans les abris et les cryptes peuvent être présentes dans certaines habitations et il arrive parfois que le corps de certains individus soit retrouvé à leur domicile plusieurs mois voire plusieurs années après leur mort dans un bon état de conservation. Bereuter (Bereuter, 1996) a par exemple étudié la formation du « gras de cadavre » (l'adipocire) sur les corps de deux hommes de 41 et 47 ans morts dans leur appartement et découverts respectivement 3 ans et demi et 4 ans plus tard. De même, le corps d'un indien mort de déshydratation en 1985, suite aux conseils peu avisés d'un charlatan, a été découvert à son domicile deux ans plus tard et étudié par Jit (Jit, 2001).

Un autre cas, plus étonnant, de momification naturelle est celui des quarante corps du baptistère de Venzone, au nord-est de l'Italie. Dans ce cas particulier, la présence d'un champignon bactéricide, *Hipha Bombicina Pers*, qui, en recouvrant les corps, aurait permis leur préservation. Les corps momifiés de l'église des Morts d'Urbania, en Italie centrale, auraient été préservés de la même manière (Rosendhal, 2010)

2.1.2.2 Momies artificielles

Dans le cas des momies artificielles, des conditions favorables à la momification sont recréées afin de permettre une préservation durable des corps. Ce souci est souvent lié à la croyance en une vie après la mort où le défunt aurait besoin de son corps intègre, mais la momification peut aussi servir à l'exposition et au transport du corps. Elle apaise aussi la douleur des proches et évite la décomposition vécue dans certaines civilisations comme une deuxième mort.

Cette intervention humaine contre nature peut aller d'un enveloppement dans une grande quantité de tissu à des processus beaucoup plus longs et complexes comprenant une préparation particulière du corps. Le cas de l'embaumement pratiqué en Égypte ancienne a été le plus étudié. Il a été décrit dès le V^{ème} siècle av. J.-C. par l'historien grec Hérodote puis au I^{er} siècle av. J.-C. par Diodore de Sicile et durait 70 jours. Il est également évoqué dans le livre de la Genèse (embaumement de Jacob et Joseph en Égypte, chapitre 50). Si les premiers rites funéraires connus dateraient de l'homme de Néanderthal, la momification en Égypte n'est attestée qu'à partir du troisième millénaire avant notre ère. En Amérique du Sud, cependant, des corps auraient été momifiés artificiellement, de manière très complexe, dès le cinquième millénaire av. J.-C. Il s'agit des momies de la civilisation Chinchorro, établie à partir du sixième millénaire avant notre ère sur les côtes du sud du Pérou et du nord du Chili (Wieczorek, 2010).

2.1.2.2.1 Préparation du corps

Plusieurs étapes de préparation ont pu être réalisées selon les périodes et les civilisations. Après le lavage, à l'eau ou à l'alcool, l'étape la plus importante consiste à dessécher le corps.

Retrait des organes et reconstruction du volume du corps

Les organes, susceptibles de mettre en péril l'intégrité du corps du fait de leur rapide décomposition, étaient souvent retirés du corps. En Égypte ancienne une incision d'une dizaine de centimètres, était pratiquée sur le flanc gauche, à l'aide d'un couteau d'obsidienne, afin de retirer les intestins, l'estomac, le foie et les poumons (Lichtenberg, 2000). La momification expérimentale moderne a permis de retrouver les gestes chirurgicaux pratiqués, ceux-ci n'étant que sommairement décrits dans les textes anciens (Brier, 2001). Ces organes retirés étaient parfois préservés dans les vases canope. Le retrait des organes était aussi pratiqué chez les Scythes. Au Chili, les Chinchorro retiraient en outre les muscles lors du démembrement du corps. En Amérique du Sud, le retrait des organes s'effectuait par voie basse plutôt que par incision de l'abdomen (Aufderheide, 2003). Selon les cas, le cerveau pouvait être retiré, par voie nasale ou par trépanation et le cœur pouvait être mis de côté.

Le retrait des organes et le dessèchement du corps provoquait un affaissement des tissus mous sur les os. Afin de maintenir le volume du corps, la cage thoracique pouvait être remplie de diverses substances comme de la sciure de bois, des lichens, des linges, du vin de palmier, des aromates, de la myrrhe et de la cannelle, dans le cas des embaumements égyptiens. Ces substances permettaient également d'absorber les fluides encore présents dans les tissus (Lichtenberg, 2000).

Dessèchement

Il s'agit de retirer l'eau et les fluides corporels du corps afin de limiter la prolifération des bactéries. Ceci est assuré par l'immersion du corps dans le sable ou des sels. Dans l'Égypte ancienne, les embaumeurs utilisaient une substance appelée natron. Il s'agit d'un mélange de sulfate et carbonate de soude, utilisée sous forme de cristaux solides, qui provoque, outre le dessèchement des chairs, la saponification des graisses et le tannage de la peau (Lichtenberg, 2000). Son action sur les tissus est en cours d'étude à l'Université de Zürich (Zentrum für Evolutionäre Medizin) où une jambe est immergée dans cette substance depuis 2 ans.

Chez les Chinchorros, le dessèchement était obtenu selon les époques par fumage ou par dessiccation lente sur un tapis d'herbes. Le fumage aurait aussi été utilisé pour conserver les corps de la civilisation de Paracas. D'autres agents ont été utilisés dans le cas des momies de capucins des catacombes de Palerme (XVI^{ème}-XX^{ème} siècle) : la craie et l'arsenic, après une dessiccation de 8 à 12 mois dans l'air sec de la crypte (Wieczorek, 2010).

Dans certains cas, l'intérieur du corps est aussi desséché, comme dans le cas des momies scythes de la culture de Pazyryk (1^{er} millénaire av. J.-C., Mongolie), grâce à un mélange de laine, sable, herbes, tourbe et crins de chevaux (Kernek, 2010). Les herbes étaient aussi utilisées par les Maori (Nouvelle-Zélande) pour la conservation des têtes tatouées des chefs, après retrait du cerveau et des globes oculaires (Günther, 2010). Dans le cas des momies Guanches (Thierner-Sachse, 2010) et des momies chinoises de l'époque Han, comme la momie de Manwangdui, datée du II^{ème}

siècle av. J.-C. (Werning, 2010), on se contentait de laver le corps avec des substances astringentes et absorbantes (vin de millet et pousses de curcuma en Chine, poussières de lave, plantes, écorce de pin et graisse de chèvre dans le cas des Canaries).

Embaumement

Afin de rendre la peau imperméable à tout microbe, le corps était enduit de diverses substances, certaines odoriférantes, d'autres antiseptiques.

En Égypte, les résines d'embaumement étaient constituées d'un mélange de produits naturels : cire d'abeille, résines de conifères, de pistachier (momies blanches) et bitume (momies noires) mais aussi huile de castor, résine Copal (Klys, 1999 ; Lucejko, 2012). Des momies embaumées de façon similaires ont été découvertes en Grèce (Papageorgopoulou, 2009) et à Riom, en Auvergne (Soto-Heim, 2000). Les momies scythes de Pazyryk étaient quant à elle recouvertes de cire, argile et mercure (Kernek, 2010).

A partir du deuxième millénaire, les corps reconstitués des momies Chinchorros étaient recouverts d'une pâte de boue à base de terre, d'eau et de protéines animales (Arriaza, 1996). Nous détaillerons ce cas très spécifique au paragraphe 2.3.4.1.

Enveloppement

Selon les cas, le corps est enveloppé dans plusieurs couches de tissus (en soie, laine ou cuir) ou dans des bandelettes de lin imprégnées de résine d'embaumement (Wieczorek, 2010).

Tatouages et décors corporels

L'insertion de substances colorantes sous la peau a toujours existé et existe toujours dans beaucoup de cultures. Pour cela une « aiguille » (une arête de poisson par exemple) est introduite dans la peau pour déposer une matière colorante à la jonction de l'épiderme et du derme. Après piquage, la peau se reconstitue et le motif coloré apparaît par transparence sous la surface cicatrisée de l'épiderme (Kluger, 2012).

Les raisons des marques corporelles effectuées sont diverses, de la thérapie à la pratique rituelle ou religieuse (croix sur le poignet des chrétiens coptes), en passant par le marquage d'une certaine catégorie sociale (appartenance à une tribu chez les berbères, femmes mariées inuites ou condamnés japonais, esclaves, soldats ou déportés pour ne citer que ces exemples), ou l'esthétique. Chez les égyptiens et les libyens, le dieu Bès (dieu de la fête et des danseuses) était parfois représenté sur des momies de femmes ce qui aurait constitué selon leurs croyances une protection contre les maladies vénériennes et la stérilité (Gilbert, 2001). C'est le cas de la momie d'une prêtresse d'Hathor nommée Ameut de la XI^{ème} dynastie (-2134/-2040) dont les bras et les cuisses portaient des lignes bleues parallèles et des motifs abstraits faits de points.

Parmi les momies sur lesquelles ont été observées des tatouages, on peut citer :

- les marques (57 lignes ou croix) à base de suie, au niveau de certaines articulations d'Ötzi (Pabst, 2009), qui auraient pu avoir un but thérapeutique,
- les tatouages décoratifs et figuratifs (animaux) des momies scythes de la culture de Pazyryk, situés sur des zones musclées et mobiles pour donner une impression de volume et de mouvement (Brilot, 2000),
- les marques (lignes et points) relevées sur les momies inuites de l'île de St Laurent en Alaska, permettant d'indiquer qu'une femme était mariée ou en âge de l'être ou qu'un homme avait abattu un nombre important de baleines ayant ainsi aidé la communauté à survivre,
- les tatouages d'oiseaux et reptiles sur les mains, les bras, les jambes et le cou des momies Chiribaya (sud du Pérou, X^{ème}-XIV^{ème} siècle ap. J.-C.),
- les marques des momies nubiennes de l'époque méroïtique,
- les tatouages des momies Maya, Chimu, Chickasaw, Iroquois, Moche (Alvrus, 2001),
- les représentations géométriques sur les corps de momies du Taklamakan (Debaine-Francfort, 2001).

Plus rarement, le corps embaumé est décoré à la feuille d'or, ce métal étant considéré comme la chair des dieux chez les égyptiens (Nicola, 2008 ; Lichtenberg, 2000). Cette pratique apparaît en Égypte à partir de l'époque romaine. L'or est déposé en particulier sur la tête, les mains et les pieds. On retrouve quelques exemples de telles momies dans la nécropole de Thèbes, dans le cimetière de l'Oasis d'El Kharga ainsi qu'à Antinoë. Rare, probablement réservée à des notables, cette décoration semble avoir concerné plus particulièrement des corps d'enfants (Dunand, 2006).

2.1.2.2.2 Choix de l'environnement de sépulture

Sarcophage

Pour éviter les infiltrations d'eau et maintenir une température et une humidité constante autour du corps, celui-ci était placé dans un sarcophage.

Dans le cas des momies égyptiennes, la plupart des corps embaumés sont placés dans un cartonnage, mélange de toile de lin et de papyrus usagés, recouvert de stucs et peints. Certains pouvaient faire plusieurs centimètres d'épaisseur (Lichtenberg, 2000). Les momies chinoises de la dynastie Han étaient enterrés dans plusieurs cercueil laqués placés en gigogne (Spindler, 1996).

Sépulture

Le lieu de sépulture revêtait aussi de l'importance pour la conservation du corps à long terme : grottes, kourganes, cryptes, tombeaux.

Le sarcophage et la sépulture permettent de protéger le corps des éboulements, des infiltrations et des pilleurs.

Des médecins légistes ont étudié l'influence de ces différents paramètres (présence de vêtements, d'un sarcophage, choix du lieu de sépulture) sur la préservation et plus particulièrement sur la formation d'adipocire (Forbes, 2005).

2.1.3 Modifications post-mortem des tissus et momification naturelle

Parmi les processus de conservation naturels, Bereuter (Bereuter, 1996) distingue le cas de la dessiccation (intense déshydratation qui réduit considérablement l'action de la plupart des micro-organismes), la formation d'une couche d'adipocire protectrice et le tannage dans l'environnement particulier des tourbières.

Dans tous les cas, il s'agit d'atteindre un état du corps thermodynamiquement stable après la mort.

2.1.3.1 Dégradation des tissus post-mortem

Plusieurs agents peuvent être responsables de la dégradation totale ou partielle d'un corps, tels que les insectes des tombes (mouches à viandes) et les bactéries issues de l'intestin du mort ou des réactions chimiques de dégradation des graisses (formation de gras de cadavre ou adipocire).

Dès la première heure suivant la mort, le corps subit différentes modifications. Dans un premier temps, la peau se décolore du fait de l'arrêt de l'irrigation puis les muscles se raidissent du fait de l'établissement de liaisons entre actine et myosine à cause de l'arrêt de la synthèse d'ATP.

Après ces premiers signes, le corps subit une décomposition ou bien se momifie.

La dégradation du corps est due à la fois à des phénomènes endogènes : autolyse, putréfaction et décomposition, et exogènes : prédateurs, dégradations mécaniques.

Au cours de l'autolyse, les organes sont détruits sous l'action de leurs propres enzymes, les cellules libèrent des enzymes capables d'hydrolyser les protéines des tissus et l'ADN, et la peau devient perméable à l'attaque de bactéries.

La putréfaction est une étape anaérobie, au cours de laquelle les bactéries de la flore microbienne de la peau et des muqueuses provoquent la liquéfaction des tissus graisseux et l'hydrolyse des protéines, l'accumulation de gaz dans l'abdomen qui se colore en vert, la destruction des globules rouges du sang et la destruction de l'épiderme. Le processus de destruction des protéines est accéléré si des asticots sont présents dans l'environnement. Cette étape dure entre une et deux semaines. La dernière étape, la décomposition, se produit en présence d'oxygène et conduit à l'oxydation des acides gras. A l'issue de ces différentes étapes, le corps est réduit à l'état de squelette. Selon le milieu d'enfouissement le processus complet prend entre cinq et sept ans.

Plus précisément, dans le cas des protéines, celles-ci subissent une dénaturation (perte des structures quaternaire et tertiaire) puis sont transformées en peptone et en oligopeptides et enfin hydrolysées en acides aminés. Si la dégradation se poursuit, les acides aminés eux-mêmes perdent leur fonction amine et ou leur fonction acide carboxylique, jusqu'à donner du CO₂ et de l'ammoniac (Madea, 2010). Les produits de dégradation connus de différents acides aminés standards sont présentés en Annexe 4.

2.1.3.2 Voies de momification

Plusieurs cas peuvent se présenter : il est indéniable que le froid sec et la chaleur aride limitent la prolifération de la plupart des micro-organismes (Spindler, 1996). Plus généralement, la putréfaction et l'action des asticots sont stoppés si la dessiccation du corps intervient rapidement, soit dans un environnement sec et frais soit grâce à des procédés de séchage accéléré sous l'action de sels ou de cendres. Dans d'autres cas, c'est la formation d'une couche cireuse grasse sur le corps qui le protège de la putréfaction. Le cas des momies des tourbières est particulier (Madea, 2010).

2.1.3.2.1 Dessiccation

Le cas de momification le plus courant, comme nous l'avons vu dans les différents exemples du paragraphe 2.1.2 est lié à l'évaporation rapide de l'eau des tissus. Celle-ci est favorisée si l'air est sec et l'environnement bien ventilé. La peau devient alors dure et sèche, les tissus se rétrécissent et le corps perd une grande partie de son poids.

Ce processus commence en général dès le deuxième jour suivant la mort, à partir des extrémités (doigt, oreilles, nez, menton, joues) mais le processus complet s'accomplit en plusieurs semaines (Madea, 2010).

2.1.3.2.2 Adipocire ou « gras de cadavre »

Dans certains cas, toute ou une partie de la peau se recouvre d'une substance grisâtre cireuse, appelée adipocire, qui protège le corps de la putréfaction mais ne préserve pas toujours les muscles (Madea, 2010).

Du latin *adeps* signifiant graisse et *cera* signifiant cire, l'adipocire désigne une substance grasse malléable à l'aspect savonneux qui se forme à la surface de certains cadavres (tels Ötzi ou Napoléon) ne présentant pas d'autre signe de décomposition. Elle aurait été observée pour la première fois en 1661 mais les premiers rapports précis datent de 1789. La première analyse chimique aurait été faite en 1823 par le chimiste Chevreul. Les médecins légistes désignent cette substance sous le nom de « gras de cadavre ». Grisâtre ou blanche, granuleuse et solide, elle s'observe lorsque le cadavre a été mis en présence d'un milieu humide anaérobie pendant au moins quelques mois (typiquement 3 à 6 mois même si Bereuter (1996) cite le cas d'une formation d'adipocire en 6 semaines qui résulterait de l'action de certains microorganismes.

La composition et le mécanisme de formation de l'adipocire ont été étudiés précisément (en chromatographie sur couche mince, en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse -GC/MS- et par résonance magnétique nucléaire- RMN) par Takatori (2001). Il donne la répartition des acides gras dans l'adipocire de la peau de cadavres de quelques mois :

- acide palmitique (50%),
- acide oléique (15%),
- acide 10-hydroxystéarique (15%),
- acide stéarique (6%),
- acides myristique et palmitoléique (5% chacun),
- acides 10-oxostéarique, linoléique, 10-hydroxypalmitique et 10-oxo-palmitique (moins de 1%).

Enfin il constate la présence inattendue d'acides 9-chloro-10-méthoxy-stéarique et palmitique, dans l'adipocire d'un nourrisson décédé 4 mois auparavant, dont la production serait chimique et non enzymatique.

La présence d'hydroxy- et d'oxo-acides gras à point de fusion plus élevés que les autres acides gras permettrait la stabilisation de l'adipocire après sa formation.

Nanikawa dans (1973) arrivait déjà à des conclusions similaires (prépondérance des acides gras saturés, présence d'hydroxyacides gras) sur la composition de l'adipocire mais émettait l'hypothèse d'une contribution des protéines de la peau pour expliquer la quantité plus importante d'acides gras dans l'adipocire que celle contenue initialement dans les graisses de l'hypoderme. Lehmann en 1888 avait déjà

posé le problème et il pourrait s'expliquer par la contribution des phospholipides des membranes cellulaires qui s'ajouteraient aux graisses de l'hypoderme pour la formation d'adipocire. Bereuter dans (Bereuter, 1996) propose quant à lui une comparaison de la composition de l'hypoderme avec celle de l'adipocire : il constate une augmentation importante d'acide palmitique (26% des graisses de la peau fraîche contre 53% de l'adipocire) et une diminution également conséquente de l'acide oléique (48,5% dans la peau fraîche contre 22% dans l'adipocire), l'évolution des proportions des autres acides gras étant négligeable. Il rapporte également la présence de stérols dans l'adipocire.

Il présente également les principales théories pour expliquer la formation d'adipocire :

- la théorie de la migration des graisses : les triglycérides se cassent et les principaux acides gras (palmitique et oléique) ainsi que le glycérol qui les composent migrent par diffusion et sédimentation à travers le tissu déstructuré.

- la théorie de la saponification : hydrolyse des acides gras issus des graisses du tissu adipeux puis combinaison avec des ions métalliques divalents tels Ca^{2+} et Mg^{2+} pour former un savon insoluble dans l'eau

- la théorie de l'hydrogénation : les acides gras insaturés libres après l'hydrolyse des triglycérides de l'hypoderme se transforment par hydrogénation et oxydation β en acides gras saturés. Ainsi l'acide oléique serait-il converti en acide palmitique, ce qui expliquerait alors l'inversion des proportions entre la peau fraîche et l'adipocire (Evershed, 1992).

La théorie de la saponification n'explique pas qu'il y ait si peu de savons dans l'adipocire par rapport à la proportion d'acides gras disponibles.

En outre, Takatori (2001) a cherché à expliquer le mécanisme de biosynthèse de l'adipocire par différentes bactéries anaérobies et aérobies (en effet, l'adipocire ne se forme pas dans un milieu aseptisé) et conclut que seule une (*Micrococcus luteus*) peut parvenir à une transformation enzymatique aboutissant à la formation d'oxo-acide gras. Le mécanisme de formation des oxo-acides gras mis en jeu serait le suivant (sur l'exemple de l'acide oléique) :

- hydrolyse de l'acide oléique pour donner de l'acide 10-hydroxystéarique
- puis déshydrogénation pour aboutir à l'acide 10-oxostéarique.

En conclusion, l'adipocire résulterait de la dégradation des graisses de l'hypoderme et des phospholipides de la peau selon un mécanisme d'hydrolyse suivi d'une hydrogénation, conduisant majoritairement à la disparition d'acide oléique en faveur d'acide palmitique et avec formation dans une moindre mesure d'acide 10-hydroxystéarique. Ce processus serait favorisé dans un environnement rendu anaérobie. Mais le système biochimique constitué par le corps humain peut suffire à induire le reste des conditions nécessaires à la formation d'adipocire, l'eau nécessaire à l'hydrolyse étant suffisante et les enzymes lipases déjà présentes (l'humidité ou la présence de micro-organismes ne seraient pas indispensables).

2.1.3.2.3 Tannage

Dans le cas des momies retrouvées dans les tourbières, la peau apparaît comme tannée (aspect du cuir). Ce processus permet par exemple de stabiliser les peaux animales qui, en étant transformées en cuir, ne sont plus susceptibles de se gélatiniser. Pour cela, il faut établir des liaisons solides entre fibres de collagène (réticulation).

Selon Painter, une réaction de Maillard entre des acides aminés libres du collagène et des groupes carbonyles de glycuronoglycanes de la sphaigne présente dans les marécages expliquerait ce tannage (Painter, 1991). Cette réaction complexe, en trois étapes, entre un acide aminé et un sucre, conduit à la formation d'acides carboxyliques insaturés odorants, appelés mélanoidines. Le processus en jeu empêcherait de nombreux micro-organismes susceptibles de dégrader les corps de survivre. Les eaux calmes et fermées des zones marécageuses pauvres en oxygène, la basse température de l'eau (environ 4°C) et l'acidité empêcheraient également la décomposition bactérienne. L'aspect de bronze donné à la peau proviendrait des substances libérées par la tourbe (Spindler, 1996).

Notons que la formation d'adipocire a aussi été observée dans certains cas sur la peau des momies des tourbières (Evershed, 1992)

2.1.4 Modification chimique et biologique des corps momifiés

Les momies peuvent se dégrader longtemps après la momification en cas de modifications du milieu d'enfouissement.

Celles-ci peuvent être dues, par exemple, à l'action de champignons ou de microbes. On a ainsi observé la présence d'oxalates de calcium sur la peau d'une momie égyptienne (Cotte, 2005) et la formation de vivianite $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ à la surface de la peau d'Ötzi (Pabst, 2009).

Plus généralement, on observe la présence d'insectes (morts ou vivants) à la surface de la peau et dans les cheveux de certaines momies (Wiezcorek, 2010).

L'utilisation de produits (en particulier insecticides) pour préserver les momies peut aussi avoir des conséquences sur leur préservation à long terme.

Enfin, le maintien ou le transport dans un lieu humide (cave, cale de bateau) pourrait être à l'origine de modifications chimiques contemporaines, notamment des graisses de la peau (Carminati, 2010).

2.2 L'étude scientifique des momies

Il existe de nombreuses études scientifiques sur les momies en particulier les momies égyptiennes (Zweifel, 2009).

Les objectifs de ces études peuvent être d'ordres très différents : médical (études anthropologiques et recherche de pathologies), archéologique (contexte de découverte), historique (documentation des processus de momification et rituels associés), physico-chimique, biologique ou génétique.

Nous séparons les analyses globales des corps momifiés des analyses biologiques et chimiques concernant les prélèvements de tissus et les matériaux utilisés pour la préparation du corps. Le résumé les caractéristiques des principales techniques utilisées.

2- Imagerie chimique de la peau de momie

Technique	Méthodes	Échantillon	Informations	Limites	Caractère
Datation ¹⁴ C	Spectrométrie de masse par accélérateur (AMS)	Matière organique (os, cheveux, poils, textiles et bois de la tombe, végétaux)	Chronologie absolue	- Contamination - Quantité d'échantillon	Destructif
Analyses génétiques	Amplification en chaîne par polymérisation (PCR)	Os surtout mais aussi dents, cheveux et tissus mous	- Filiations et populations - Bactéries et pathogènes - Maladies	- Contamination - ADN trop dégradé	Micro destructif
Imagerie médicale	Endoscopie	Corps entier intègre	Biopsies internes	- Invasif	Non destructif
	Radiographie		- Squelette, âge - Présence des organes, sexe, maladies	- Influence sur l'ADN et la datation ¹⁴ C	
	Scanner		Présence de tissus mous et organes	- Coût, - Déplacement du corps	
	Imagerie par résonance magnétique		Baumes et talismans	- Difficile en l'absence d'eau	
Spectroscopie THz	Imagerie	Corps entier possible	Structures sans problèmes de radiations ionisantes	- Long - En développement - Problème de résolution	Non destructif
Études Biochimiques des tissus	Microscopie optique	Tissus	Informations visuelles	- Peu précis	Micro destructif (prélèvement, coupes)
	Microscopie électronique à balayage		État des tissus, minéraux et insectes	- Sur prélèvement, non réutilisable	
	Microscope électronique en transmission		Ultrastructures (fibres de collagène, mélanine...)	- Coupes nécessaires	
	Histologie		Structures des tissus et cellules	- Coupes nécessaires - Classe de molécules et composés prédéfinis	
	Immuno-histochimie		Présence de certaines protéines et espèce	- Identifications ciblées - Coupes nécessaires	
Analyses physico-chimiques	Test de Gram		Présence et identification de bactéries (staphylocoques....)	- Identifications ciblées - Coupes nécessaires	
	Analyses MEB-EDX	Tissus et prélèvements de surface	Analyse élémentaire	Pas de caractérisation moléculaire	Non destructif ou micro destructif
	Spectroscopies vibrationnelles (IR et Raman)		Groupes fonctionnels organiques et quelques composés minéraux : protéines, lipides, de la peau, baumes, dégradations, phosphates et oxalates	Classes de molécules essentiellement	
	Diffractions des rayons X		Nature des phases minérales cristallisées	Matériaux cristallisés surtout	
GC et GC-MS FAB-MS ICP-MS	Caractérisation précise des mélanges organiques (baumes)		Matière organique uniquement		
Autres techniques	Réflectographie IR	Tatouages	Présence de tatouages	Composition du tatouage non caractérisée	Non destructif
	Analyses isotopiques	Régime alimentaire	Caractérisation du type de nourriture absorbée		Micro Destructif

Tableau 2-1: Techniques d'études scientifiques des momies.

2.2.1 *Études globales*

Nous entendons par étude globale des études scientifiques qui s'intéressent à l'individu dans son ensemble (état et conservation du corps, pathologies, patrimoine génétique, date de la mort) : on distinguera les études non destructives des analyses sur prélèvements.

2.2.1.1 *Analyses non destructives*

Les différents techniques d'imagerie issues du milieu médical sont de plus en plus employées pour l'étude des momies et permettent un premier diagnostic global de l'état de conservation du corps, de l'âge et du sexe de l'individu, des techniques d'embaumement, des éventuelles pathologies du défunt et des causes de la mort. Elles sont souvent complémentaires car chacune présente des limites et s'applique au corps entier ou bien à un organe. La résolution offerte ne permet pas, pour le moment, d'obtenir des informations précises sur les mécanismes de momification des tissus (Conlogue, 2008).

2.2.1.1.1 Endoscopie

L'endoscopie est une méthode invasive mais non destructive qui permet de voir les structures internes du corps, les organes, et de réaliser des biopsies. Elle peut être utilisée pour étudier la momie à l'intérieur de son sarcophage. Cette technique de visualisation directe peut s'avérer utile pour les momies à dessiccation avancée dont les organes internes sont devenus très petits et donc difficiles à voir en imagerie. (Nunn, 1986).

Depuis la fin des années 70 cependant, on privilégie l'utilisation de techniques non destructives et non invasives (Zweifel, 2009).

2.2.1.1.2 Radiographie aux rayons X

L'année suivant la découverte des rayons X par Röntgen, König a appliqué la radiographie à l'étude de restes momifiés (Boni, 2004). La radiographie est basée sur l'absorption différentielle de rayons X de faible longueur d'onde par les structures internes du corps selon leur densité.

Cette technique permet d'étudier le squelette (sous la peau et les organes momifiés) et ainsi d'évaluer l'âge au moment de la mort- que l'on peut confirmer par un examen dentaire, le sexe (à partir de la largeur du bassin notamment), les éventuels traumatismes, problèmes de croissance ou certaines spécificités anatomiques de la momie mais également un éventuel bouleversement voire un déplacement des os. Depuis les années 1970, elle peut être appliquée sur le site de la découverte grâce à un appareil portable (David, 1997).

2.2.1.1.3 Scanner (ou CT-scan)

Cette technique permet de voir les structures internes du corps plus en détail que la radiographie, en particulier les organes. En outre, il est possible de reconstituer des images en trois dimensions des structures anatomiques et d'obtenir des images en coupe du corps tous les millimètres. Cette technique permet de déterminer, dans le cas d'une momification artificielle, si les organes ont été retirés, et dans le cas d'une momification naturelle, de les localiser et d'estimer leur état de dessèchement et de conservation. Il s'agit d'une méthode de choix pour effectuer un débandelettage et une autopsie virtuelle. Toutefois, si la façon dont l'excérébration

par le nez s'est déroulée peut-être mise en évidence et les principaux organes présents, les tissus musculaires et les cavités délibérément rembourrées visualisées, la nature de ces rembourrages ainsi que l'état structurel précis des organes ne peuvent être déterminés sans études sur prélèvements.

Pour la mise en œuvre de cette technique, la source de rayons X tourne autour du corps et des détecteurs placés en regard permettent de mesurer l'absorption des rayons par le corps (Aufderheide, 2003).

Parmi les momies étudiées par scanner, on peut citer la momie péruvienne (Arica, XIII^{ème} siècle) immortalisée par Hergé sous les traits de Rascar Capac (Appelboom, 1999), les momies égyptiennes du Science Museum of Minnesota (Notman, 1986) et les momies coréennes de Yangju datée du XV^{ème} siècle (Lee, 2007)).

De même, employée sur des momies Chachapoyas, elle permet de visualiser les corps tels qu'ils sont agencés sous les épaisseurs de textile (corps recroquevillé ou fagot d'os), la présence et la position du cerveau et des viscères et les éventuelles voies d'éviscération (Friedrich, 2009). Plus récemment, le cerveau momifié d'un enfant mort au XIII^{ème} siècle et exhumé à Quimper a été étudié en CT et la répartition de la substance blanche et de la substance grise au sein du cerveau desséché a pu être observée (Papageorgopoulou, 2010).

Dans tous les cas, les progrès et résultats de la technique CT dépendent essentiellement de la résolution du scanner utilisé et de notre connaissance du comportement d'absorption des rayons X des tissus secs momifiés, comme le constatait déjà Pahl dans (Pahl, 1981). Le défi à relever aujourd'hui est d'améliorer la résolution afin de pouvoir visualiser de façon précise la peau et les résines d'embaumement (Lynnerup, 2010). On peut toutefois citer l'étude de Sydler (Sydler, 2009), sur l'influence des différents types de momification sur le rétrécissement des tissus mous comme la peau.

2.2.1.1.4 Imagerie par résonance magnétique(IRM)

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) du proton est une autre technique d'imagerie médicale, permettant la représentation du corps en trois dimensions (Collectif ZEM, 2011). A priori, l'IRM ne convient pas a priori à l'étude des tissus desséchés puisque cette technique est basée sur l'excitation d'atomes d'hydrogène, en particulier ceux présents dans les molécules d'eau des tissus. Elle se pratique sur les momies glacées comme dans le cas d'Ötzi et permet, à défaut d'un diagnostic clinique, de différencier la peau des os. Notons que pour cette étude, un appareil portable a pu être utilisé, évitant ainsi le déplacement de la momie (Rühli, 2007a).

Pour les momies sèches, elle permet d'obtenir des informations concernant uniquement les tissus proches de la surface (Münnemann, 2007) où elle se pratique après réhydratation des tissus par de l'acétone (pour augmenter le temps de relaxation) mais ne peut plus être qualifiée de technique non invasive dans ce cas.

Une autre possibilité consiste à exciter d'autres atomes comme du sodium ²³Na, qui peut être présent en quantité dans les os de momie desséchés à l'aide de natron par exemple (Münneman, 2007). Une étude en RMN du phosphore ³¹P a aussi été tentée pour l'étude du cerveau d'une momie égyptienne (Karlik, 2007).

En imagerie clinique classique, l'IRM permet d'obtenir des images plus contrastées des tissus mous par rapport au scanner. De plus, comme il ne s'agit pas d'une technique utilisant des rayons ionisants, ce type d'étude préserve l'ADN et les tissus pour une analyse génétique comme pour une datation au carbone 14 (Rühli, 2007b).

2.2.1.1.5 Imagerie Téraherz

Récemment, une autre technique a été employée pour étudier un tissu momifié : l'imagerie Téraherz (Öhrström, 2010).

Connue pour son application aux nouveaux contrôles de sécurité dans les aéroports, cette technique permet également d'étudier l'intérieur du corps des momies et de différencier os, tissus mous et amulettes (Fukunaga, 2011). Son efficacité est théoriquement plus grande dans le cas des momies que dans le cas des tissus frais (Fitzgerald, 2006) puisque ce rayonnement est fortement absorbé par l'eau. En outre, le rayonnement THz (d'une longueur d'onde comprise entre 0.1 et 1 mm) est réfléchi par les matériaux métalliques mais perméable aux vêtements (Collectif ZEM, 2011).

Notons que la spectroscopie THz, réalisable avec la même source de rayonnement, permet en principe d'identifier certaines substances chimiques (drogues détenues par un individu dans son manteau par exemple) et pourrait donc être utilisée pour l'identification non destructive des produits utilisés pour l'embaumement de momies (Öhrström, 2010).

Comme l'IRM, cette technique n'affecte pas l'ADN ni les tissus susceptibles d'être soumis à une analyse génétique ou une datation radiocarbone.

2.2.1.2 *Analyses effectuées à partir de prélèvements*

Trois types d'informations sur l'individu peuvent être obtenues grâce à des prélèvements : l'époque à laquelle il a vécu, sa filiation génétique, ainsi que les maladies dont il a pu souffrir.

2.2.1.2.1 Datation

De même que l'étude iconographique d'un éventuel sarcophage, du lieu d'inhumation ou des objets entourant le défunt, la datation permet de situer la momie dans le temps et donc éventuellement dans une civilisation.

La technique de datation par le carbone 14 permet d'obtenir une datation absolue à partir de matières organiques (Anderson, 1947). Dans le cas des restes humains, elle est en général effectuée à partir d'un prélèvement d'os. Elle peut aussi être effectuée sur les tissus (laine, cuir, fourrure, soie, coton), bois, charbon, osier, coquillages, coraux ou les déchets végétaux (sphaigne, paille, blé, graines diverses) accompagnant la momie ou encore sur la peau, les muscles, l'émail, les poils ou les cheveux de l'individu. La datation de cires, comme par exemple celle de bustes d'Henri IV (Le Hô, 2011) est également possible.

Une des difficultés majeures pour obtenir des résultats de mesure fiable est d'éliminer les sources de contamination possibles des échantillons (Évin, 2005). Pour cela, ceux-ci peuvent être prélevés aux endroits de la tombe ou du corps où ils n'ont pas été en contact avec l'environnement. Par exemple, dans le cas d'une momie, il est préférable d'effectuer les prélèvements dans le corps plutôt qu'en surface, comme cela a été fait pour Ötzi (Prinooth-Fornwager, 1994). Dans le cas des cheveux, une extraction des protéines du cortex permet de limiter la contamination (Richardin, 2011).

Notons que la quantité d'échantillon nécessaire pour la datation a diminué et que les mesures sont devenues rapides (une trentaine de minutes) depuis l'avènement de la spectrométrie de masse par accélérateur (AMS en anglais) : selon les tissus quelques milligrammes à 2 grammes suffisent (Richardin, 2003).

2.2.1.2.2 Études génétiques

Jusqu'au milieu des années 70, les études génétiques se limitaient à l'étude des protéines contenues dans les tissus momifiés, les antigènes correspondant aux groupes sanguins en particulier.

La première analyse a été réalisée par Pääbo en 1985. A partir du tissu humain sec, quelques centaines de milligrammes d'ADN sont extraits, purifiés, centrifugés puis amplifiés à partir d'une réaction en chaîne par polymérase (PCR). Cette technique a été employée pour obtenir le génome complet d'Ötzi à partir d'ADN mitochondrial (Ermini, 2008). Il appartiendrait à une population génétique aujourd'hui très rare en Europe. De même, l'étude de Gilbert (Gilbert, 2008) sur l'ADN mitochondrial de momies eskimo a montré qu'ils n'étaient affiliés génétiquement ni aux eskimos d'aujourd'hui ni aux Amérindiens.

La contamination des tissus est le problème principal (David, 1997), mais son impact peut être limité par l'analyse croisée d'ADN des os, des dents et des cheveux comme présenté dans (Amory, 2007) sur des momies glacées du XVIII^{ème} siècle retrouvées en Sibérie. Ce problème de sensibilité aux pollutions exogènes s'est posé dans le cas d'Ötzi, dont le corps avait été transporté et manipulé par plusieurs personnes.

De plus, cette étude s'avère difficile, si des études par scanner ou par rayons X ont été réalisées auparavant sur les os, voire impossible si les momies ont été irradiées aux rayons gamma pour leur conservation. Ces rayonnements pénétrants induisent en effet des modifications au niveau de l'ADN (Cockburn, 1985).

L'étude est également impossible sur les momies des tourbières car le milieu de leur enfouissement ne permet pas la conservation de l'ADN (Renaud, 2008).

2.2.2 Analyses biologiques des tissus momifiés

Pour les tissus momifiés, les techniques d'étude les plus utilisées sont celles issues de la biologie et de la médecine : histologie, microscopie optique et électronique et analyses immunohistochimiques.

Le principe et l'intérêt de l'histologie et des microscopies optique et électroniques ont été présentés au chapitre 1 (paragraphe 2.2). Nous nous contenterons de préciser la préparation nécessaire des tissus momifiés pour ces études.

2.2.2.1 Réhydratation des tissus

Les études sur les tissus biologiques, tels que la peau des momies, sont souvent difficiles en raison de leur texture et il est nécessaire de les réhydrater, comme expliqué au chapitre 1.

Dès 1852, Czermak a effectué des expériences de réhydratation des tissus mais la première expérience reportée en détail date de 1910. La technique mise au point à cette époque par Ruffer, sur une peau de momie égyptienne est encore utilisée aujourd'hui (Balout, 2006).

Pour une bonne réhydratation, Mekota définit les critères suivants (Mekota, 2005) :

- diffusion rapide et uniforme de l'agent réhydratant,
- obtention d'une bonne souplesse pour l'échantillon et une éventuelle consolidation,
- protection contre des dégradations ultérieures liées à la décomposition,
- hydratation.

La majorité des protocoles publiés correspondent à une immersion directe du tissu dans une solution. L'incidence de la composition de la solution et de la durée d'immersion sur les différents types de tissus a parfois été étudiée. La durée d'immersion optimale dans le cas de la peau (embaumée) préconisée par Mekota est de 36h (Mekota, 2005). Elle peut nécessiter plusieurs heures voire plusieurs jours dans le cas de tissus devenus durs (Klys, 1999 ; Balout, 2006), ou au contraire 1 ou 2h pour les tissus encore mous (Balout, 2006).

La solution aqueuse proposée par Ruffer comprend du carbonate de sodium (Na_2CO_3) destiné à faciliter la pénétration de l'eau dans les tissus, et de l'alcool pour neutraliser les enzymes protéases susceptibles de détruire le tissu réhydraté. Le carbonate de sodium a malheureusement un effet destructeur vis-à-vis des fibres de collagène et il est nécessaire de surveiller la réhydratation (Aufderheide, 2003).

Pour pallier ce défaut, Sandison réalise la solution dans du formaldéhyde à 1 %. Ainsi le tissu est immergé dans une solution constituée de :

- 5 volumes de formaldéhyde à 1 %,
- 3 volumes d'alcool à 95°,
- 2 volumes de carbonate de sodium à 5 % (Sandison, 1955).

Il s'agit du protocole le plus utilisé aujourd'hui (Jit, 2001 ; Guillot, 2005 ; Boano, 2009 ; Papageorgopoulou, 2010). Le détachement du *stratum corneum* de la peau a toutefois été rapporté dans certains cas de réhydratation avec cette technique (Rabino-Massa, 1981).

Les autres solutions utilisées pour réhydrater la peau sont composées de paraformaldéhyde à 4% (Shin, 2003) seul, de diméthylsulfoxyde dans un tampon de pH=7.6 (Mekota, 2005), de chlorure de sodium à 1% (Klys, 1999) ou de milieux de culture cellulaire (Wick, 2001). Depuis les années 80, la tendance est à la réhydratation à l'aide de solutions proches du milieu cellulaire réel. Deux autres protocoles ont été publiés, dans lesquels le tissu est préalablement placé dans un sac filtrant avant immersion dans la solution de réhydratation.

Dans le cas de la momie embaumée de Ramsès II, Durigon rapporte l'utilisation de filtres fins en nylon tissé plongés dans une solution proche de celle de Sandison (Balout, 2006) :

- 85 g de bicarbonate de sodium à 10 % pour assurer un gonflement progressif,
- 10 g de formol à 1 % pour éviter la putréfaction une fois l'échantillon hydraté,
- 5 g de glycérol pur pour éviter l'éclatement des structures cellulaires.

Le protocole mis au point par Cotte utilise quant à lui un sac à dialyse (Cotte, 2004 et 2005). Le principe de la dialyse est le suivant : les petites molécules diffusibles passent à travers la membrane semi-perméable du sac, du côté le plus concentré vers le moins concentré en cette espèce. Parallèlement, l'eau entre dans le sac par osmose. Le plus souvent, les sacs à dialyse sont constitués d'esters de cellulose, de dérivés cellulosiques et de cellulose régénérée (Gauthier, 2009).

Les échantillons de momie naturelle chinoise et embaumée égyptienne ont été placés dans un sac à dialyse et immergés pendant 24h dans l'eau ou dans un sérum physiologique. Outre la coloration en histologie et les observations en microscopie, les coupes obtenues à partir des tissus réhydratés à l'aide de cette technique ont pu être analysées en microfluorescence X et en imagerie IR (Cotte, 2004).

Les autres voies à explorer dans ce domaine pourraient être la réhydratation dans une enceinte à humidité contrôlée ou l'utilisation de la capillarité (cette technique est en cours de test au ZEM).

Parmi les autres techniques utilisées en biologie, les analyses immunochimiques sont parfois appliquées aux tissus momifiés.

2.2.2.2 *Analyses immunochimiques*

L'immunochimie est utilisée couramment en médecine pour établir des diagnostics sur une maladie précise (Willcox, 2002). Elle utilise le fait qu'un antigène correspond à un anticorps spécifique. Ainsi en mettant en contact un tissu avec un anticorps spécifique d'un antigène donné, il est possible d'établir la présence ou l'absence de cet antigène dans le tissu. Pour suivre la réaction biologique l'anticorps est préalablement marqué, par exemple, à l'aide d'une substance fluorescente (on parle alors d'immunofluorescence). Le marqueur couplé à l'anticorps peut également être une enzyme provoquant une coloration (Heremans, 1978).

L'utilisation d'anti-cytokératine comme colorant immunohistochimique permet par exemple de montrer la perte de la couche épidermique : ainsi dans le cas de la peau d'Ötzi, aucune coloration révélant la présence de kératine n'a été détectée (Bereuter, 1997). Le même genre d'étude peut être effectué pour le collagène. Ainsi les études de Wick (sur des momies péruviennes de 500 à 1500 ans) et Stücker (momies des tourbières) suggèrent une meilleure conservation des collagènes I et III ayant une structure tertiaire en triple hélice (Wick, 2001 et Stücker, 2001).

Notons que cette technique, comme l'histologie, ne permet d'étudier qu'un type de molécules présélectionnées au détriment de leur interaction avec d'autres classes de molécules. Les analyses chimiques par spectrométrie vibrationnelles (IR et Raman) ou chromatographie en phase gazeuse couplées à la spectrométrie de masse (GC-MS) permettent, en revanche, d'étudier simultanément plusieurs classes de molécules (principalement organiques) de la peau.

2.2.3 *Analyses chimiques des tissus et baumes de momification*

2.2.3.1 *Spectroscopies infrarouge et Raman*

2.2.3.1.1 *Spectroscopie infrarouge*

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier permet d'identifier des fonctions chimiques, plus particulièrement dans les échantillons de nature organique. Elle est plus rarement appliquée dans le cas des tissus momifiés que les autres techniques, mais permet de caractériser les tissus eux-mêmes, leur dégradation (adipocire, dégradation des protéines, présence de phosphates et d'oxalates de calcium) et les produits d'embaumement.

Trois études ont été publiées :

- l'étude de Bereuter, en microscopie ATR, sur la peau de momies glacées d'individus contemporains et d'Ötzi (Bereuter, 1997)
- l'étude de Küpper, en microscopie ATR également, sur des momies des tourbières (Küpper, 2001)
- l'étude de Cotte, en imagerie avec rayonnement synchrotron, sur une momie embaumée égyptienne et une momie naturelle chinoise (Cotte, 2004 et 2005).

2.2.3.1.2 Spectroscopie Raman

Une autre méthode spectroscopique est très utilisée pour étudier les dents, la peau, les cheveux, les organes, les os, les ongles (et dans le cas des animaux les griffes, les sabots et l'ivoire) des momies : la spectroscopie Raman (Smith, 2004). Elle permet d'avoir des informations précises sur les lipides et protéines de la peau. Elle est ainsi utilisée en biologie *in vivo* avec l'avantage d'être non destructive et de ne pas nécessiter la dessiccation préalable du tissu (Edwards, 2002). Les matériaux tels que la peau sont fluorescents et nécessitent l'utilisation d'un spectromètre Raman à transformée de Fourier et d'un laser proche infrarouge (Smith, 2004).

La momification et l'état de conservation sont étudiés à partir de l'intensité relative des bandes Raman correspondant aux lipides et aux protéines. En particulier, les signaux correspondant aux ponts disulfures entre deux molécules de cystéines sont très résistants et permettent l'étude de la kératine (Edwards, 2002).

Edward et Williams ont réalisé une étude sur la peau d'Ötzi (Williams, 1995) ainsi que sur la peau de momies de Qilakitsoq (Groenland) et de momies naturelles péruviennes Chiribaya de l'an mil (Edwards, 2002) en les comparant à des échantillons de peau moderne. Ils ont remarqué que la congélation des tissus induisait un léger décalage des pics Raman dans ce cas (Williams, 1995).

Une autre étude intéressante a été faite sur une peau d'une momie égyptienne embaumée : Nekht-Ankh trouvée dans la tombe dite « des deux frères » datée de -2000 environ (XII^{ème} dynastie). Les spectres correspondant à des échantillons où les protéines étaient très bien conservées montraient des sous-bandes caractéristiques de la structure secondaire des protéines : hélice α et feuillet β dans les bandes amide I et amide III. Une autre découverte intéressante est la présence des bandes correspondant à du sulfate de sodium (appelé aussi « gâteaux de sel » ou thénardite sous cette forme solide). Il s'agirait d'un composé du baume de momification. Les protéines et les lipides semblent pourtant moins bien conservés aux endroits où ce composé est présent.

Ainsi, il apparaît que les spectroscopies Raman et IR sont complémentaires pour l'étude des tissus momifiés. Cependant il est difficile de détecter certains composés simultanément à cause d'un chevauchement des signaux.

La spectroscopie Raman permet de travailler de manière non destructive et sans préparation mécanique ou chimique sur des échantillons avec une bonne résolution spatiale (de l'ordre du micromètre). Toutefois il est nécessaire de choisir et de fixer une longueur d'onde d'excitation adaptée aux peaux de momie (qui limite la fluorescence). De plus, la qualité des spectres n'est pas aussi bonne qu'en IR, et tous les composés ne peuvent pas être étudiés simultanément (tandis que l'infrarouge permet de révéler la présence de tout composé absorbant dans la région spectrale balayée). De plus le Raman ne donne pas assez d'informations pour distinguer triglycérides, acides gras et leurs sels pour parler d'adipocire, contrairement à l'IR (Bereuter, 1997). En revanche il est possible de distinguer précisément la structure secondaire des protéines en Raman, ainsi que de faire des études en profondeur sans coupes grâce au mode confocal. Un autre problème peut se poser en Raman dans le cas des peaux de momies très foncées, riches en mélanine : l'absorption importante des rayons laser ne permet pas d'obtenir un bon rapport signal sur bruit.

2.2.3.2 Étude des baumes de momification

La plupart des études publiées sur la composition des substances de préparation des corps après la mort (desséchant, résines d'embaumement) concerne l'embaumement des momies égyptiennes.

Si la spectroscopie IR permet une première caractérisation de ces produits, la chromatographie en phase gazeuse permet une analyse organique plus fine. En effet, en séparant les composés du mélange, souvent complexe et du fait de sa grande sensibilité, cette technique - éventuellement couplée à la spectrométrie de masse - permet une identification fiable et complète des composés présents (Buckley, 2001 ; Tchaplà, 2004).

D'autres techniques ont parfois été utilisées ponctuellement, en complément : la spectrométrie de masse à bombardement d'atomes rapides (FAB-MS), pour l'étude de biomolécules lourdes et peu volatiles (Proefke, 1992), et la diffraction des rayons X pour l'identification des produits cristallisés (Lucejko, 2012).

Les principales substances identifiées dans les produits d'embaumement des momies égyptiennes sont des résines et des composés aromatiques :

- la cire d'abeille, à partir de la basse époque et jusqu'à l'époque romaine, qui possède des propriétés d'hydrophobie, antibactériennes et d'étanchéité (identifiée par des alcanes en C₂₇, C₂₉ et C₃₁ et des esters en C₄₀ et C₄₆),
- les résines triterpénoïdes⁴ de type *Pistacia*, comme la térébenthine ou le mastic (à partir de 900 av. J.-C. jusqu'à notre ère),
- la résine de conifère qui constitue la base du baume dans tous les cas (diterpénoïde, identifiée par la présence d'acide 7-oxohydroabiétique),
- le bitume (à partir 600 av. J.-C. jusqu'à notre ère), produit dérivé du pétrole (hydrocarbures saturés et aromatiques),
- la résine balsamique (à partir du nouvel Empire),
- plus rarement : une résine de type Copal (Klys, 1999), mastic, huile de ricin (Lucejko, 2012) ou de Brassicacea comme le colza (Langlois, 2011).

Une étude reporte l'utilisation de résine de pin associée à une autre substance d'origine végétale dans un baume de momification précolombien (Degano, 2009).

Les composés lipidiques présents dans les baumes forment un réseau aliphatique polymérisé constituant une couche de protection contre les micro-organismes. Des tannins végétaux, également présents dans les mélanges, tels que les acides hydroxyhydrocinnamique, vanillique, protocatéchuïque et gallique, confèrent à certaines momies égyptiennes une odeur « agréable ». Dans certains cas, du cholestérol et des acides gras impairs issus de la peau sont aussi détectés dans les échantillons (Tchaplà, 2004 et Lucejko, 2012). Enfin, les spectres de GC-MS présentent souvent des pics correspondant aux produits d'oxydation des lipides et terpènes présents dans les résines d'embaumement ou la peau. Ceux-ci peuvent résulter du chauffage du baume de momification, nécessaire afin de le fluidifier suffisamment pour imprégner la peau et remplir les cavités du corps.

⁴ Pour mémoire, les terpènes sont une famille de composés chimiques, souvent présents dans les résines et les laques, d'origine végétales ou animales, et de formule générique (C₅H₈)_n. On distingue les monoterpènes (n=2, C₁₀H₁₆), les sesquiterpènes (n=3, C₁₅H₂₄), les diterpènes (n=4, C₂₀H₃₂) et des triterpènes (n=6, C₃₀H₄₈).

2.3 Analyse de la peau de momies naturelles et artificielles

A travers les échantillons auxquels nous avons eu accès, la peau de plusieurs types de momies a pu être étudiée : momie d'un désert chaud (et salin) et momies préparées égyptiennes et chilienne. Le cas des momies glacées, des mines de sel et des tourbières n'est pas, en revanche, abordé.

2.3.1 Momies naturelles du Taklamakan : difficultés de l'étude

2.3.1.1 Les momies de Djoumboulak Koum

Les momies naturelles dont la peau a été étudiée dans ce travail proviennent du site de Djoumboulak Koum, dans le désert du Taklamakan. Situé dans la province chinoise du Xinjiang, au nord-ouest de la Chine, ce désert très sec de hautes dunes est bordé au sud par les mont Kulun précédant le plateau du Tibet, et au nord par les monts Tien Shan. Bordé par deux voies de la Route de la Soie, cet espace inhospitalier avait été exploré par le suédois Sven Hedin au XIX^{ème} siècle (Debaine-Francfort, 1994).

De nombreuses momies ont été trouvées dès 1959, notamment dans le bassin du Tarim, dans un état très bien conservé : momie d'homme de Cherchen, « Beauté » de Loulan ... (Wang, 1996). Plus au sud, le bassin de la Keriya et notamment ses anciens deltas asséchés sont explorés par une mission franco-chinoise menée par Corinne Debaine-Francfort et Idriss Abdouressoul depuis 1989, sous l'égide de l'Institut d'Archéologie et du Patrimoine du Xinjiang. Après avoir mis au jour la cité historique de Karadong, occupée du III^{ème} au V^{ème} siècle ap. J.-C., avec en particulier la découverte de deux sanctuaires bouddhiques aux peintures murales d'influence indienne, l'équipe a découvert la cité plus ancienne de Djoumboulak Koum, en 1994. Les fouilles de 1996 révèlent derrière l'épais rempart, des habitations, une écurie, une fosse à chameaux, des lieux de stockage et un réseau d'irrigation à l'extérieur. Mais c'est en 2001 qu'un déplacement de dunes met au jour une nécropole de plusieurs cimetières, hors les murs, où 30 tombes ont été fouillées. Dans le cimetière D, cinq momies naturelles sont retrouvées couchées sur le dos, jambes repliées. Certaines sont entourées d'un cercueil creusé dans le tronc d'un peuplier. L'une porte un suaire rouge. Les corps comme les nombreux objets et tissus, composés de matière organique, ont été conservés de manière exceptionnelle. De nombreux textiles préparés, teintés, finement tissés, constituant parures et costumes, en laine, lin, crin, fourrure, feutre ou cuir témoignent des savoir-faire de tisserands de la population qui habitait cet endroit. Les momies sont actuellement conservées au musée provincial du Xinjiang à Urumqi (Debaine-Francfort, 2001).

De 2007 à 2010, plusieurs échantillons de nature organique provenant essentiellement du site de Djoumboulak Koum et de ses environs ont été datés par radiocarbone au C2RMF (Richardin 2007 et 2010), notamment une vingtaine de textiles et cuirs, une dizaine de fourrure, des poils d'animaux, des bois de charpente, des ligatures végétales et de la corde, des charbons de bois ainsi que des cheveux et du bois de cercueils de momies du cimetière D. Ces études ont confirmé une occupation du site dès le V^{ème} siècle av J.-C. au moins. Quelques échantillons du cimetière D (une fourrure et les cheveux d'une des momies) semblaient plus anciens et le bois de charpente d'une maison découverte en prospection sur un autre site au nord de la ville daterait du troisième millénaire avant notre ère.

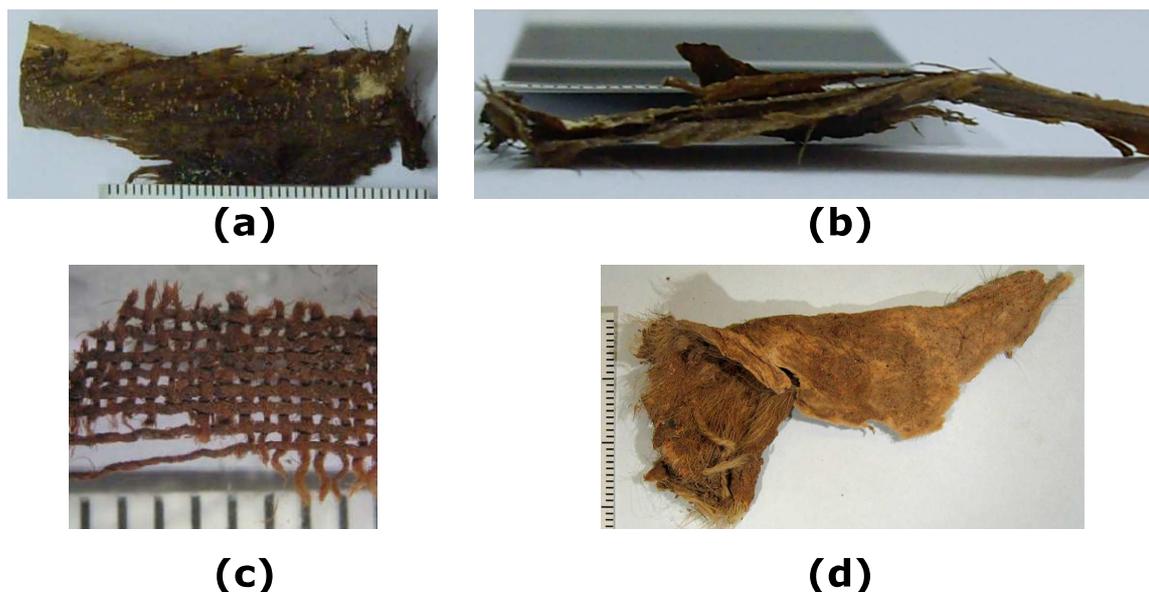


Figure 2-2 : Photographies à la loupe binoculaire des échantillons du site de Djoumboulak Koum (Taklamakan, Xinjiang, Chine) étudiés. (a-b) Prélèvement de peau de jambe de la momie MD16, (c) fils de laine d'une chemise en toile de laine et (d) cuir (échantillon DK5) © Nathalie Gandolfo. L'écart entre deux graduations de la mire correspond à 1 mm.

2.3.1.2 Présentation des échantillons

Dans le cadre de cette thèse, deux échantillons de peau ont été étudiés :

- un fragment de peau de jambe (Figure 2-2 a et b),
- un fragment de peau du visage situé sous la moustache.

Un fragment de cuir (Figure 2-2 d), provenant d'un niveau d'habitation *intra muros*, et des fils de laine (Figure 2-2 c), provenant de la chemise d'une momie du cimetière D, ont aussi été analysés.

2.3.1.3 Essais de préparation de la peau

Compte tenu des études bibliographiques effectuées et des essais de Marine Cotte lors de sa thèse (Cotte, 2004), plusieurs paramètres ont été testés pour la préparation de la peau de momie naturelle desséchée :

- la réhydratation (nécessité, choix du liquide, durée),
- l'enrobage (agent, nécessité d'une interface entre l'échantillon et l'agent enrobant),
- la technique de coupe (cryomicrotomie, ultramicrotomie, ultracryomicrotomie).

2.3.1.3.1 Réhydratation

Le protocole de réhydratation suivi pour cette étude et pour les momies embaumées égyptiennes (voir paragraphe 2.3.2) est largement inspiré de celui mis au point par Cotte (Cotte, 2004)⁵.

L'échantillon, découpé à l'aide d'un scalpel aux dimensions adéquates pour l'inclusion et la coupe (1x1 mm² maximum - exemple Figure 2-3 b), est placé dans

⁵ Merci à Sabine de la Porte (Laboratoire de Neurobiologie et Développement, CNRS UPR 3294, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, Gif sur Yvette, France) pour ses suggestions et son aide lors de la mise en œuvre de ce protocole.

un sac à dialyse CelluSep H1 (Interchim, Montluçon, France), préalablement rincé à l'eau distillée puis à l'eau ultrapure. Le sac est fermé à l'aide de deux agrafes (ou clamp) et immergé dans une solution de réhydratation comme indiquée Figure 2-3 a.

Plusieurs solutions de réhydratation ont été testées : l'eau ultrapure, l'eau ultrapure avec du sel (9g /L) et un tampon phosphate salin (PBS). Ce dernier est composé de sels de sodium et de potassium ainsi que de phosphates de sodium et de potassium. Il donne de meilleurs résultats⁶ probablement à cause de son isotonicité avec les fluides corporels. Il introduit en revanche des ions phosphates dans l'échantillon.

Nous avons également fait varier le temps de réhydratation de 24 à 48h, sans remarquer de différences notables sur les échantillons du Taklamakan (peau et moustache).

2.3.1.3.2 Enrobage

Plusieurs types d'enrobage ont été testés. Dans un premier temps, l'échantillon a été inclus dans de la gomme adragante. Celle-ci, parfois utilisée en biologie à la place de la colle OCT, n'a pas permis de maintenir les échantillons de façon assez ferme pour permettre la coupe. L'inclusion dans une résine polyester n'a pas non plus permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Ceci s'explique par le fait que cette résine soit hydrophobe et de dureté très différente par rapport aux échantillons réhydratés.

L'inclusion dans la colle OCT est la plus adaptée pour la réalisation de coupes dans le cas des échantillons étudiés. Cependant, cet agent enrobant possède un signal complexe en TOF-SIMS, dont les nombreux pics sont susceptibles de masquer les signaux intéressants. D'autre part, l'extrême sécheresse des échantillons rend difficile leur réhydratation et leur enrobage efficace.

Nous avons choisi de conserver le sac à dialyse pour l'enrobage de l'échantillon, son retrait provoquant la dislocation de l'échantillon dans l'OCT.

2.3.1.3.3 Coupes

Les coupes ont été réalisées en cryomicrotomie. Des essais ont également été effectués en ultracryomicrotomie (Figure 2-3 d). Les coupes sont souvent morcelées (Figure 2-4 a-c), les échantillons réhydratés se dissolvant partiellement dans l'OCT. Le retrait partiel de l'OCT autour du matériel une fois les coupes déposées s'avère très délicat en raison de la fragilité des échantillons réhydratés : les différentes couches de la peau risquent de se séparer. Il est donc nécessaire de veiller à ce que l'OCT ne se redépose pas à la surface des coupes, au moment du retour à température ambiante.

2.3.1.4 Résultats

Les spectres sont tous dominés, dans les deux modes, par les signaux correspondant à l'OCT et au sac à dialyse. La localisation du sac à dialyse, autour de l'échantillon, a pu être effectuée grâce à la colocalisation des signaux polysaccharides en mode d'ionisation négative (Figure 2-4 d). Le sac à dialyse est en effet constitué de dérivés cellulosiques.

⁶ Ce fait a également été constaté par l'équipe d'histologie du ZEM (Nathalia Shved, communication privée)

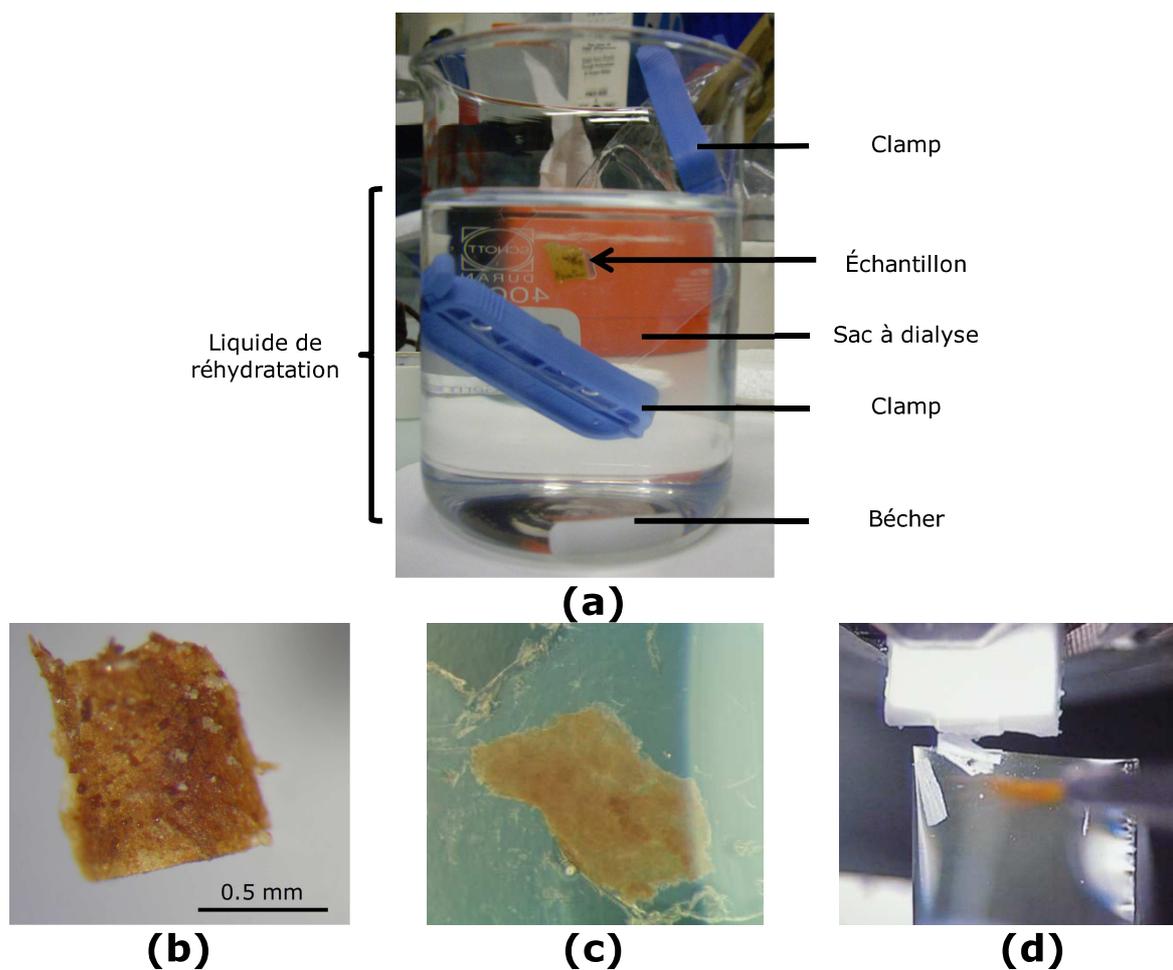
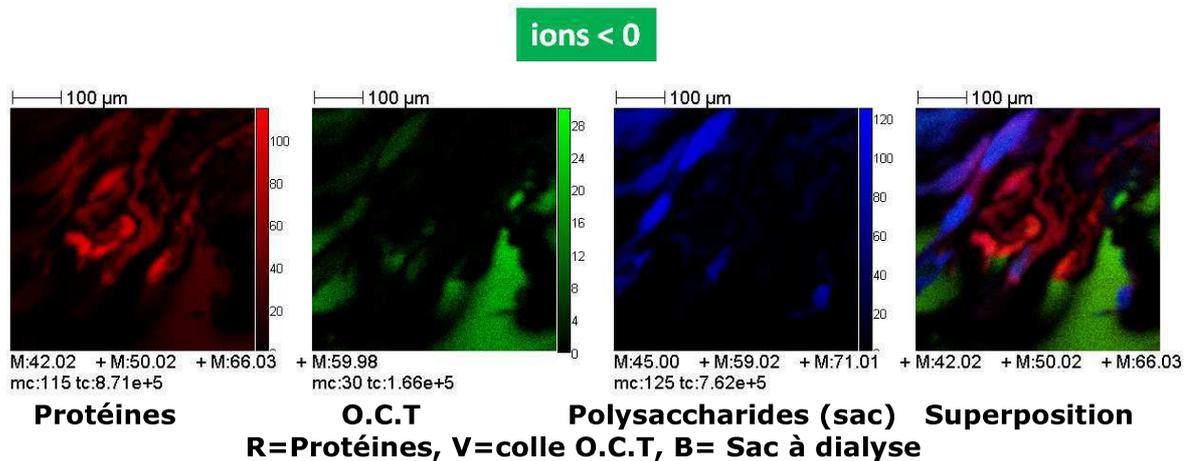
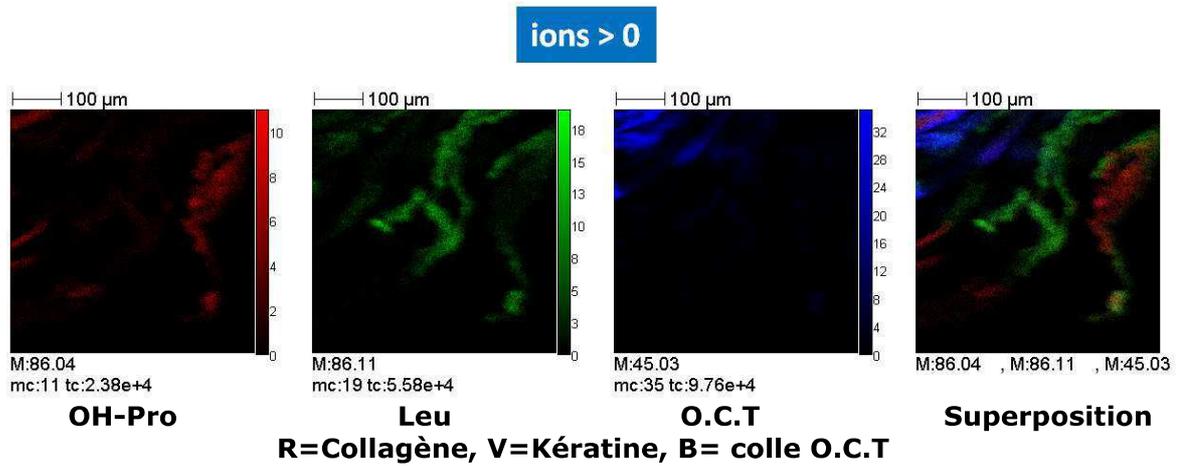
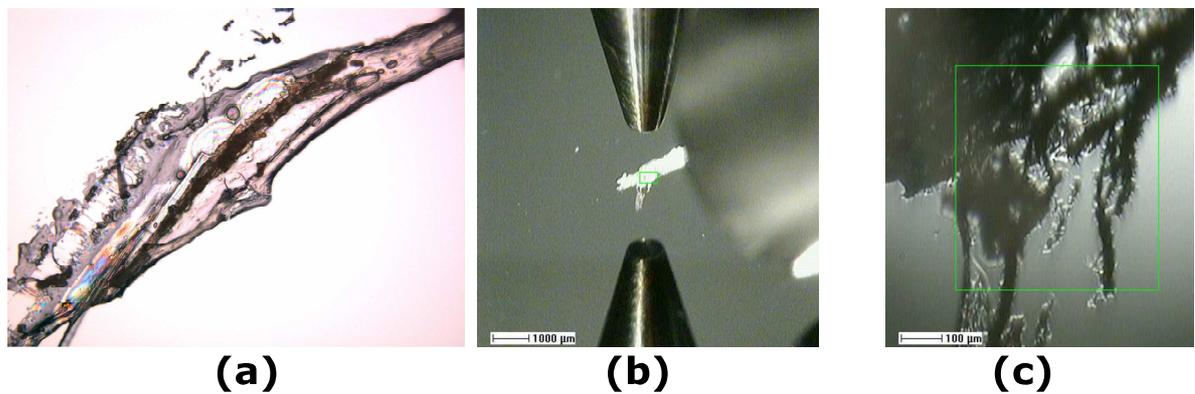


Figure 2-3 : Préparation de la peau de momie du Taklamakan. (a) Photographie annotée du protocole de réhydratation. (b) Photographie à la loupe binoculaire d'un échantillon de peau de jambe de la momie MD16, (c) de l'échantillon réhydraté après 24h dans l'eau ultrapure et (d) du processus de coupe d'un bloc en ultracryomicrotomie à l'aide d'un couteau de verre.



(d)

Figure 2-4 : Analyse TOF-SIMS d'une peau de momie du Taklamakan. (a) Photographie au microscope optique d'une coupe d'échantillon inclus dans l'OCT. (b-c) Photo de l'échantillon étudié dans la chambre d'ionisation du TOF-SIMS. Le cadre vert correspond à la zone analysée. Images ioniques et superposition (d) en mode d'ionisation positif et négatif.

2.3.2 *Momies artificielles égyptiennes*

Des échantillons de deux origines différentes ont été analysés : les échantillons de momies égyptiennes conservées au musée anthropologique de la Faculté de Médecine de l'Université d'Athènes, étudiés par Marine Cotte au cours de sa thèse (Cotte, 2004), et des échantillons recueillis dans le cadre du projet d'étude des collections égyptiennes du site d' Antinoë.

2.3.2.1 *Momies égyptiennes du musée d'Athènes*

2.3.2.1.1 Contexte de l'étude

Trois échantillons ont été étudiés :

- l'un prélevé sur le ventre d'un enfant,
- les deux autres sur la jambe d'une momie de femme.

Les deux momies correspondantes dateraient du I^{er} siècle ap. J.-C (Cotte, 2004).

2.3.2.1.2 Difficultés de préparation

L'observation à la loupe binoculaire du prélèvement (déjà utilisé par Marine Cotte lors de sa thèse) révèle la présence d'un tissu et d'une résine noire correspondant probablement au baume de momification (Figure 2-5 a). La peau est en revanche difficile à localiser. Nous avons donc décidé de réhydrater l'échantillon.

Suite à cette opération, plusieurs couches sont visibles (Figure 2-5 b) :

- une couche supérieure marron de fibres épaisses (tissu imbibé de baume ?)
- une couche beige avec des lobules (kératinocytes de l'épiderme ?)
- une couche beige de fibres fines moins ordonnées que celles de la première couche (fibres de collagène ?)
- et une couche ocre d'aspect visqueux (hypoderme dégradé ?).

Plusieurs cratères sont visibles sur la tranche de l'échantillon, certains contenant des grains brillants blancs (natron ?). Malheureusement la réhydratation a fragilisé l'échantillon et sa manipulation et son enrobage dans l'O.C.T, pour effectuer des coupes en cryomicrotomie, se sont avérés très délicats.

L'allure de la coupe étudiée en TOF-SIMS est présentée Figure 2-5 c. La présence d'hydroxyproline a confirmé la présence de fibres de collagène, dont le caractère fibreux et l'organisation sont bien visibles sur les images ioniques (Figure 2-5 d). Le spectre extrait de la ROI des acides aminés majoritaires dans le collagène est présenté Figure 2-6 : il correspond bien à la signature de cette protéine, telle que nous l'avons établie dans les chapitres précédents. Aucun signal correspondant à l'épiderme n'a été détecté. Cette couche supérieure a pu disparaître au cours de la manipulation du corps pour la momification d'une part (dessèchement à l'aide de natron, éviscération, embaumement...), mais aussi lors de la réalisation des coupes. L'intensité particulièrement élevée du pic du sodium dans le spectre global de cet échantillon, en mode d'ionisation positive, pourrait s'expliquer par l'utilisation du natron (sulfate et carbonate de soude) pour dessécher le corps. La répartition de l'ion Na_2OH^+ (m/z 62.98), en couche épaisse, à la surface de l'échantillon, semble confirmer cette hypothèse (Figure 2-5 f). Le spectre de la ROI correspondant à cette zone est dominé par les ions sodium et Na_2OH^+ ainsi que par l'ion potassium K^+ . Il contient également des pics correspondant aux espèces $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}^+$ (m/z 45.04), $\text{C}_3\text{H}_5\text{SO}^+$ (m/z 89.01), $\text{C}_3\text{H}_5\text{SO}_2^+$ (m/z 105.00), ce qui est compatible avec l'hypothèse de la présence de natron. On détecte en outre des ions sulfates en mode d'ionisation négatif, dans cette partie de l'échantillon.

En mode d'ionisation négatif, outre les fragments correspondant à la présence de protéines, on détecte les acides gras saturés palmitique et stéarique, l'acide palmitique étant majoritaire. Ce résultat, ajouté à l'absence d'autres lipides (phospholipides et triglycérides) indiquent que les lipides de la peau (et du baume) se sont fortement dégradés.

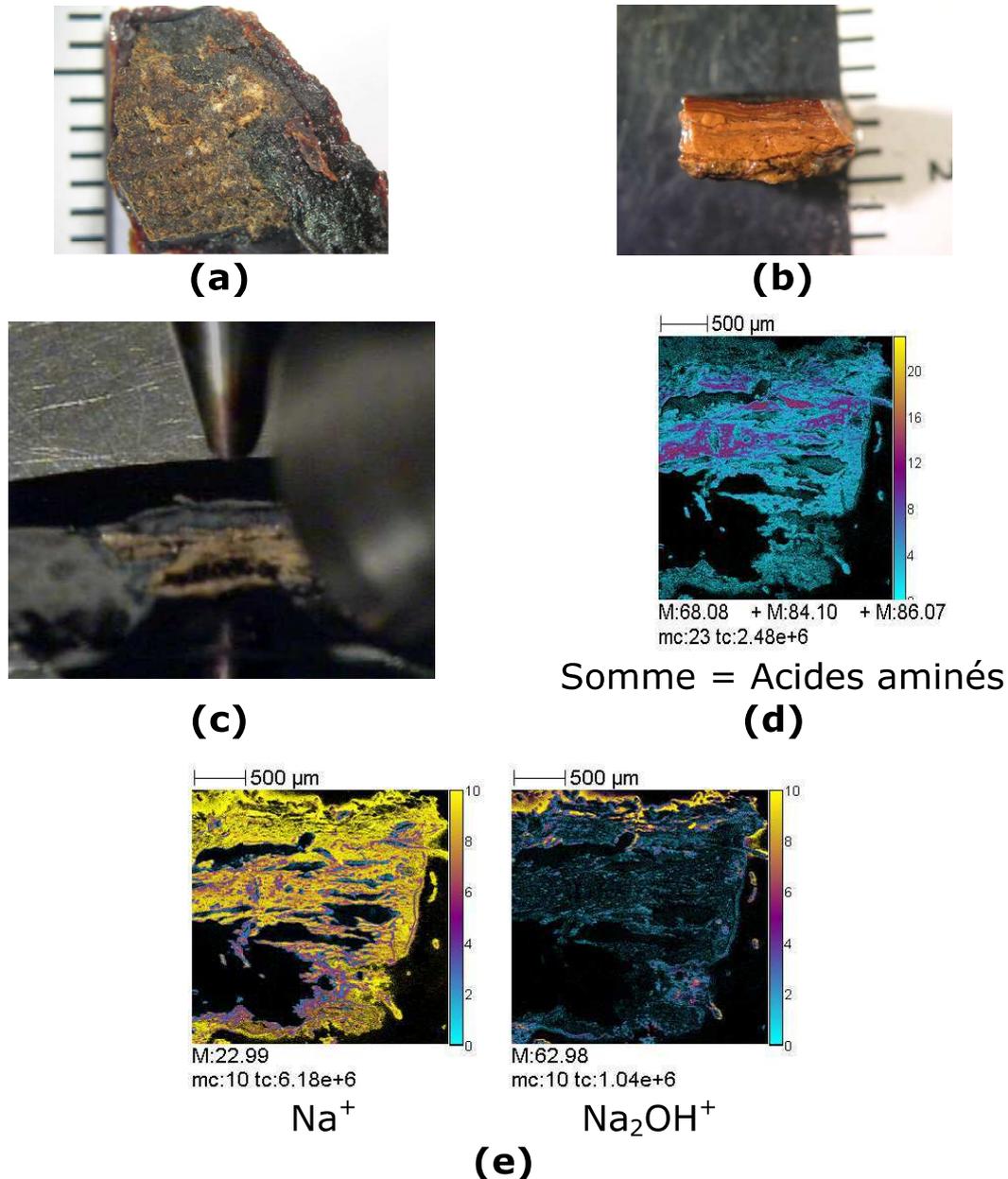


Figure 2-5 : Momie égyptienne du musée d'Athènes (a) Photographie à la loupe binoculaire du prélèvement et (b) de l'échantillon réhydraté. (c) Photo de la coupe étudiée déposée sur wafer, dans la chambre d'ionisation du TOF-SIMS. (d) Image somme des fragments d'acides aminés majoritaires dans le collagène et (e) Images ioniques correspondant au sodium et à l'ion Na_2OH^+ .

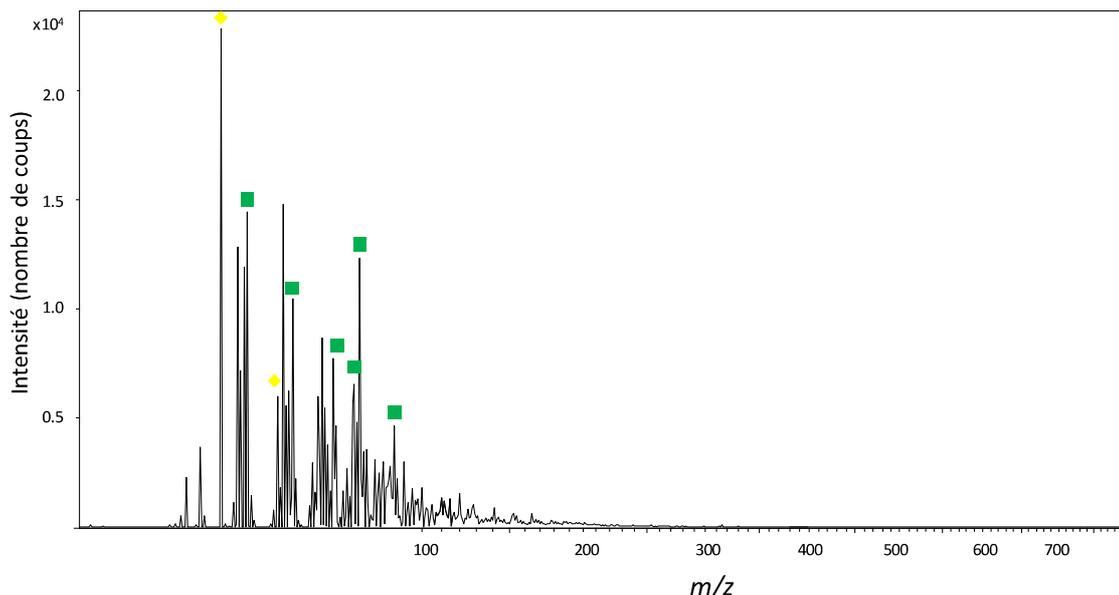


Figure 2-6 : Momie égyptienne du musée d'Athènes. Spectre en mode d'ionisation positif correspondant à la zone protéique. Carrés verts : fragments d'acides aminés. Losanges jaunes : ions sodium et potassium.

2.3.2.2 Momies égyptiennes d'Antinoë

2.3.2.2.1 Contexte de l'étude

Suite au récolement⁷ des collections nationales d'Antinoë (Égypte), un vaste projet d'étude historique, archéologique puis scientifique a été entrepris, à partir de 2010. Une équipe pluridisciplinaire, à laquelle le C2RMF est associé, mène des analyses en imagerie médicale, carbone 14, mesures isotopiques et tribologiques sur 38 individus momifiés, de l'époque romaine (fin du I^{er} siècle av. J.-C. - IV^{ème} ap. J.-C.) ou byzantine (V^{ème} siècle-VII^{ème} siècle ap. J.-C.), et les tissus et végétaux qui leur sont associés. Des fragments de peau, détachés, ont pu être prélevés par Pascale Richardin pour notre étude⁸, en complément des prélèvements de cheveux et végétaux effectués pour les analyses carbone 14 et la quantification des isotopes stables⁹.

2.3.2.2.2 Difficultés de préparations de tissus embaumés

Comme dans le cas des momies égyptiennes, la préparation de la peau des momies embaumées du projet Antinoë, pour l'étude en TOF-SIMS, s'est avérée délicate. La préparation en cryomicrotomie n'a pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants et nous avons privilégié l'inclusion en résine LR-White Medium avec coupe en ultramicrotomie. La réhydratation donnait de meilleurs résultats que la coupe de l'échantillon natif. Des tests comparatifs entre les préparations en résine

⁷ L'opération de récolement d'une collection de musée consiste à vérifier la présence effective et l'état des œuvres d'art qui la constitue ainsi que des documents qui leurs sont associés (archives, catalogues, photographies, dossiers d'étude...).

⁸ Merci à Alain Froment (Laboratoire d'éco-anthropologie et ethnobiologie, Musée de l'Homme, Paris) pour son accord.

⁹ Cette partie de l'étude est effectuée par l'équipe d'Hervé Bocherens (Eberhard Karls Universität, Tübingen, Allemagne).

polyester Sody 33, époxy EMS-Grilonit et acrylique LR-White medium, ont été réalisés sur un échantillon caractéristique. Les blocs obtenus, après ultramicrotomie, présentaient le moins de fractures et la plus grande planéité dans le cas de la résine LR-White medium.

Parmi les sept études menées, nous présenterons seulement le cas de la momie de Dunkerque, dorée et dont la peau semble particulièrement bien conservée.

2.3.2.2.3 Cas de la momie dorée du musée de Dunkerque

La momie conservée au musée de Dunkerque est une momie noire dont le baume est recouvert d'une couche dorée (Figure 2-8 a). Deux prélèvements de peau ont été effectués sur cette momie :

- l'un, non doré, sur le bras gauche (Figure 2-7),
- l'autre, doré, sur le ventre (Figure 2-8).

Un morceau de baume détaché de la surface a également été analysé.

Observations structurales et analyses élémentaires

L'observation du premier échantillon au microscope optique a révélé plusieurs structures, notamment des alvéoles à proximité de la surface (Figure 2-7 c et d). L'examen au MEB a précisé cette première observation. Trois structures particulières sont visibles :

- une série de couches fines superposées, d'une épaisseur totale de 13 μm , d'aspect semblable au *stratum corneum* (Figure 2-7 e),
- des alvéoles d'une dizaine de microns d'épaisseur, plus en profondeur, de formes ovoïdes avec une membrane bien visible, ressemblant à des kératinocytes (Figure 2-7 f),
- des granules de quelques dizaines de microns également dans la couche la plus profonde composée de fibres, ce qui suggère qu'il s'agit d'adipocytes (Figure 2-7 g et h).

Cette première observation indique que la peau de la momie contient encore les trois couches de la peau :

- l'épiderme avec, fait rare, le *stratum corneum* mais aussi des cellules identifiables à des kératinocytes,
- le derme contenant des fibres de collagène,
- l'hypoderme composé d'adipocytes entourés de fibres de collagène.

Le deuxième échantillon contenait une feuille d'or apparente (Figure 2-8 a) et a été orienté pour la coupe en ultramicrotomie afin que la stratigraphie avec la feuille d'or soit visible (Figure 2-8 b).

L'observation en MEB en mode BSE révèle, outre la présence de cette feuille au centre du bloc, l'hétérogénéité de l'échantillon : des trous sur la partie droite de l'image (Figure 2-8 c) indiquent que la résine d'inclusion n'a pas pu pénétrer à ce niveau dans le matériau. Outre l'abondance attendue de matière organique, les cartographies MEB-EDX (Figure 2-8 d) confirment que cette couche contient de l'or. Les grains de silicium et aluminium correspondent vraisemblablement à des dépôts minéraux tandis que la présence abondante de sodium suggère que du natron aurait été utilisé. Potassium et calcium sont présents en quantité moins importante.

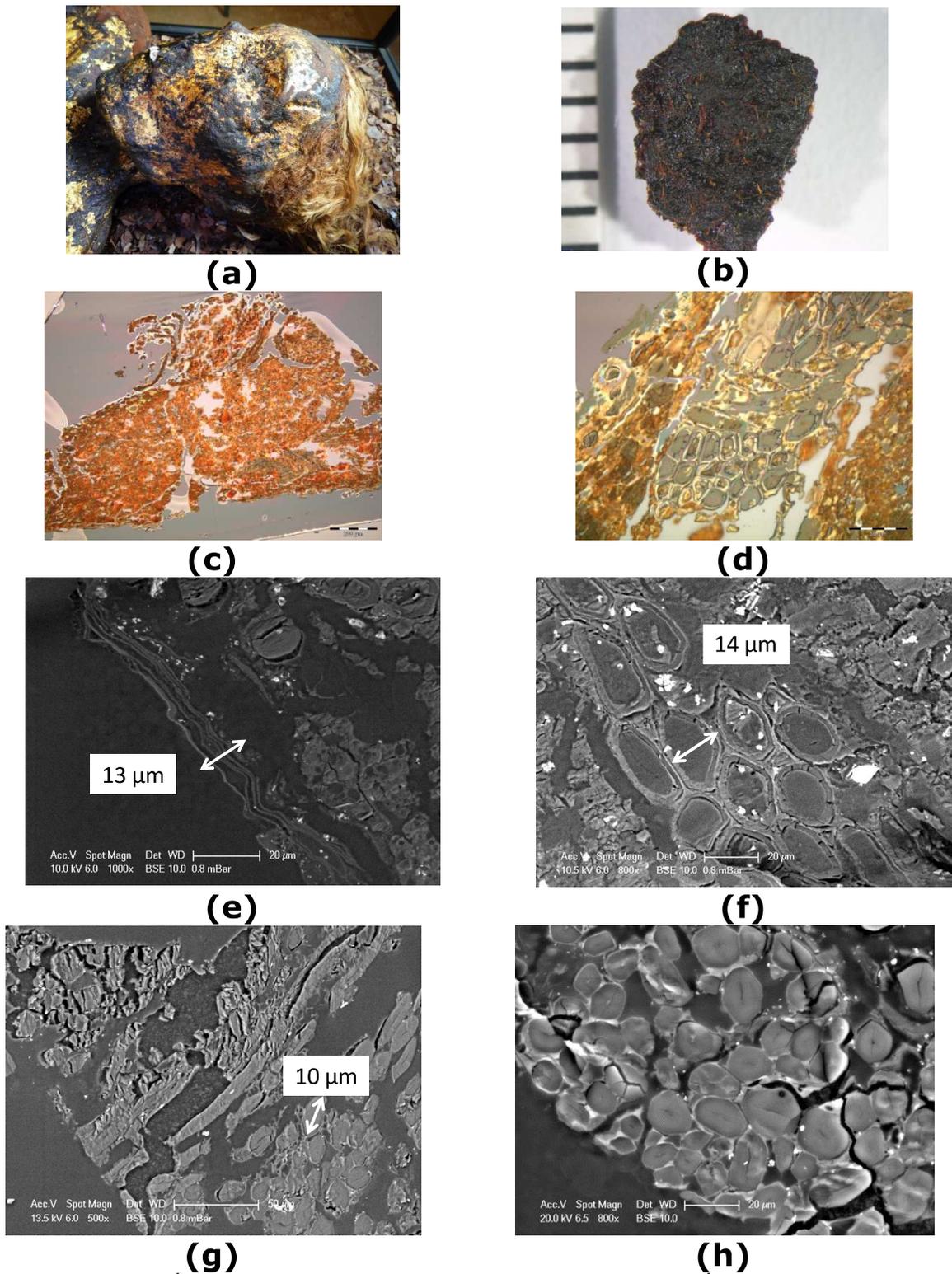


Figure 2-7 : Étude de la momie dorée du musée de Dunkerque. Échantillon non doré (a) Photographie de la tête de la momie © Pascale Richardin. (b) Photographie à la loupe binoculaire de l'échantillon. (c) Photographie au microscope optique d'une coupe et (d) zoom sur les alvéoles. (e-h) Images MEB de la coupe (mode BSE).

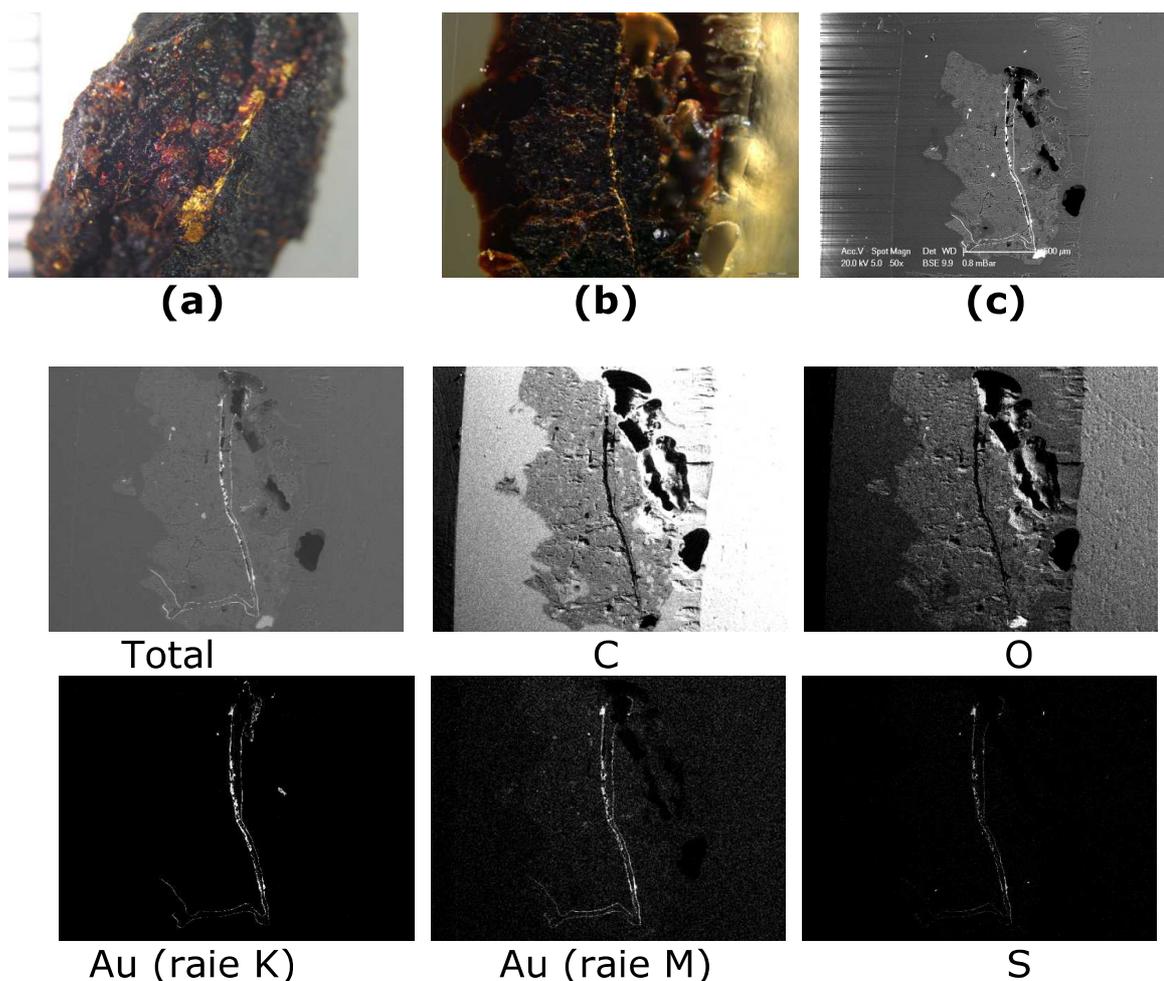


Figure 2-8 : Étude de la momie dorée du musée de Dunkerque. Échantillon doré (a) Photo, à la loupe binoculaire, de l'échantillon doré et (b) surface du bloc préparé en ultramicrotomie. (c) Image MEB de la surface du bloc et (d) cartographies élémentaires associées (mode BSE, pression partielle 0.8 mbar).

Analyses TOF-SIMS

- *Baume de momification*

Dans un premier temps, afin de connaître sa signature spectrale, nous avons analysé le baume de momification de la momie, déposé sur un wafer à l'aide d'un scotch carbone, sans préparation particulière.

Hormis les pics de basse masse correspondant à des hydrocarbures, des fragments lipidiques correspondant à des acides gras libres, palmitique, stéarique et arachidique ou des phospholipides sont présents dans le spectre en mode d'ionisation positif (Figure 2-9 a). Le fragment à m/z 271.37 n'a pas été identifié et pourrait correspondre à une autre substance du baume.

L'analyse en mode d'ionisation négatif permet de préciser la composition lipidique (Figure 2-9 b). On détecte, outre des hydrocarbures, des fragments de polysaccharides (restes de tissus ?), de petits fragments organiques et des ions correspondant à des acides gras saturés déprotonés pairs, de C16:0 à C32:0. L'absence de pic correspondant à des acides gras insaturés peut être due à leur dégradation au cours du temps, ceux-ci étant plus fragiles. Cette composition et la prédominance d'acide palmitique C16:0 par rapport à C18:0 indique que le baume contient une huile végétale. L'analyse de l'échantillon en GC-MS apportera plus de précisions.

2- Imagerie chimique de la peau de momie

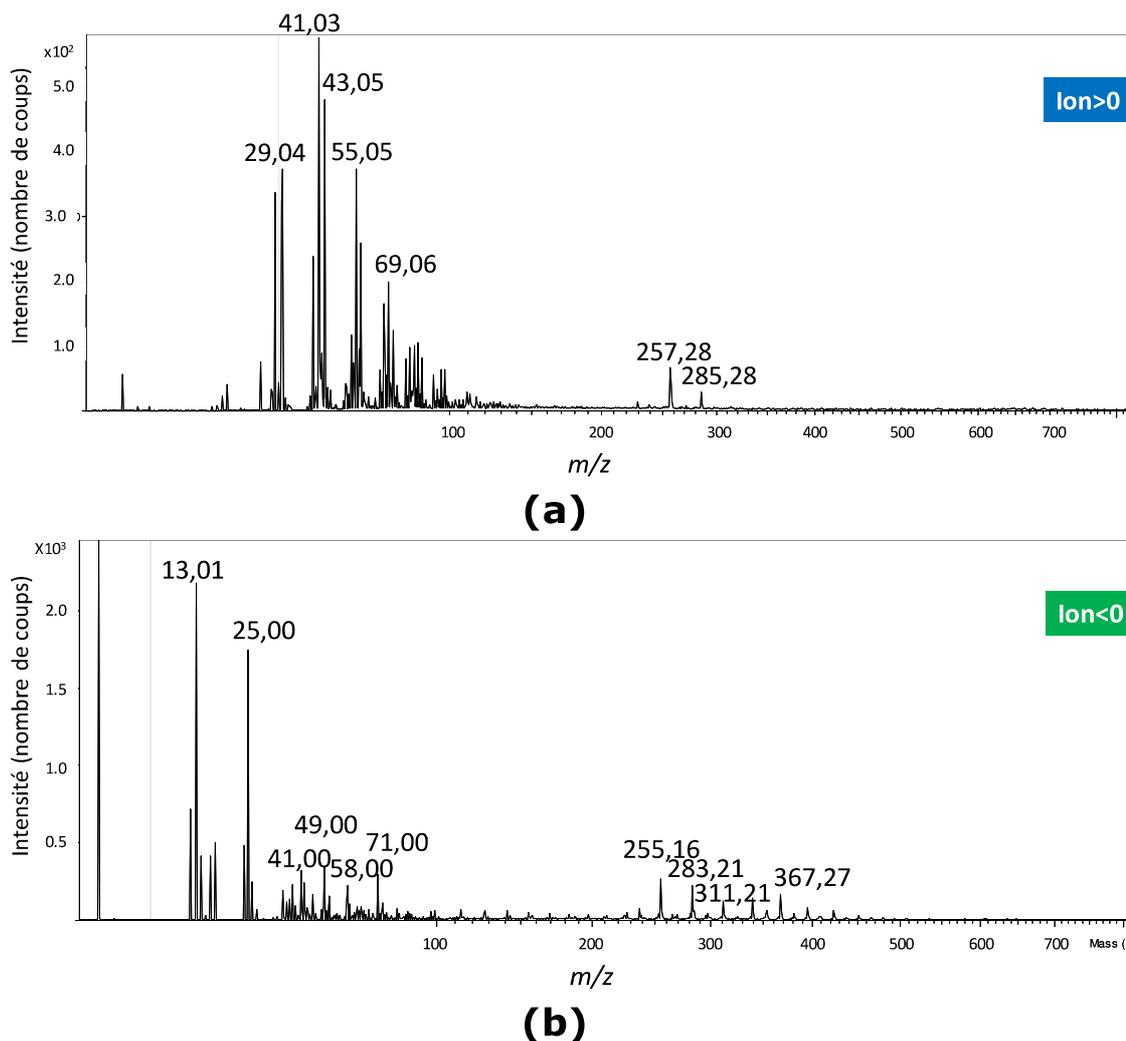


Figure 2-9 : Analyse de la momie dorée de Dunkerque. Spectre du baume de momification en mode d'ionisation positif (a) et négatif.

- *Peau non dorée*

L'analyse TOF-SIMS de la peau non dorée permet de connaître les composés chimiques présents dans les alvéoles identifiées en microscopie.

Les images ioniques correspondant aux fragments d'acides aminés majoritaires dans la kératine et au calcium et ses hydroxydes suggèrent que cette structure correspond bien à des kératinocytes du *stratum granulosum*. Des grains contenant du sodium sont également présents dans cette zone (Figure 2-11).

L'analyse en mode d'ionisation négatif confirme la présence d'une protéine soufrée et un grain de phosphate a été mis en évidence. Il peut s'agir à nouveau d'un fragment issu de la dégradation des phospholipides de l'épiderme (Figure 2-11).

Ainsi nos analyses confirment que l'épiderme de la momie de Dunkerque est conservé, au moins au niveau du bras.

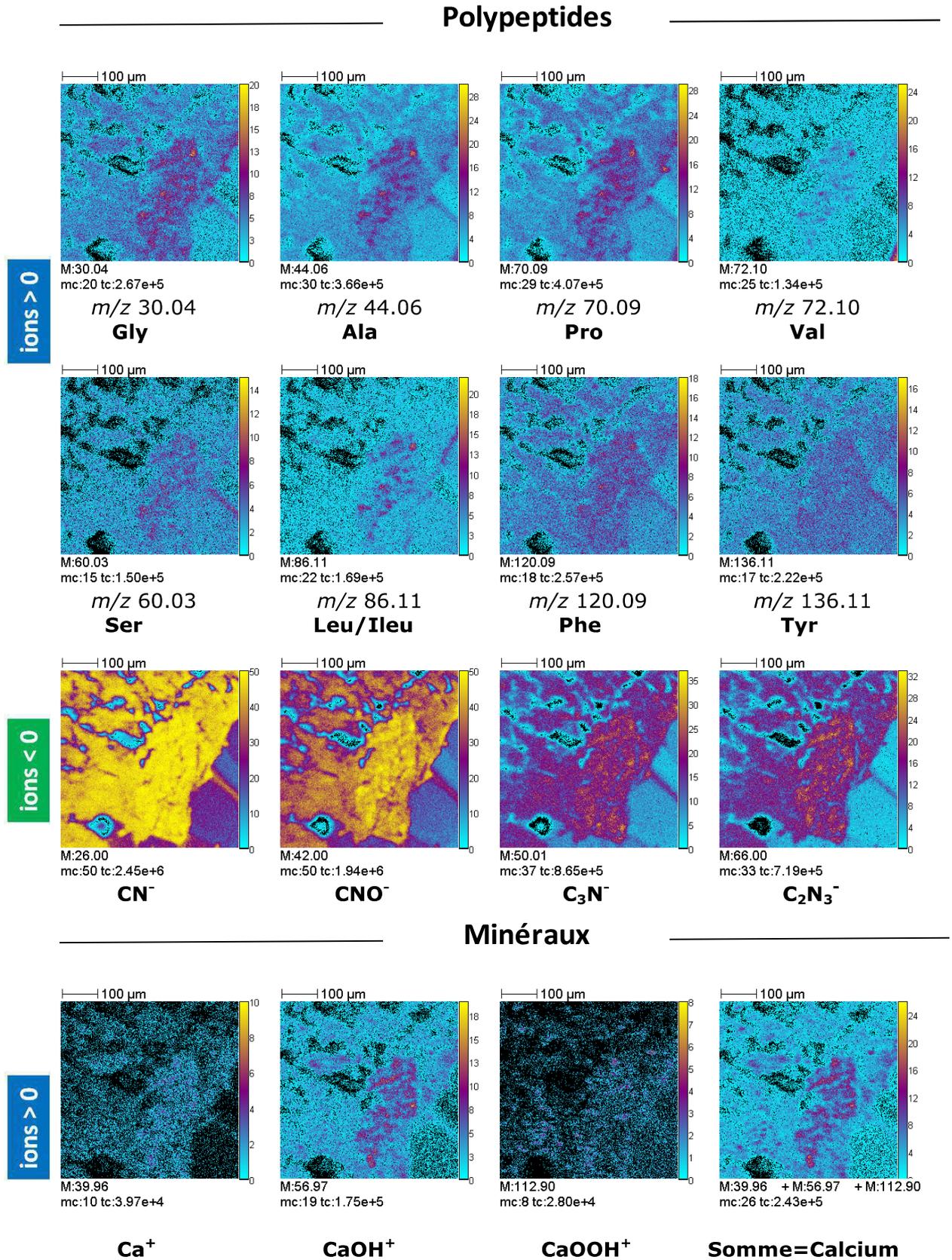


Figure 2-10 : Analyse de la momie de Dunkerque. Images ioniques correspondant aux fragments d'acides aminés, au calcium.

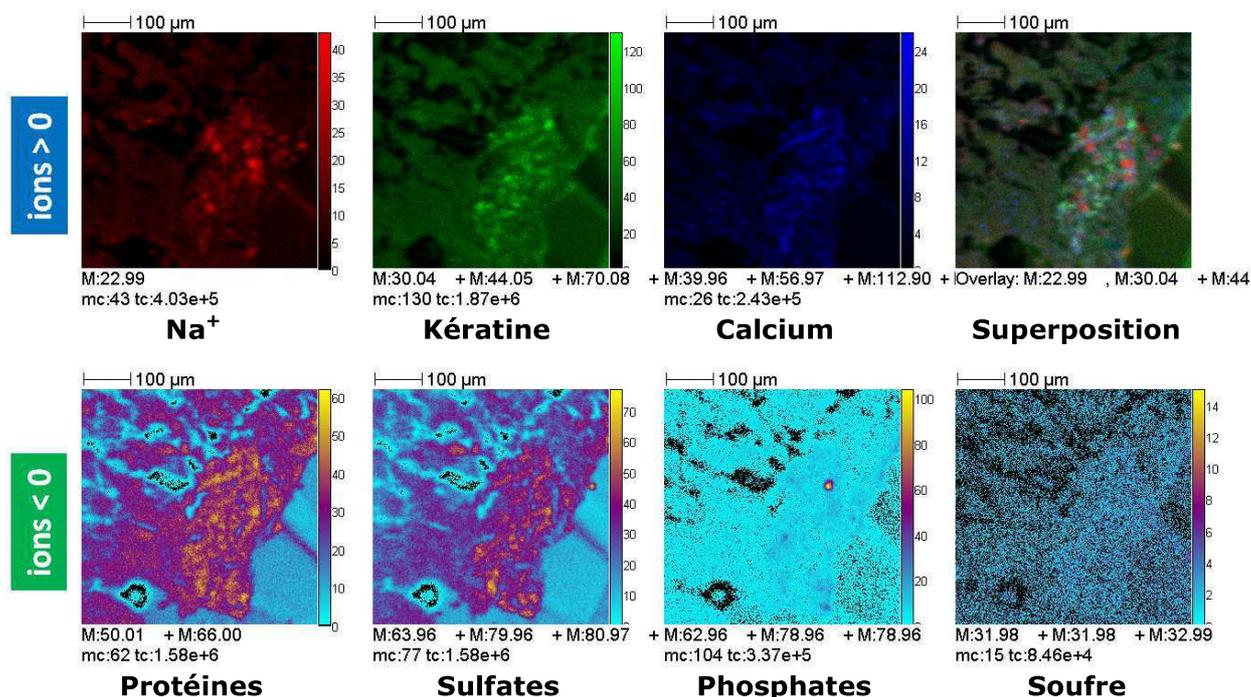


Figure 2-10 (suite) : Analyse de la momie de Dunkerque. Superposition et images ioniques correspondant à des fragments protéiques et aux protéines, sulfates, phosphates et soufre. Images TOF-SIMS : 500 x 500 µm².

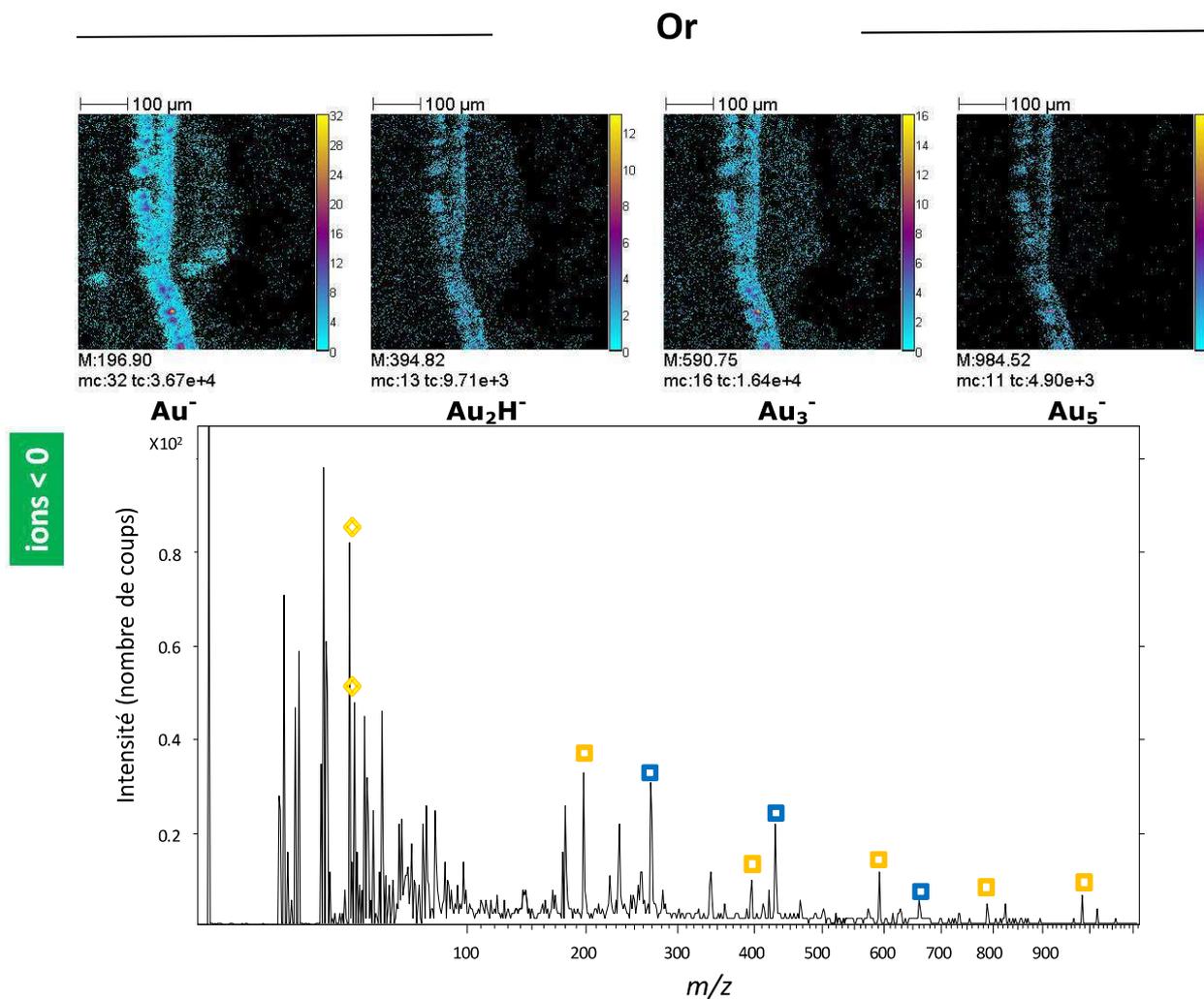
- *Peau dorée*

Le traitement des données TOF-SIMS obtenues sur l'échantillon de peau dorée a été effectué en se basant sur les cartographies effectuées en MEB-EDX. En effet, la couche d'or étant fine, le signal correspondant est peu intense dans le spectre global.

En mode d'ionisation négatif, les différents agrégats de l'or ont pu être identifiés et localisés dans la zone délimitée grâce aux cartes effectuées en MEB-EDX (Figure 2-11). Le spectre extrait de cette ROI présente également des pics de type agrégats or-chlore et chlore-argent (Figure 2-11). La zone est riche en chlore. L'ensemble des pics de ce spectre et leur identification proposée sont présentés dans le Tableau 2-2.

La présence d'argent pourrait suggérer qu'il s'agit d'électrum, alliage d'or et d'argent utilisé par les égyptiens (Venable, 2011) et déjà identifié sur le visage d'une momie artificielle égyptienne (musée des Beaux-Arts de Lyon). La présence d'agrégats chlore-or reste en revanche à expliquer.¹⁰

¹⁰ Notons toutefois que la présence d'halogénure d'or, en mode d'ionisation négatif, a déjà été observée dans de nombreuses expériences en TOF-SIMS (Alain Brunelle, communication privée).



<i>m/z</i>	Attribution
178.84	AgCl ₂ ⁻
196.96	Au ⁻
232.94	
266.89	AuCl ₂ ⁻
394.91	Au ₂ H ⁻
428.86	Au ₂ Cl ⁻
590.84	Au ₃ ⁻
660.84	Au ₃ Cl ₂ ⁻
787.84	Au ₄ ⁻
984.84	Au ₅ ⁻

Tableau 2-2 : Attribution des principaux pics du spectre de la Figure 2-11.

2.3.3 Étude d'une momie andine bien conservée

L'étude, présentée dans ce paragraphe, a fait l'objet d'un article publié dans *Journal of Mass Spectrometry* (Cer soy, 2012).

2.3.3.1 *Présentation et contexte de l'étude*

A l'occasion de la restauration d'une momie andine des anciennes collections anthropologiques du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris, des échantillons de cheveux et de peau ont pu être prélevés¹¹.

La datation radiocarbone des cheveux (Richardin, 2011) a révélé que la momie datait du XI^{ème} ou de la première moitié du XII^{ème} siècle.

La momie se présente assise et nue, avec quelques marques de tissus sur la peau (Figure 2-12). Dans un premier temps, des analyses non destructives en radiographie et au scanner ont permis d'établir qu'il s'agissait d'une femme adulte de plus de 40 ans. En outre, les organes de la cavité thoracique ne sont plus présents.¹² Les recherches historiques ont établi que la momie avait été découverte au nord du Chili, dans la région de Tarapacá et ramenée par bateau au milieu du XIX^{ème} siècle. Elle appartiendrait à la culture Pica-Tarapacá (Carminati, 2010).

Les observations effectuées lors du dévernissage de la momie ont permis de préciser la stratigraphie des couches de surface de la momie. De la plus externe à la plus profonde visible, Pauline Carminati relève :

- un dépôt de terre et de sable en surface,
- une couche fine grise contenant des grains noirs et blancs (silicates et sulfates de calcium d'après les analyses MEB-EDS¹³),
- une couche dure et adhérente, orange et translucide,
- une couche blanche fine,
- une couche fibreuse beige (Carminati, 2010).

On retrouve cette stratigraphie sur l'un des prélèvements que nous avons étudié (Figure 2-13 a). La peau, de couleur claire et d'apparence ridée est identifiable Figure 2-13 b. Les autres prélèvements, de couleur noire ou orangée, contiennent une épaisse couche de résine ou de vernis, comme on le voit sur l'échantillon d'apparence feuilletée Figure 2-13 c et d.

¹¹ La restauration, les recherches historiques, la coordination et la synthèse des études scientifiques ont été réalisées par Pauline Carminati, en vue de l'obtention du diplôme national supérieur d'expression plastique (DNSEP) mention Conservation-restauration des œuvres sculptées de l'École Supérieure des Beaux-Arts de Tours. Les résultats de ses travaux ont donné lieu à la rédaction d'un mémoire (Carminati, 2010) et devraient être publiés prochainement. Avant ce travail, l'origine et la datation de la momie étaient inconnues, les informations d'inventaire ayant été perdues depuis le XIX^{ème} siècle.

¹² Ces recherches ont été menées par Pauline Carminati et les images réalisées au Pôle Santé Léonard de Vinci par Christophe Bou du Laboratoire d'Anthropologie Moléculaire et Imagerie de Synthèse de l'Université Paul Sabatier à Toulouse.

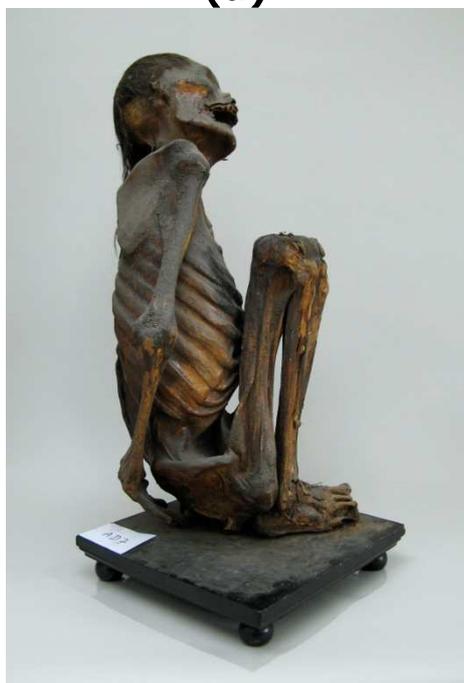
¹³ Les études en MEB-EDS ont été réalisés au Laboratoire d'Expertises chimiques et physico-chimiques du CEA/Le Ripault, sur des prélèvements ne contenant pas l'ensemble des couches (Carminati, 2010).



(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 2-12 : Photographies de la momie andine étudiée. Vue de face (a), de dos (b), profil droit (c) et profil gauche (d). © Pauline Carminati.

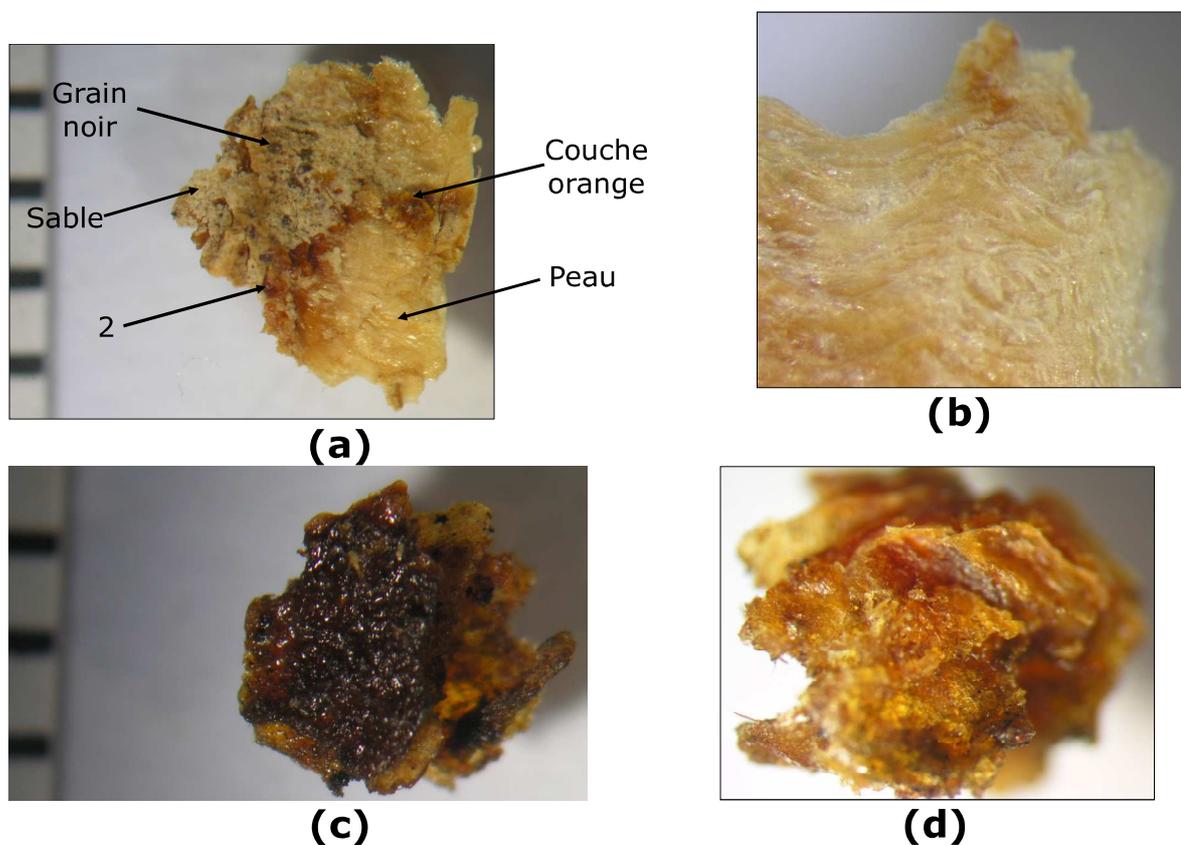


Figure 2-13 : Photographies à la loupe binoculaire des échantillons complexes prélevés sur la momie. (a) Échantillon complexe contenant de la peau apparente et (b) zoom sur la peau. (c) Deuxième échantillon complexe feuilleté recto, prélevé sur le genou, et (d) verso. Les graduations de la mire sont espacées d'1 mm.

2.3.3.2 Caractérisation structurale

Cinq échantillons ont été prélevés sur le corps par Pauline Carminati pour nos études :

- deux sur le dos, de couleur orange avec des inclusions minérales,
- un échantillon de croûte noire,
- deux échantillons complexes avec une couche de peau.

Suites aux observations effectuées sur les différents prélèvements à la loupe binoculaire, deux ont été étudiés en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et un a fait l'objet d'analyses en coupe transversale.

2.3.3.2.1 Analyse des composés organiques en GC-MS

L'analyse des prélèvements en GC-MS a été effectuée par Juliette Langlois (C2RMF) et avait pour but d'identifier la nature des composés présents à la surface de la peau, en particulier la couche brun-noir en croûte qui correspondrait à un vernis appliqué au XIX^{ème} siècle. Il fallait plus particulièrement déterminer si un baume de momification était présent, si la couche blanche pouvait correspondre à de l'adipocire, et quelle était la nature du vernis utilisé pour protéger la momie. En ce qui concerne le baume de momification, les rares sources évoquent l'utilisation, dans le cas des rois incas, de baumes issus d'arbres tropicaux : les baumes du Pérou et de Tolù (Carminati, 2010). Ces exsudats, de couleur brun-rougeâtre, sont encore utilisés aujourd'hui pour accélérer la cicatrisation de la peau. Chimiquement, ils contiennent des monoterpènes (α -pinène, phellandrène, paracymène), des sesquiterpènes (bourbonène, muurolène), des alcools (créosol, guaiacol, peruresinotannol) et des acides carboxyliques associés à leurs esters (acides benzoïques et cinnamiques), et des composés phénoliques (Langenheim, 2003).

Après silylation, les prélèvements ont été analysés en chromatographie en phase gazeuse à haute température couplée à la spectrométrie de masse, à l'aide d'un spectromètre HP 6890 GC System (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA).

Les prélèvements contenaient quatre types de produits (Figure 2-14) :

- des composés di- et tri-terpénoïdes (dérivés de l'acide abiétique correspondant à une résine de pin et dammaranes), correspondant probablement au vernis,
- des acides gras impairs (acide margarique C17:0) et des stérols indiquant la présence de graisse animale, probablement issue de la peau de la momie (Tchaplak, 2004),
- des acides gras pairs, majoritaires, en particulier l'acide palmitique C16:0 et un acide insaturé, l'acide linoléique C18:2 ainsi que des diacides dont l'acide azélaïque (DIC 9) issu de la dégradation de l'acide oléique,
- des phtalates dont la présence est due au transport des prélèvements dans des tubes en plastique.

Cette analyse suggère qu'un vernis de type dammar ou mastic a été déposé sur la peau, dont les lipides seraient fortement dégradés. La présence en quantité importante d'acide palmitique suggère une dégradation de type adipocire (Langlois, 2010). L'origine des composés diterpéniques reste à préciser.

2.3.3.2.2 Composés minéraux et stratigraphie

L'échantillon complexe présenté Figure 2-13 c et d, qui semblait contenir l'ensemble des couches répertoriées, a été inclus dans une résine polyester, de dureté comparable à la sienne. L'échantillon a ensuite été préparé en ultramicrotomie selon la procédure habituelle. Outre l'analyse ToF-SIMS, détaillée au paragraphe suivant, le bloc a été analysé en MEB-EDX.

Plus distinctement que sur l'image optique (Figure 2-15 a), les images MEB, réalisées en mode BSE, sous pression partielle de 0.8 mbar, permettent de distinguer trois couches principales dans la coupe obtenue (Figure 2-15 b) :

- une couche profonde essentiellement fibreuse (délimitée en rouge),
- une couche intermédiaire plus compacte (délimitée en vert),
- une couche superficielle constituée de nombreux grains, de tailles diverses (délimitée en noir).

Un zoom sur la zone de transition permet de confirmer la nature différente des deux couches (Figure 2-15 c). De plus, de nombreux trous de petites tailles apparaissent dans la couche supérieure : ils pourraient correspondre à une attaque d'insectes kératophages. Les fibres de collagène sont également visibles plus en profondeur (Figure 2-15d). On voit également sur cette figure, une structure moins ordonnée, qui peut correspondre à un lobule graisseux, ainsi que 2 trous, qui indiquent que la résine n'a pas pénétré partout.

L'analyse EDX a révélé que les deux couches profondes contenaient essentiellement les éléments carbone et oxygène et correspondaient donc à des couches organiques (Figure 2-15 e), vraisemblablement la peau. On détecte également les éléments soufre, calcium et potassium entre certaines fibres (Figure 2-15 f) qui peuvent correspondre à des sulfates de calcium et potassium issus du milieu et qui auraient pénétré dans la peau. La couche la plus externe, qui apparaît plus claire en mode BSE (éléments de numéro atomique plus important que C et O) contient des grains dans lesquels ont été détectés pour certains de l'aluminium et du silicium (Figure 2-15 h), et pour d'autres du soufre et du calcium (Figure 2-15 g). L'environnement de conservation (originel ou postérieur) contenait donc vraisemblablement des aluminosilicates et du sulfate de calcium (gypse ?). Ces derniers résultats sont en accord avec les analyses et les conclusions de Pauline Carminati (Carminati, 2010). Les cartes élémentaires de la Figure 2-15 i permettent de visualiser la composition générale de l'échantillon.

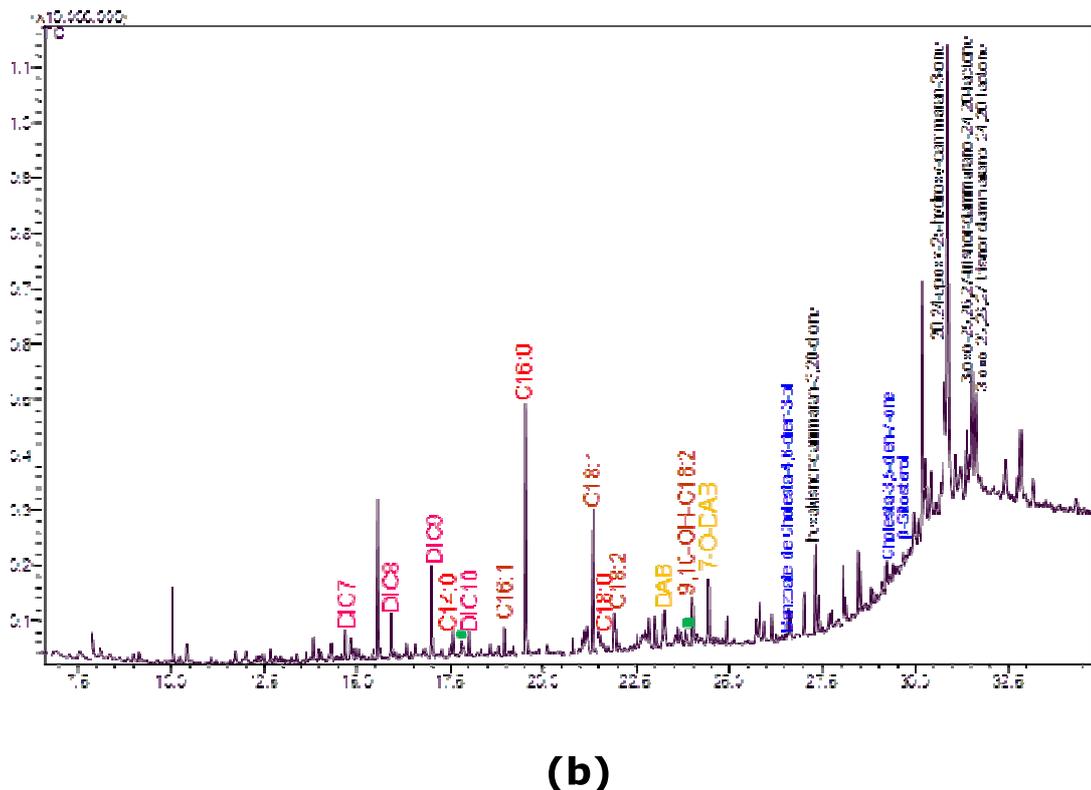
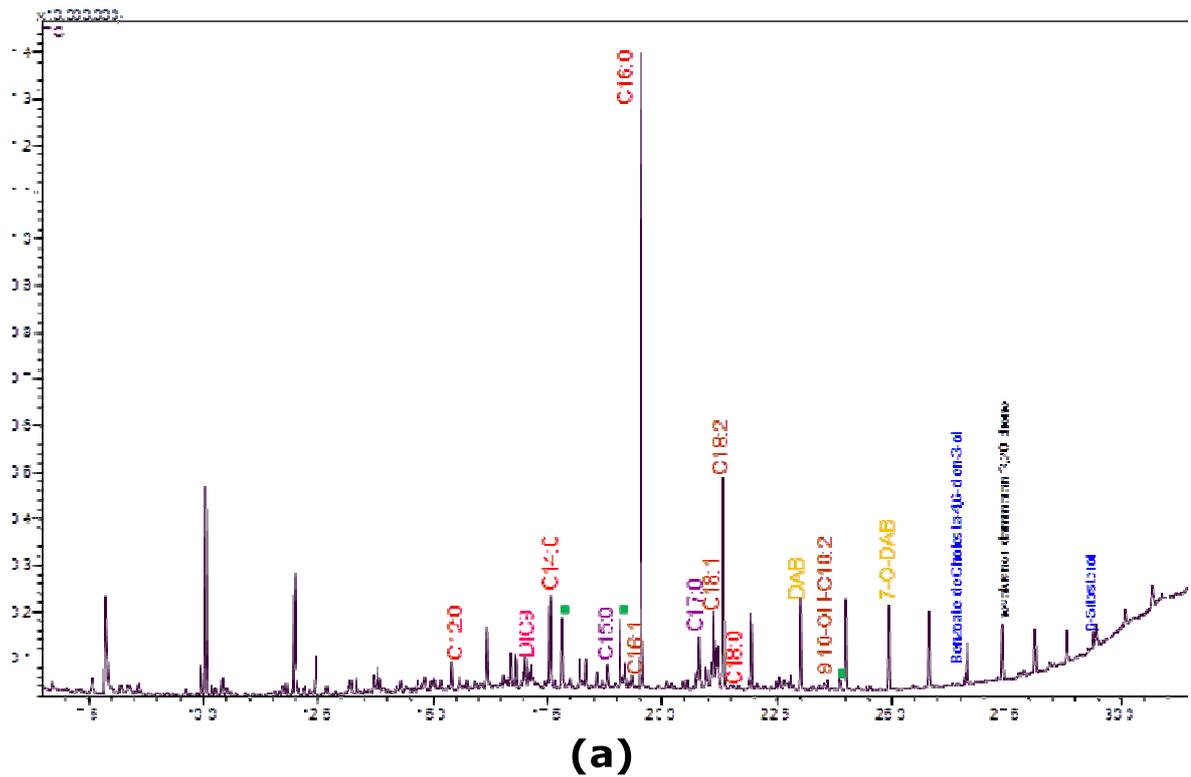


Figure 2-14 : Analyse en GC-MS. (a) Chromatogramme d'un grain prélevé sur la couche blanche et (b) sur la couche de résine. **Rouge:** acides gras pairs. **Violet :** acides gras impairs. **Rose:** diacides (DIC). **Jaune:** acide déhydroabiétique et acide 7-oxo-déhydroabiétique. **Bleu :** stérols animaux et noir : composé triterpénique de structure dammarane. Les points verts ● indiquent les pics de pollution des phtalates.

2- Imagerie chimique de la peau de momie

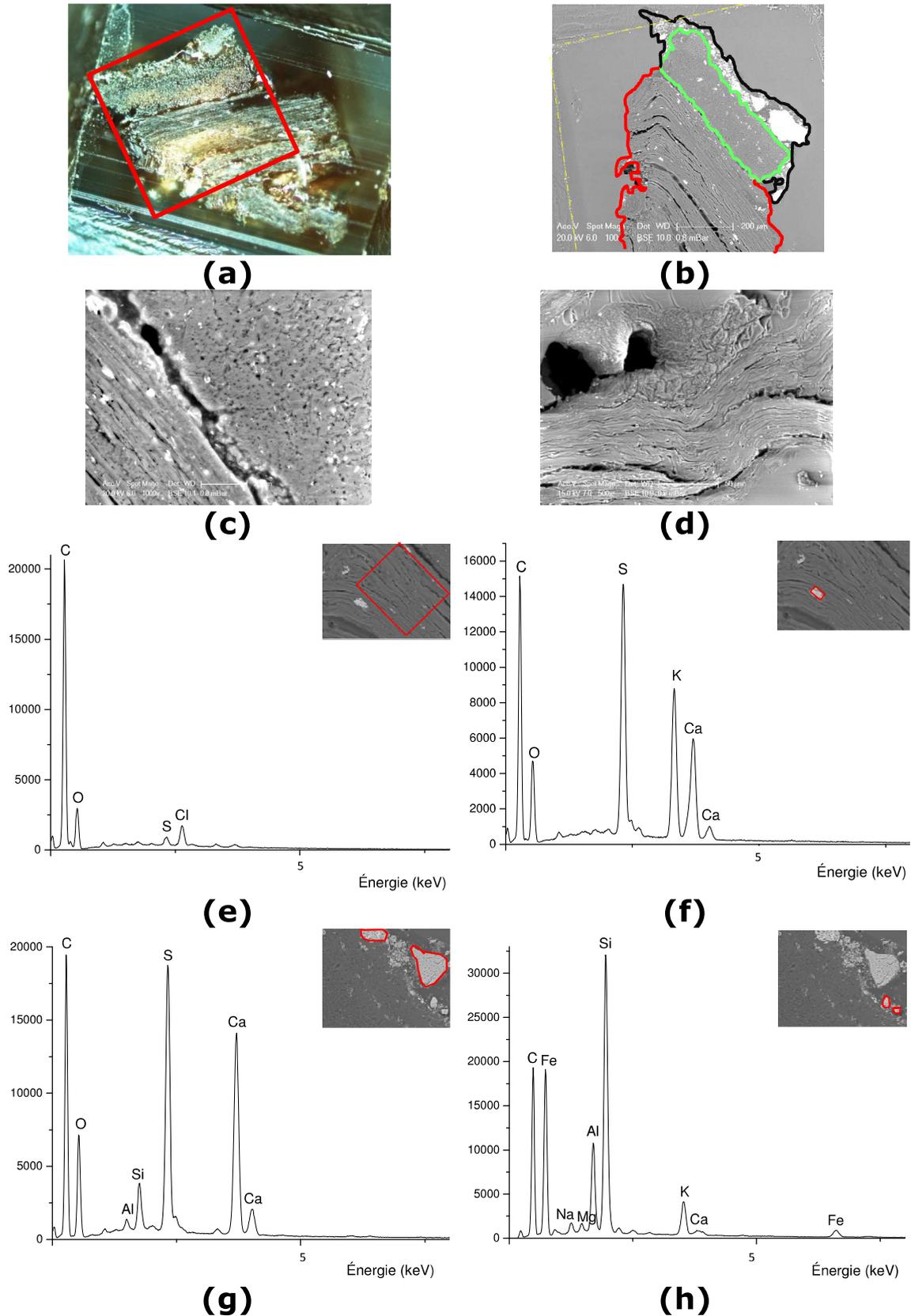


Figure 2-15 : Stratigraphie et minéraux. (a) Image optique avec carré rouge indiquant la zone analysée en TOF-SIMS, (b-d) Images MEB (BSE) du bloc (a) avec délimitation des couches. Rouge : couche fibreuse, vert : couche compacte médiane, et noir : couche superficielle. Les bords du bloc sont indiqués en pointillés jaunes. (c) Zoom sur la zone de transition et (d) sur les fibres profondes. (e-h) Spectres MEB-EDX et localisation correspondante sur les images électroniques (contour rouge).

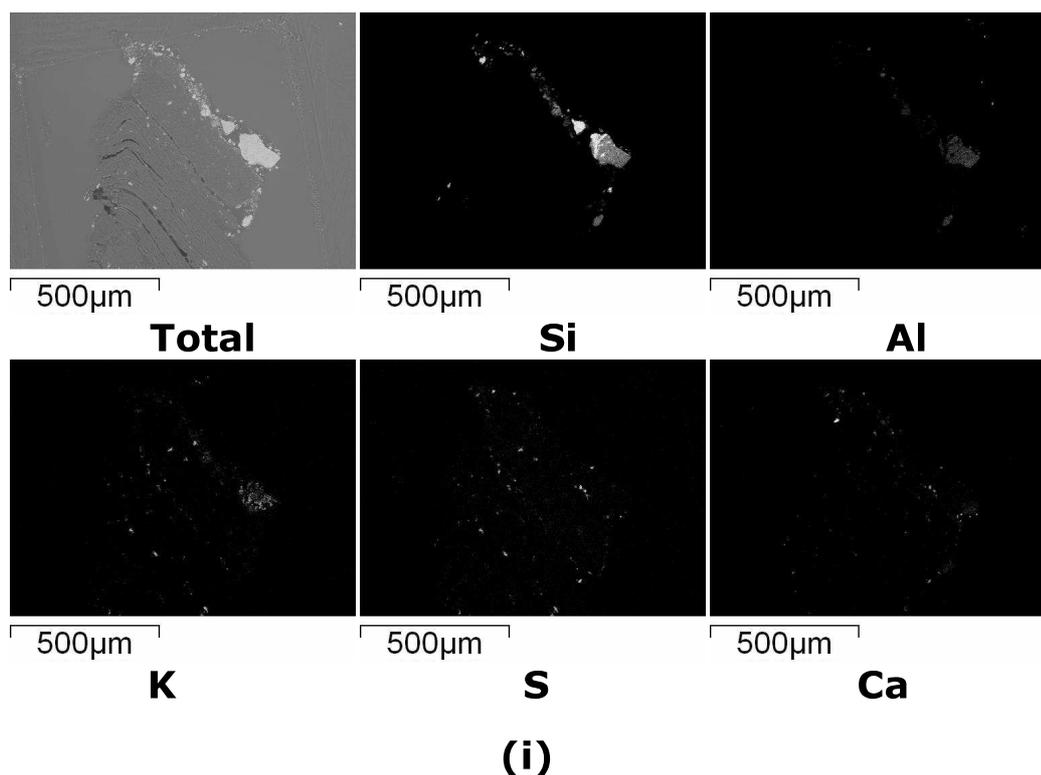


Figure 2-15 (suite) : (i) Cartes élémentaires MEB-EDX des principaux éléments présents dans la coupe transverse de peau de momie andine.

Les analyses et recherches de Pauline Carminati et nos premières analyses structurales indiquent que la momification est probablement intentionnelle (du fait de l'éviscération) mais a été rendue possible par l'environnement de la tombe (sécheresse et présence d'éléments dessiccateurs comme le sable et le sel). L'utilisation d'un baume semble exclue. La momie a résisté au voyage en bateau depuis l'Amérique du Sud mais les tissus ont pu souffrir de ce voyage : l'humidité de cet environnement pourrait expliquer la dégradation des graisses (et peut-être la formation d'adipocire). Par la suite, lors du séjour de la momie au Muséum, celle-ci semble avoir été victime de l'attaque d'insectes kératophages. Elle aurait alors été enduite de vernis de type mastic ou dammar sur le corps et peut-être d'un vernis ambré au niveau des cheveux, infestés d'anhrènes. Des fibres bien conservées sont encore visibles en profondeur de la peau sous une couche de nature différente recouverte de minéraux.

Le but de l'analyse TOF-SIMS était de pouvoir, suite à ces observations, préciser les hypothèses énoncées ci-dessus, ainsi que l'état de dégradation des lipides et caractériser l'état des protéines de la peau.

2.3.3.3 Analyse TOF-SIMS en basse résolution spatiale

Une fois la contribution de la résine ôtée, les spectres TOF-SIMS sont dominés par quelques pics de faible rapport m/z , difficiles à affecter, dont les images ioniques sont uniformes sur l'ensemble de la surface de l'échantillon.

Outre ces pics, on détecte, en mode d'ionisation positif des pics correspondant aux fragments d'acides aminés ainsi qu'à des ions minéraux, et en mode d'ionisation négatif des fragments lipidiques.

2.3.3.3.1 Protéines

Les images ioniques correspondant aux fragments d'acides aminés majoritaires sont présentées Figure 2-16. On remarque que certains acides aminés sont présents en quantité plus importante dans la couche supérieure et d'autres dans la couche inférieure.

La localisation particulière du fragment m/z 86.06 correspondant à l'hydroxyproline permet de délimiter le derme et l'hypoderme, zones riches en collagène. Dans cette zone, la glycine et l'acide glutamique sont présents en quantité plus importante que dans la zone supérieure. Cette dernière contient une quantité plus importante de valine, leucine et tyrosine. Ces différences de proportions en acides aminés dans les deux protéines et les contrastes qui en résultent dans les images ioniques permettent d'identifier une première stratigraphie de l'échantillon. Celle-ci apparaît Figure 2-16.

2.3.3.3.2 Lipides

En mode d'ionisation négatif, le spectre est dominé par les fragments protéiques et les ions phosphates et sulfates mais l'on remarque aussi la présence de pics correspondant à des acides gras C16:0 et C18:1. Une zone située en profondeur dans l'échantillon contient ces acides gras en abondance (Figure 2-17 a), ce qui permet de l'identifier comme l'hypoderme. Le spectre extrait de la ROI correspondant à cette zone est présenté Figure 2-17 b et comparé à celui extrait de l'hypoderme de la peau humaine dont l'étude a été présentée au paragraphe 1.2.

On remarque une inversion de proportion entre les acides palmitique et oléique. Comme expliqué au chapitre 1, l'hypoderme de la peau humaine contient à parts presque égales de l'acide palmitique et de l'acide oléique. Dans le cas de la momie, on remarque l'abondance de l'acide palmitique et la présence de produits d'oxydation de l'acide oléique : les acides hydroxy- et oxo-stéariques (OH-C18:0, m/z 297.28 et Oxo-C18:0, m/z 295.26). Un pic faible à m/z 269.25 pourrait correspondre à l'acide hydroxypalmitique, autre produit d'oxydation des lipides. Ces résultats, associés à l'absence de triglycérides aux rapports m/z plus élevés, correspondent aux descriptions faites par Takatori des premières étapes de formation d'adipocire (Takatori, 2001).

L'absence de cholestérol à la surface de la couche identifiée comme l'épiderme pourrait indiquer soit que le *stratum corneum* n'est plus présent soit que le cholestérol s'est dégradé au cours du temps.

2.3.3.3.3 Dépôts minéraux

Outres les molécules biologiques issues de la peau, on détecte des ions minéraux, résultant de dépôts dans le milieu de sépulture et/ou de conservation du corps.

On détecte ainsi la présence de sulfates et d'aluminosilicates ainsi que de phosphates partiellement colocalisés avec du calcium (Figure 2-18 a). Des pics faibles de phosphates de calcium sont détectés dans les zones où les deux espèces sont colocalisées. Ce composé a déjà été détecté dans l'épiderme de momies chinoises et égyptiennes, par analyses IR (Cotte, 2005). La présence de calcium peut aussi s'expliquer par un dépôt de gypse. Ces résultats sont en accord, à la fois avec ceux obtenus par Pauline Carminati en MEB-EDX sur un échantillon prélevé à la surface du pied, et par nos propres analyses élémentaires en MEB-EDX sur le bloc (voir cartes Figure 2-15 i).

Les phosphates présents dans l'épiderme lui-même pourraient résulter de la dégradation des phospholipides des membranes cellulaires de cette couche. Ces pics pourraient aussi traduire la présence d'ADN mais, dans le cas de cet échantillon, les pics correspondant aux bases déprotonées de cette macromolécule (Hashimoto,

2004), n'ont pas été détectés. Le calcium est quant à lui naturellement présent dans l'épiderme, en particulier dans le *stratum granulosum*, où il joue un rôle important dans la différenciation des kératinocytes et la formation de la barrière hydrolipidique. Il a été détecté également dans l'épiderme.

2.3.3.4 Apport de la haute résolution spatiale

Une analyse en haute résolution spatiale a été menée sur la zone de transition derme/épiderme et sur l'hypoderme. Deux superpositions d'images ioniques sont présentées (Figure 2-18 b). Elles permettent de visualiser les fibres de collagène du derme, le dépôt du calcium sur l'épiderme, mais aussi la présence de cette espèce dans une couche plus profonde (*stratum granulosum* ?). On remarque en outre la disparition de la jonction dermo-épidermique et des crêtes qui lui sont normalement associées dans la peau moderne. La seconde image montre les fibres de collagène encore ordonnées et un lobule graisseux. Ainsi, si la stratigraphie générale de l'échantillon et les principales couches semblent conservées, aucune cellule n'est visible et l'architecture de transition entre couche est relâchée, probablement du fait de la dessiccation.

Polypeptides

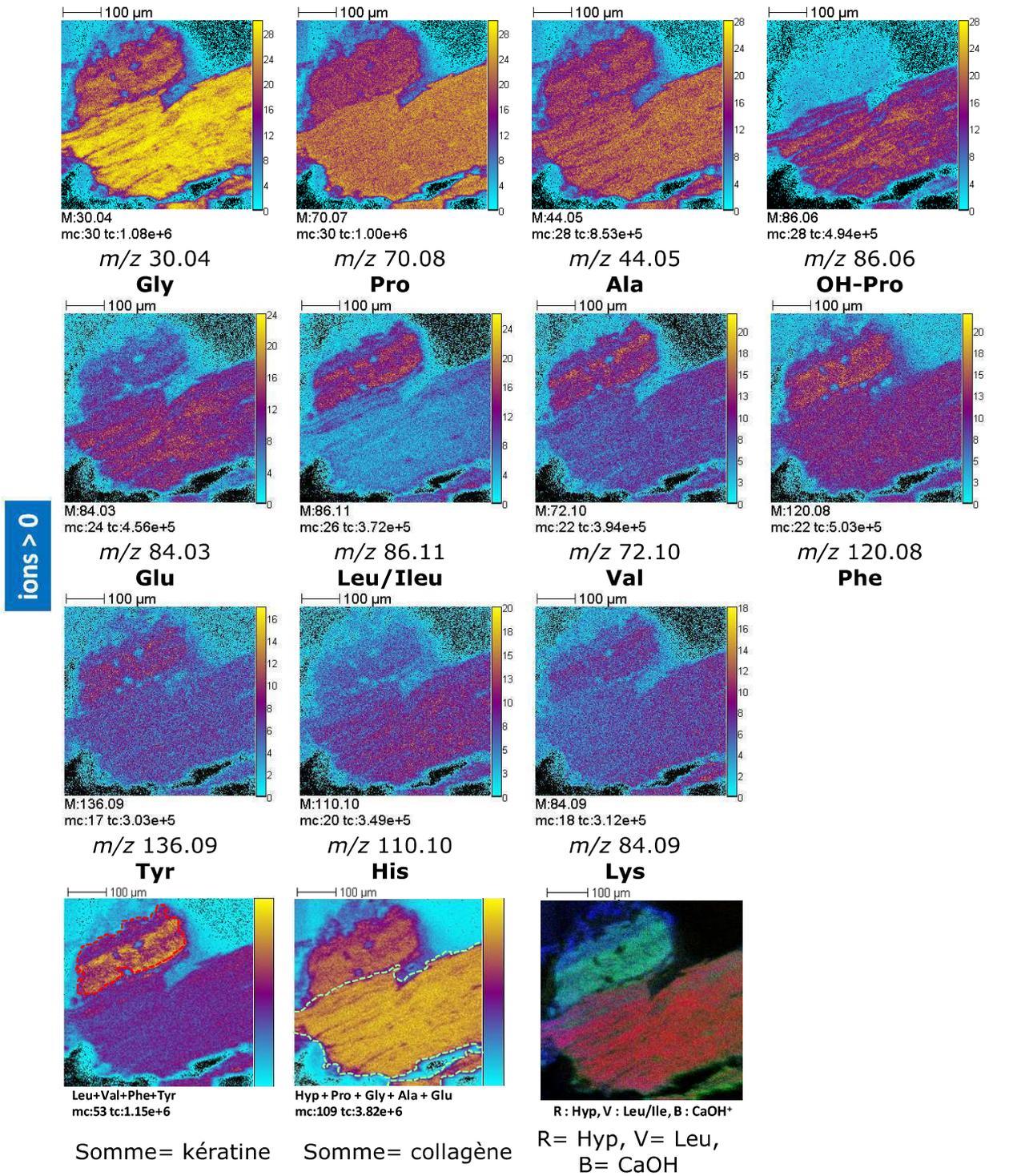
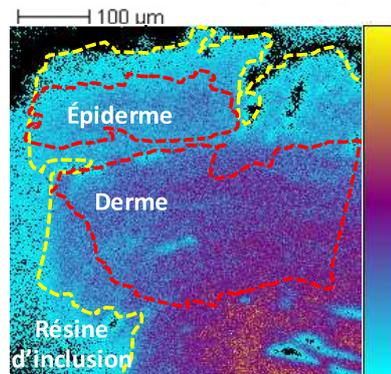


Figure 2-16 : Analyse TOF-SIMS de la peau de momie andine. Images ioniques des fragments des principaux acides aminés de la peau (mode d'ionisation positif). Images sommes correspondant à la kératine et au collagène et superposition des images sommes du collagène (en rouge), de la kératine (en vert) et du calcium (en bleu). Taille des images : 500x500 µm².

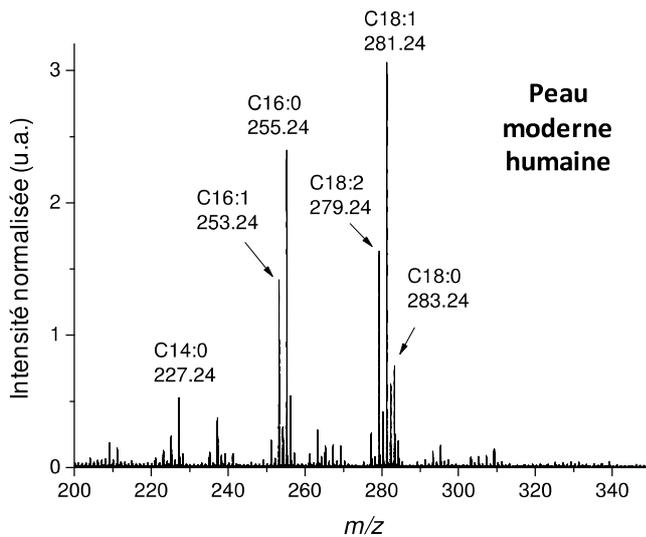
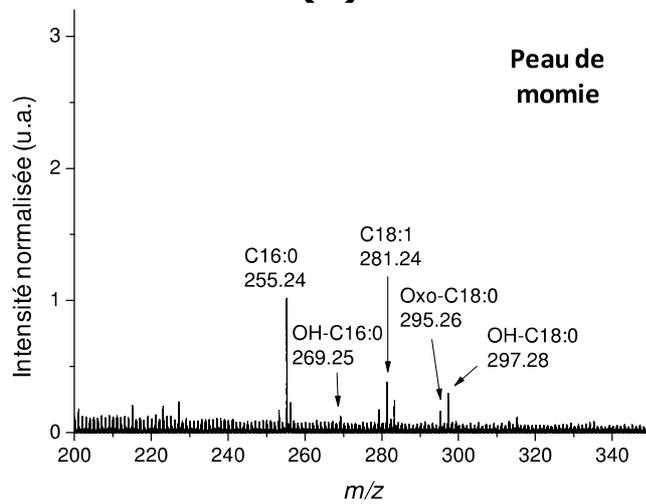
ions < 0

Lipides



Somme = C16:0 et C18:1

(a)



(b)

Figure 2-17: Analyse TOF-SIMS de la peau de momie andine. (a) Image somme des acides gras (mode d'ionisation négatif) et (b) spectre extrait de la ROI correspondant comparé à celui extrait de la même zone dans la peau moderne humaine. Taille des images : 500x500 μm².

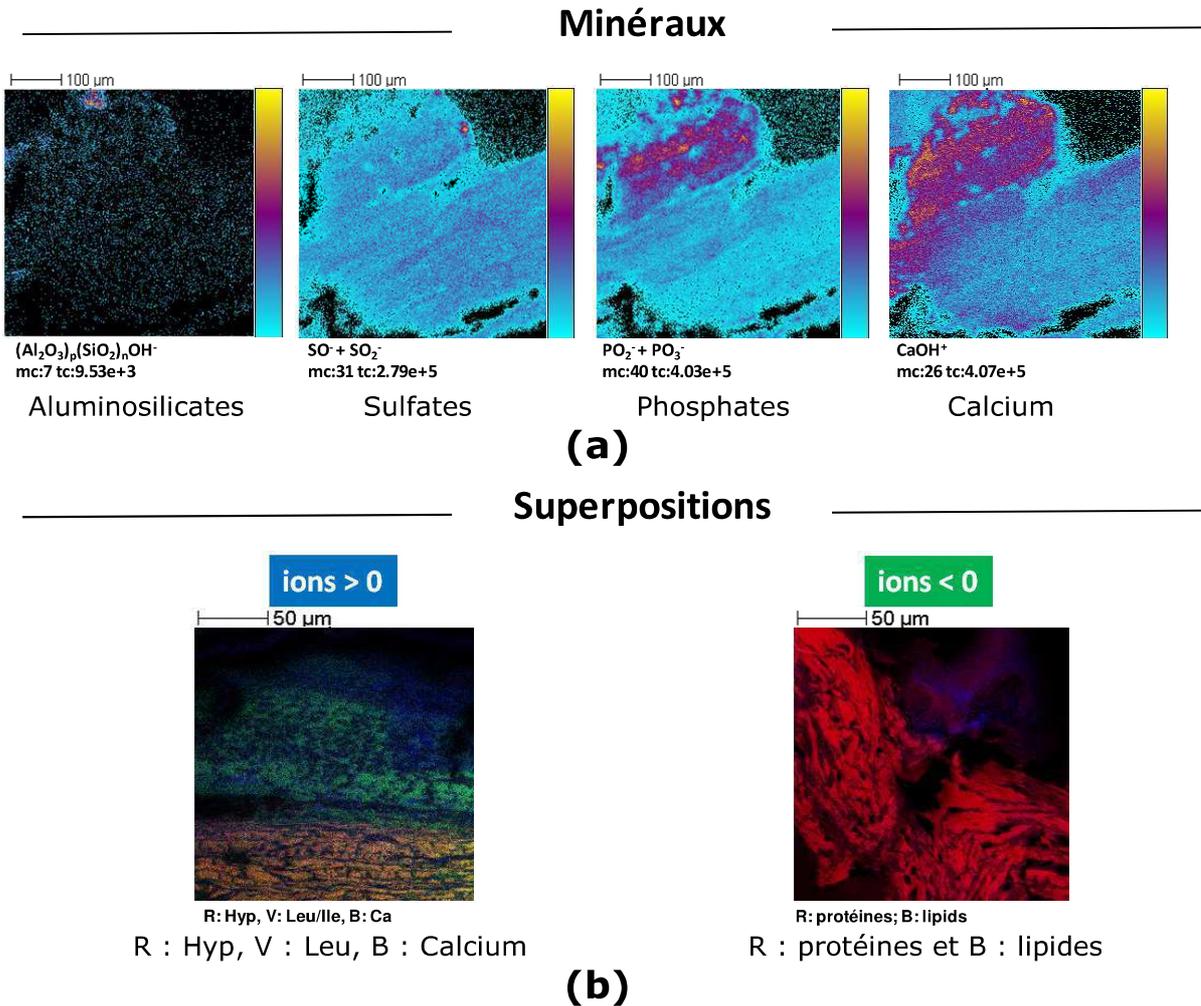


Figure 2-18 : Analyse TOF-SIMS de la peau de momie andine. (a) Images ioniques correspondant aux minéraux (modes d'ionisation positif et négatif). Taille des images : $500 \times 500 \mu m^2$. (b) Superposition d'images ioniques et somme en haute résolution spatiale : à gauche hydroxyproline (en rouge), leucine (en vert) et calcium (en bleu) en mode positif, et à droite : protéines en rouge et lipides en bleu (mode négatif). Taille des images : $200 \times 200 \mu m^2$. Résolution : 390 nm.

2.3.4 Dégradation moderne de la peau d'une momie Chinchorro

2.3.4.1 Contexte

Les Chinchorros momifiaient leurs morts d'une façon très particulière, qui peut paraître surprenante pour une civilisation si ancienne, de chasseurs-cueilleurs et de pêcheurs. La momification artificielle semblait concerner tous les individus sans distinction de classe sociale, de sexe ou d'âge (Aufderheide, 2003). De plus, cette civilisation a pratiqué la momification intentionnelle pendant plus de 3000 ans (Arriaza, 1996).

Deux types principaux de préparation du corps ont été recensées et décrites : les momies noires et les momies rouges. Cette classification correspond à la typologie récente, revue depuis les premières études de Max Uhle en 1917.

Dans le cas des momies noires (4000-2800 av. J.-C.), les étapes de la préparation sont :

- le retrait des organes et de la peau,
- le nettoyage des os, le démembrement et le renforcement du squelette avec des brindilles,
- le revêtement avec de la boue puis avec la peau (de l'individu ou d'un animal comme le lion de mer),
- la reconnexion de la tête, l'ajout d'une perruque noire et d'un masque facial noir, à base d'oxyde de manganèse.

Dans le cas des momies rouges (2000-1500 av. J.-C.), la préparation est plus simple :

- retrait des tissus musculaires et des organes,
- dessèchement des cavités et remplissage par de la terre, des plumes et de la boue (cerveau compris),
- renforcement du squelette comme dans le cas des momies noires,
- application d'un masque facial où les yeux, le nez et la bouche sont redessinés et ajout d'une perruque de cheveux noirs, maintenue par une couche d'oxyde de manganèse,
- couture des incisions et revêtement du corps d'une peinture rouge à base d'oxyde de fer.

Une variante de ce type de momie existe : il s'agit des momies bandelettées, semblables aux momies rouges mais dont la peau a été remplacée en bandelettes et non d'une seule pièce (Arriaza, 2008).

L'échantillon étudié provient d'une momie en mauvais état de conservation et dont la peau se détériore à l'intérieur du musée archéologique San Miguel de Azapa. Il s'agit de la momie rouge d'une femme adulte dont le corps a été découvert en 1985 sur le site archéologique d'El Morro, situé sur un rocher surplombant la ville d'Arica (Morro 1B). Les photographies de la momie (Figure 2-19 a et b) montrent que le corps est en train de se transformer en squelette (le processus est presque complet sur la partie basse des jambes et les pieds ont disparu). L'enduit de surface a disparu à de nombreux endroits laissant les brindilles de remplissage et certains os apparents. L'apparence rouge de la momie, liée à son type de préparation, demeure cependant.

2.3.4.2 Problématique et difficultés de préparation

Le but de l'étude était de déterminer la nature de la substance marron semblant correspondre à une dégradation. En particulier, il s'agissait de connaître la nature, protéique ou lipidique de cette couche et de caractériser les produits de dégradation.

L'inclusion a été effectuée en résine LR-White. Plusieurs imprégnations ont été réalisées afin d'assurer une consolidation lente et progressive par la résine. Le bloc cylindrique obtenu a été réinclus dans la résine polyester Sody 33 afin de permettre une orientation plus facile de l'échantillon dans le bloc à couper et l'adéquation de la taille du bloc avec le porte-échantillon du TOF-SIMS. La compatibilité des deux résines avait été préalablement vérifiée.

La coupe en ultramicrotomie s'est avérée délicate du fait de la présence de gros grains minéraux, susceptibles d'endommager le couteau diamant. C'est pourquoi la taille de la coupe a été réduite au maximum.

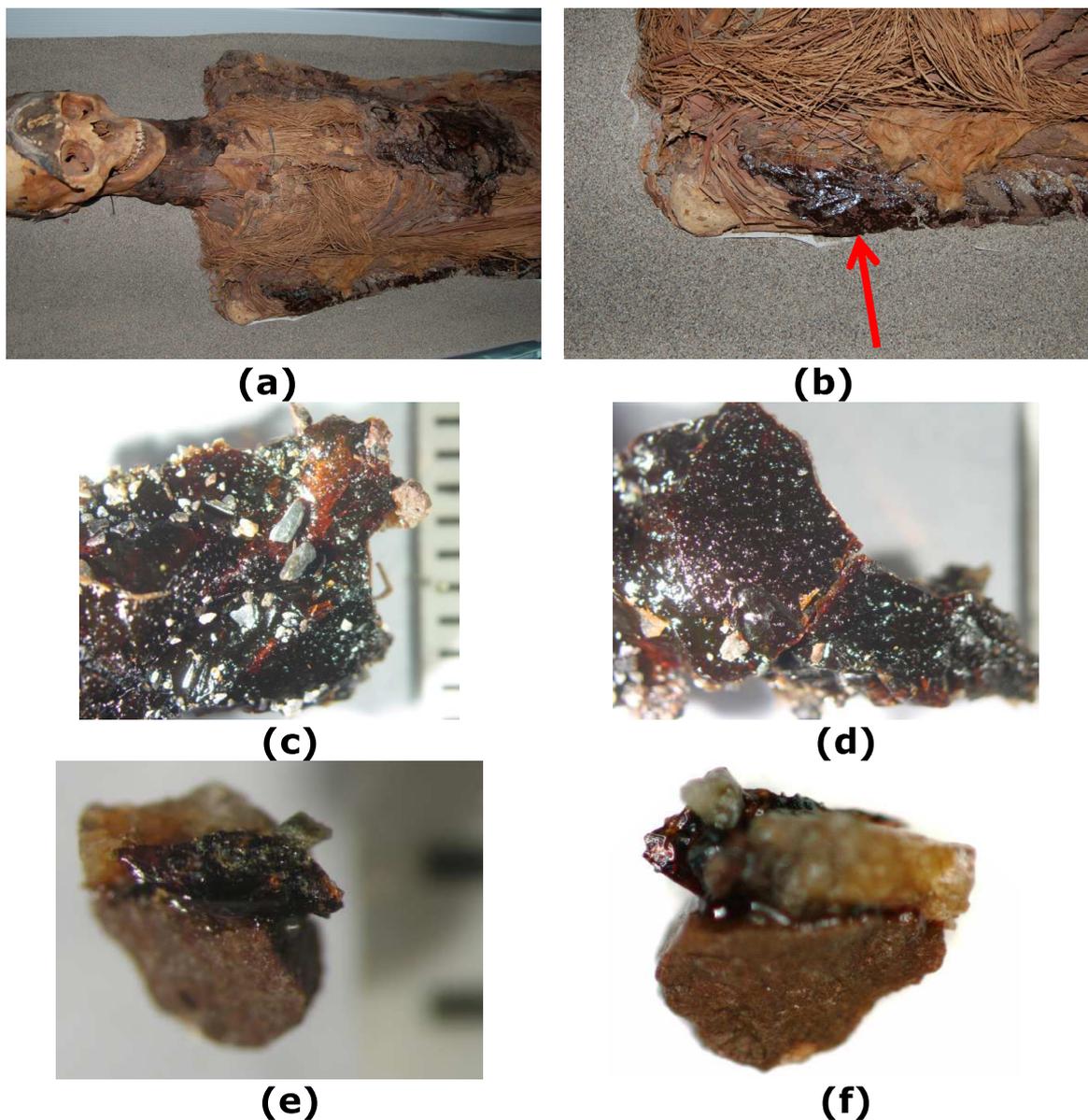


Figure 2-19 : (a) Photographie de la momie étudiée et (b) zoom sur la zone de prélèvement de l'échantillon de peau © Marcela A. Sepulveda Retamal¹⁴ (c-d) Photographies à la loupe binoculaire du prélèvement et (e-f) de l'échantillon étudié.

¹⁴ Archéologue et professeur de recherche à l'Universidad de Tarapacá, Departamento de Antropología, Chili

2.3.4.3 Caractérisation préliminaire de l'échantillon

L'observation de l'échantillon à la loupe binoculaire révèle la présence d'une couche principale, associée à de nombreux éléments minéraux (Figure 2-19 c-f). Cette couche brillante, de couleur marron, a fait l'objet de tests de solubilité, d'une analyse Raman, et d'une analyse FTIR en transmission (Figure 2-20). Le spectre le plus proche dans la bibliothèque de spectres IR disponible correspondait à une colle de peau¹⁵.

D'autre part, le bloc surfacé en ultramicrotomie a été analysé en microscopie électronique à balayage. Les images, acquises en mode BSE sous une pression partielle de 0.8 mbar, montrent la présence de zones (grains et vaste étendue en bas à droite) correspondant à des éléments de numéro atomique élevé, minéraux. La zone supérieure, plus foncée sur ces images, correspond à la zone marron sur l'image optique. Elle apparaît fissurée en plusieurs endroits, sans doute du fait des contraintes mécaniques imposées lors de la coupe. Comme le confirment les images du courant ionique total en TOF-SIMS (présentées en regard Figure 2-21), cette zone n'est pas tout à fait plane.

Les cartographies effectuées en MEB-EDX permettent de visualiser la répartition des éléments minéraux dans la coupe (Figure 2-22). Dans la couche contenant des grains brillants, on détecte surtout du fer associé à du magnésium et de l'oxygène ainsi que du silicium, de l'aluminium, du phosphore et du manganèse. La couche supérieure qui nous intéresse contient essentiellement du carbone et de l'azote, ainsi que du sodium : il s'agit donc probablement d'une couche organique contenant des molécules azotées. La vaste zone apparaissant claire sur les images MEB contient de l'aluminium et du silicium associé à du chlore : il s'agit donc probablement d'un gros grain d'aluminosilicate.

¹⁵ Ces analyses ont été effectuées par Elsa Van Elslande (LAMS, Ivry) au C2RMF.

2- Imagerie chimique de la peau de momie

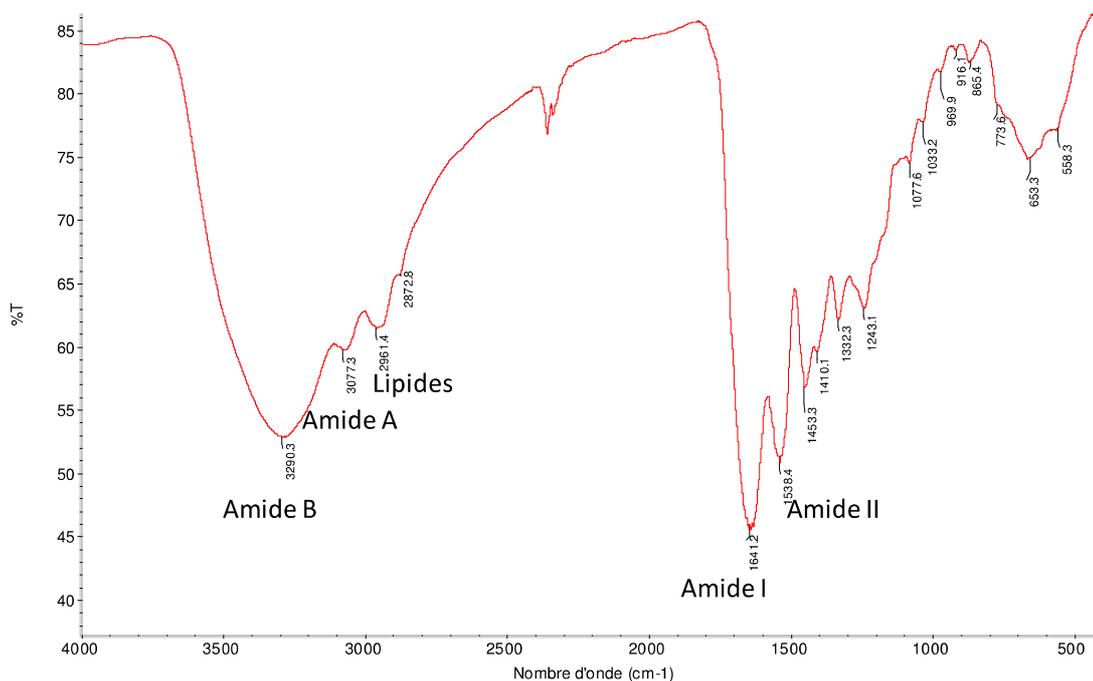


Figure 2-20 : Spectre FTIR de la couche brillante à la surface de la peau de la momie étudiée¹⁵.

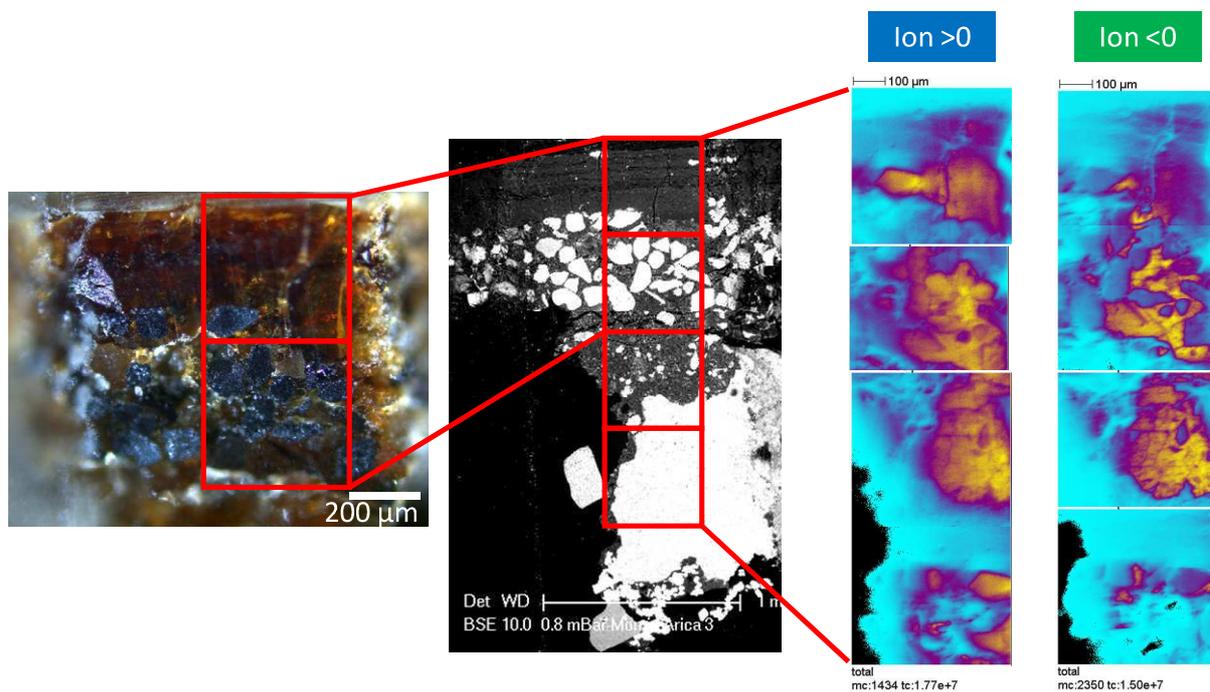


Figure 2-21 : Échantillon de peau de momie Chinchorro. Images au microscope optique, au MEB et ioniques totales en TOF-SIMS dans les deux modes de la surface du bloc étudié. Les carrés rouges délimitent les zones étudiées en TOF-SIMS sur les différentes images.

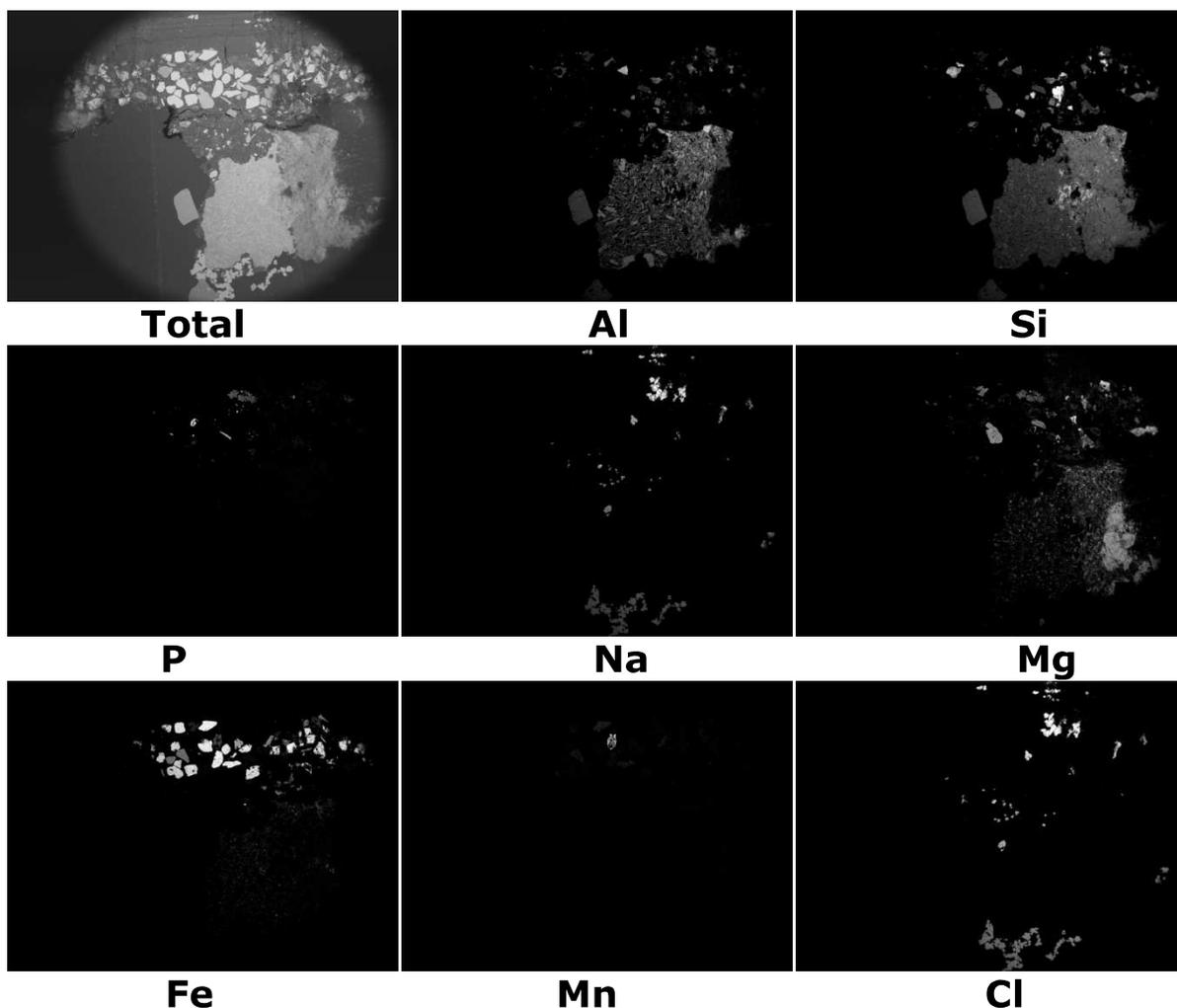


Figure 2-22 : Échantillon de peau de momie Chinchorro. Cartographie MEB-EDX des principaux éléments d'intérêt (mode BSE, pression partielle de 0.8 mbar).

2.3.4.4 Analyse TOF-SIMS

L'analyse TOF-SIMS présentée ici concerne la partie supérieure de l'échantillon, qui nous intéressait plus particulièrement. Le spectre de cette partie présente des pics de faible rapport m/z .

On détecte la présence de protéines sous la surface, dans les deux modes d'ionisation (Figure 2-24). Le spectre de la ROI correspondante, en mode d'ionisation positif présenté Figure 2-25, est dominé par les ions sodium et potassium. Plusieurs pics correspondent aux acides aminés glycine, alanine et proline mais les autres pics d'intensité importante correspondent à des adduits sodium de fragments protéiques (Jones, 2006) : $CNNa_2^+$ (m/z 71.98) et $CNKNa^+$ (m/z 87.97) ainsi qu'à deux fragments inconnus aux rapports m/z 80.95 et 96.93 respectivement. Ceci suggère une fragmentation importante des protéines présentes. D'autres substances organiques sont aussi détectées, en moindre quantité mais ne sont pas colocalisées avec les espèces protéiques : des polysaccharides et des lipides de type acide palmitique et acide stéarique (Figure 2-24). Leur origine reste à élucider.

En outre, différents minéraux sont détectés au-dessus de cette couche protéique : sulfates, phosphates, silicates, magnésium et calcium (Figure 2-24). Ils peuvent provenir du milieu d'enfouissement ou, comme expliqué dans le cas de la momie andine (paragraphe 2.3.3.3), résulter de la dégradation des couches supérieures de la peau (phospholipides, calcium).

Polypeptides

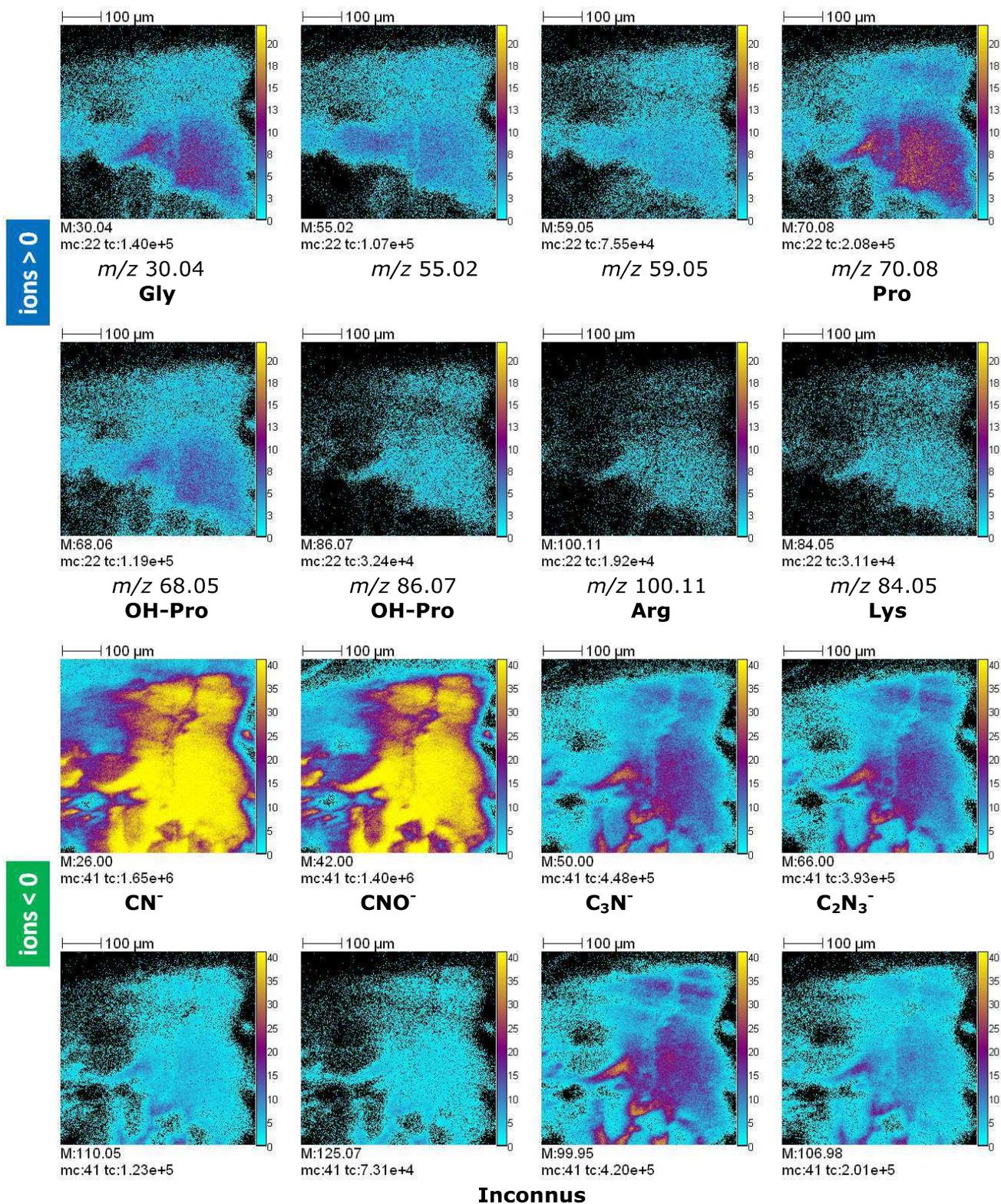
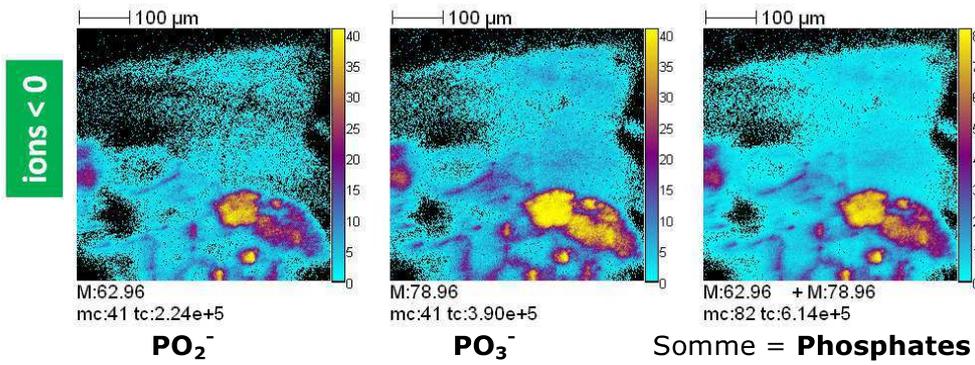
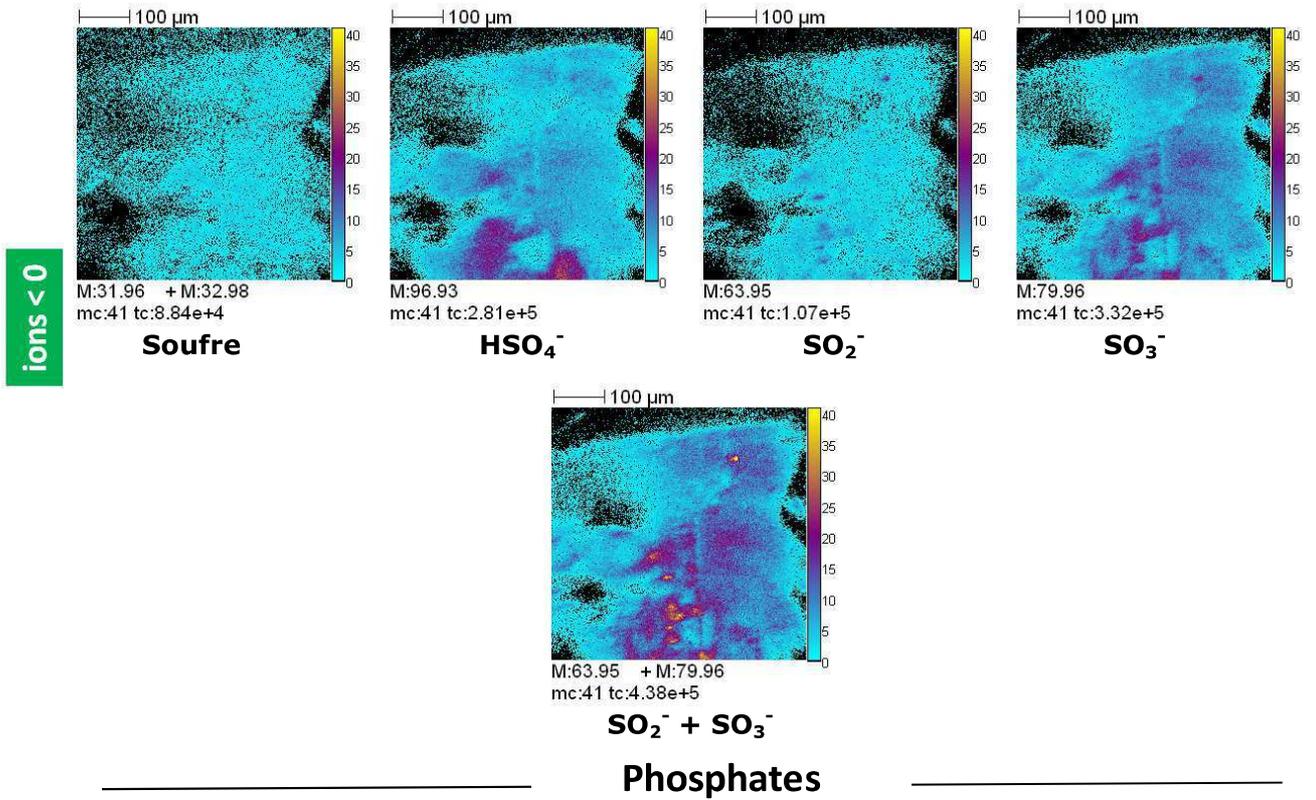
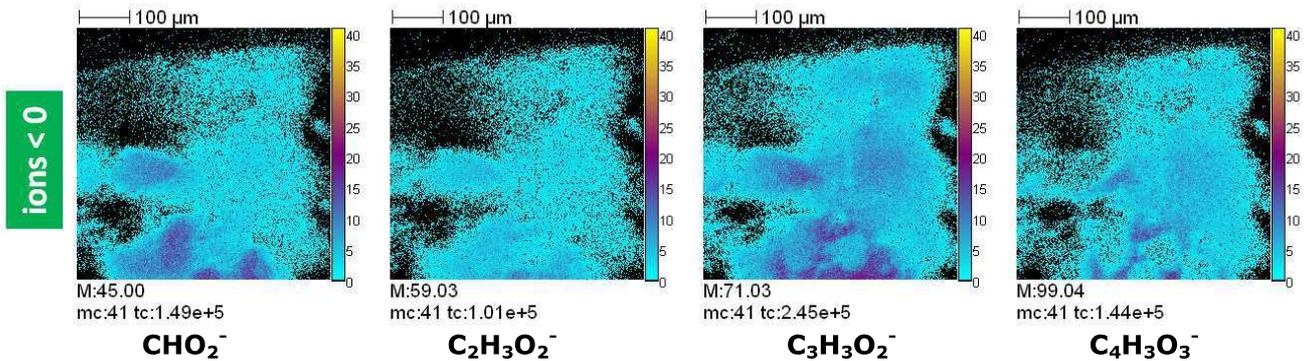


Figure 2-23 : Analyse de la peau de momie Chinchorro. (a) Image ioniques des fragments d'acides aminés (mode d'ionisation positif), de fragments protéiques et de fragments inconnus colocalisés avec les signaux protéiques (mode d'ionisation négatif).

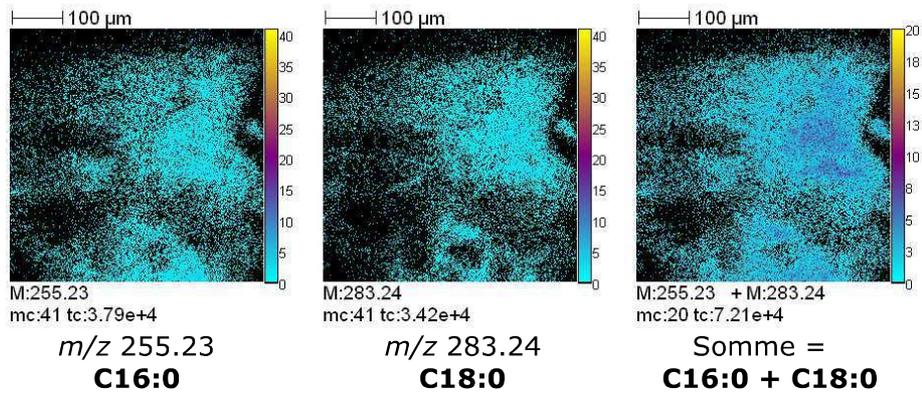
Sulfates



Polysaccharides



Lipides



Minéraux

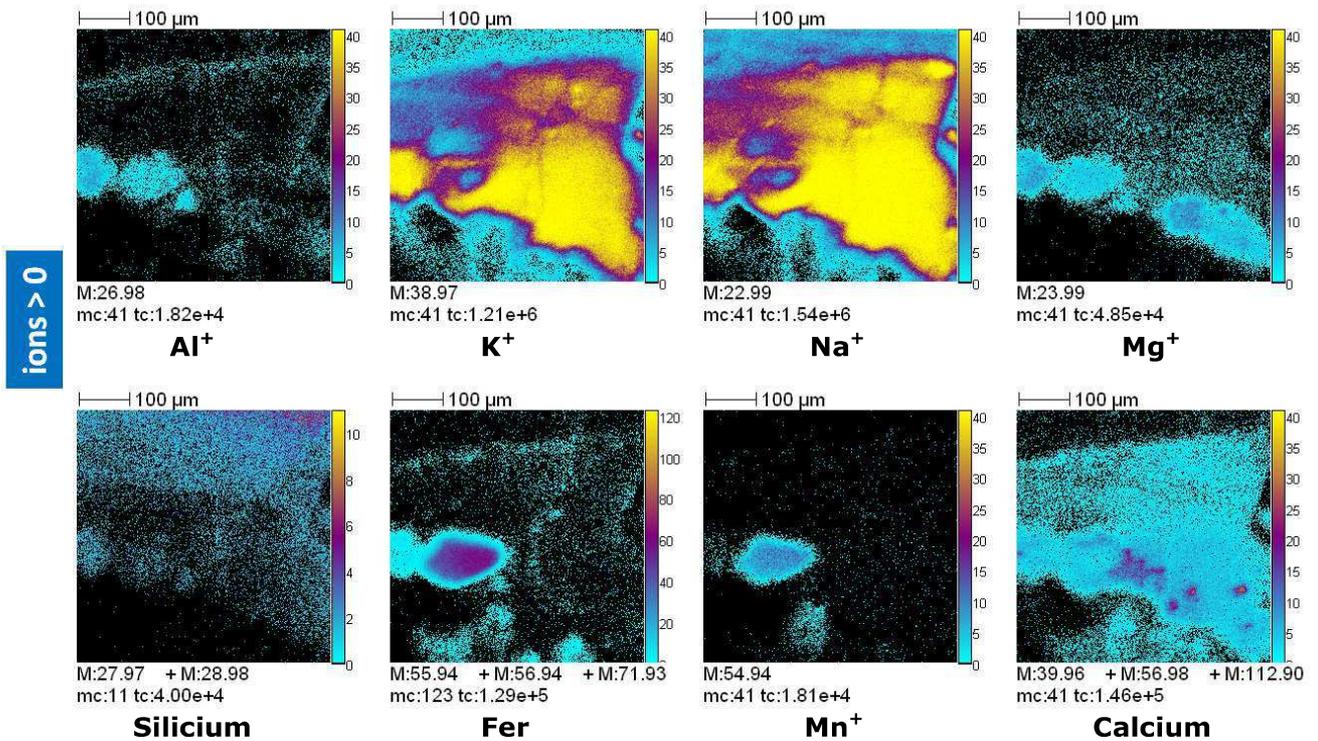


Figure 2-24 : Analyse de la peau de momie Chinchorro. Images ioniques correspondant aux sulfates, phosphates et polysaccharides, ainsi qu'aux minéraux. Taille des images TOF-SIMS : 500 X 500 µm².

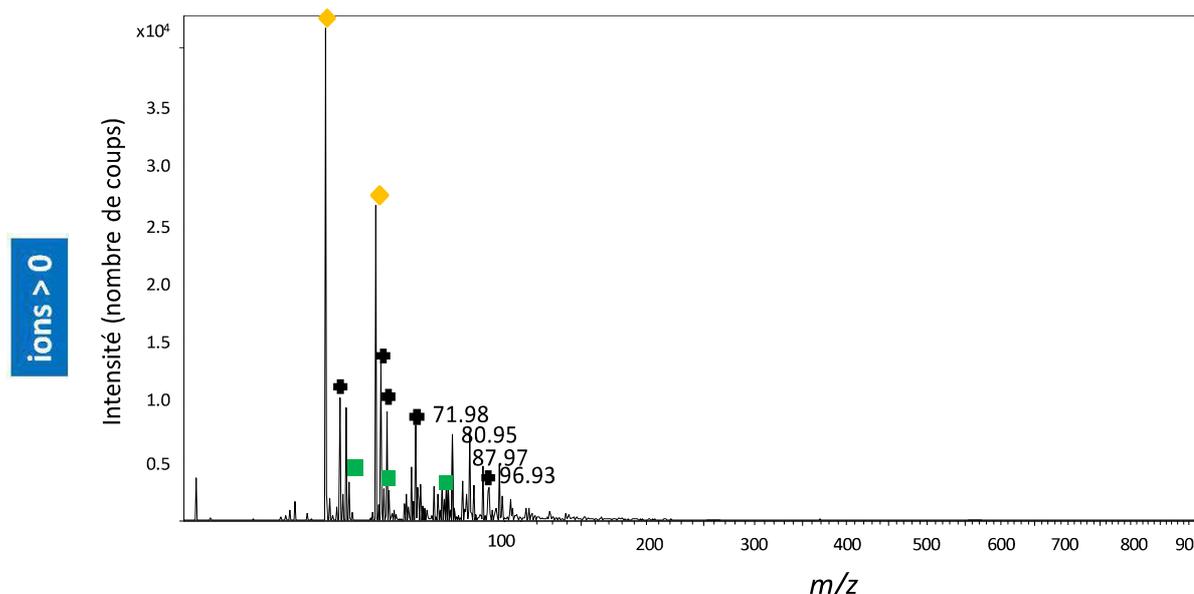


Figure 2-25 : Analyse de la peau de momie Chinchorro. Spectre de la ROI correspondant aux protéines, en mode d'ionisation positif. Carrés verts : fragments protéiques. Losanges jaunes : ions sodium et potassium. Croix noires : fragments correspondant à la résine d'inclusion.

2.3.4.5 Analyses complémentaires et perspectives

Une étude en spectrométrie infrarouge a été réalisée avec un spectromètre FTIR portable de type Alpha équipé d'un module ATR « Platinum » QuickSnap™ A220/D-01 (Brüker Optik, Ettlingen, Allemagne).

Les échantillons analysés correspondaient à des grains détachés de l'échantillon de peau étudié, certains présentant à la loupe binoculaire un aspect correspondant au quartz, d'autres plutôt à la peau. La plupart d'entre eux ont la même allure et correspondent effectivement à du quartz. Le spectre correspondant aux grains présentés Figure 2-26 a, en revanche, présente une signature plus complexe avec notamment des bandes amides et lipidiques. Ce dernier a été comparé à celui d'un échantillon de colle de peau moderne (colle de peau de lapin), produit utilisé en peinture et dorure, à base de collagène chauffé (donc dégradé).

Les deux spectres sont présentés, superposés, Figure 2-26 b. On remarque la similitude importante entre le spectre bleu de l'échantillon et le spectre rouge de la colle de peau dans la zone spectrale correspondant aux bandes amides et à la large bande des lipides. Toutefois deux pics supplémentaires sont présents dans le spectre de notre échantillon, à 2920 et 2980 cm^{-1} , (élongation asymétrique CH_2 et CH_3 respectivement). Cette particularité et les autres bandes principales du spectre, ont déjà été mises en évidence et correspondent à la peau et plus particulièrement au *stratum corneum* (Cotte, 2004). Ces analyses suggèrent la présence de collagène provenant du derme et partiellement dégradé ainsi que de produits lipidiques du *stratum corneum* de l'épiderme.

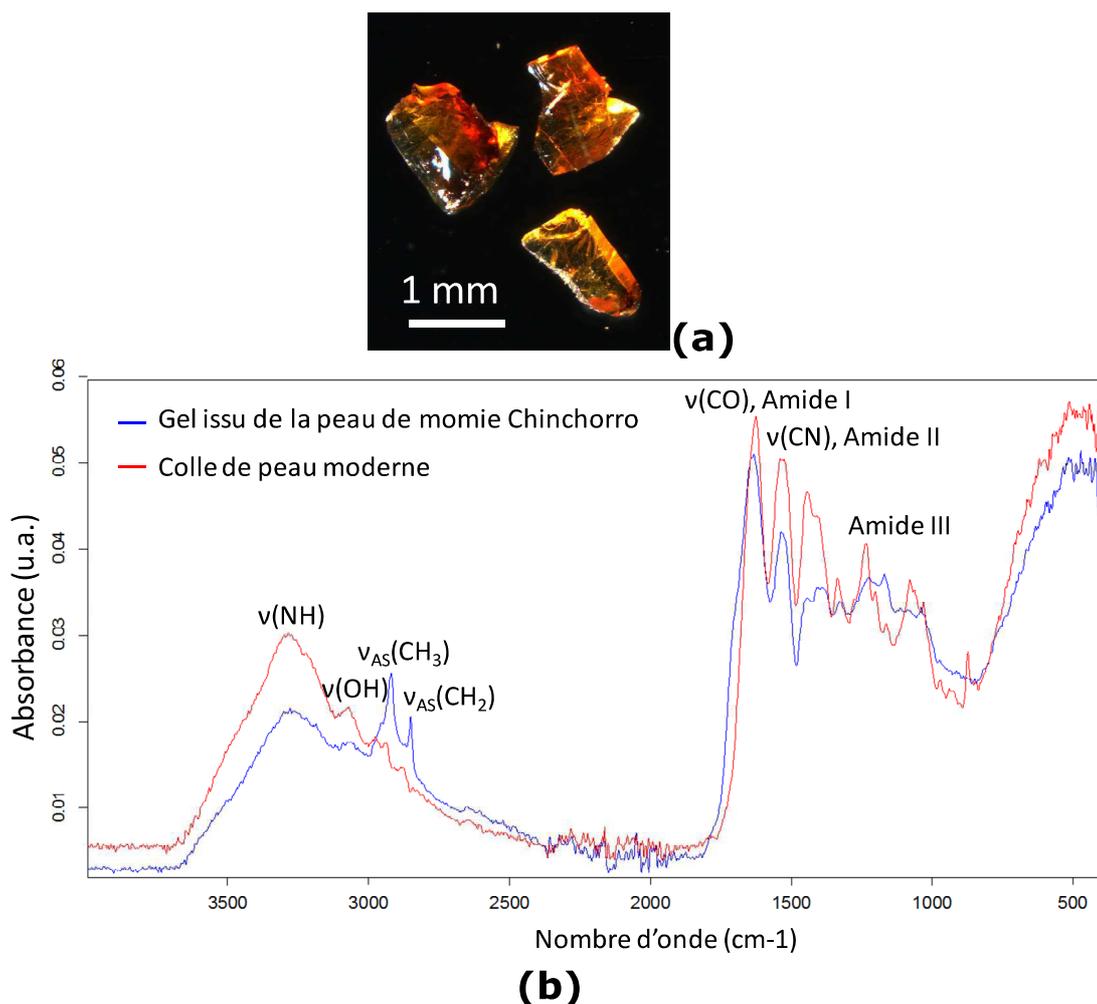


Figure 2-26 : Analyse de la peau de momie Chinchorro en IR ATR. (a) Photographie au microscope optique des grains analysés et (b) comparaison du spectre d'un grain marron (bleu) et de colle de peau moderne (rouge).

Une analyse menée en MALDI-MS¹⁶ en dissolvant l'échantillon dans l'eau et en utilisant l'acide 2, 5 dihydroxybenzoïque (DHB) et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) comme matrices respectivement en modes positif et négatif, n'a pas permis de détecter des produits de dégradation lipidiques ou protéiniques. Ce résultat pourrait s'expliquer par une mauvaise désorption et/ou une mauvaise ionisation des composés présents dans l'échantillon. Rappelons que le poids moléculaire du collagène de type I est $M=285$ kDa et que des protéines de masse moléculaire au moins égale à 300 kDa peuvent, en principe, être détectées en MALDI (de Hoffmann, 2005). Une analyse en électrophorèse, prévue prochainement, devrait apporter plus de renseignements sur les protéines et peptides encore présents dans l'échantillon.

S'il s'agit bien de protéines, et plus particulièrement de collagène, comme le montre nos analyses, le défi consistera à déterminer si celui-ci provient de peau humaine ou animale. Les hypothèses avancées pour le moment sont l'utilisation de peau de caméléon ou de lion de mer. L'histologie pourrait dans ce cas apporter un éclairage supplémentaire si des structures sont encore présentes. Cela suppose toutefois de pouvoir effectuer des coupes en paraffine et de disposer d'échantillons ou d'images histologiques pour la comparaison.

¹⁶ Cette analyse a été menée par Vincent Guérineau dans l'équipe de spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS, Gif/Yvette).

2.3.5 Conclusions sur l'étude de la peau des momies naturelles et embaumées

L'étude de peau de momies naturelles a montré la difficulté de préparation des échantillons, en particulier pour la réalisation de coupes semi-fines pour l'analyse en TOF-SIMS. Toutefois, dans certains cas particuliers de bonne conservation, la stratigraphie et la structure actuelle de la peau peuvent être mis en évidence.

Dans le cas des momies embaumées, ce n'est pas le dessèchement de l'échantillon qui s'avère problématique mais son hétérogénéité. En effet, celui-ci peut présenter, outre les couches de peau, des couches de dégradations ainsi que des couches épaisses de résine d'embaumement ou de tissu, susceptibles de gonfler lors de la réhydratation de l'échantillon et de le fragiliser. Dans ce cas, on a également remarqué l'absence fréquente de structures et signaux correspondant à l'épiderme.

Le cas particulier de la momie Chinchorro laisse beaucoup de questions ouvertes, en particulier sur l'origine exacte du gel protéique remplaçant peu à peu la peau.

Bibliographie

A

ALVRUS, A., WRIGHT, D. *et al.* (2001). 'Examination of Tattoos on Mummified Tissue using Infra-red Reflectography.' *Journal of Archaeological Science* 28(4): 395-400.

AMORY, S., KEYSER, C. *et al.* (2007). 'STR typing of ancient DNA extracted from hair shafts of Siberian mummies.' *Forensic Science International* 166(2-3): 218-229.

ANDERSON, E. C., LIBBY, W.F., WEINHOUSE, S., REID A. F., *et al.*(1947) 'Natural radiocarbon from Cosmic Radiation', *Physical Review*, 72, 931-936

APPELBOOM, T., STRUYVEN, J. (1999). 'Medical imaging of the Peruvian mummy Rascar Capac.' *Lancet* 354(9196): 2153-2155.

ARRIAZA, B. (1996). 'Preparation dead coastal andean preceramic populations'. In K. Spindler, H. Wilfing, E. Rastbichles-Zisserning, D. Zur Nedden, & H. Nothdurfter (Eds.), *Human Mummies A Global Survey Status Techniques Conservation* (p. 135). Springer.

ARRIAZA, B. T., STANDEN, V.G. (2008). 'Muerte, momias y ritos ancestrales', Editorial Universitaria.

AUFDERHEIDE, A. C. (2003). 'The Scientific Study of Mummies', Cambridge University Press.

B

BALOUT, L., ROUBET,C. (2006). 'La momie de Ramsès II - Contribution scientifique à l'égyptologie.'. Edition Recherches sur les Civilisations.

BARBERO, A. M., FRASCH, H.F. (2009). 'Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review.' *Toxicology in Vitro* 23(1): 1-13.

BEREUTER, T.L., *et al.* (1996). 'Post-mortem alterations of human lipids-part I : evaluation of adipocere formation and mummification by dessication' In : "The man in ice 3 : Human Mummies.", Spindler, K.

BEREUTER, T.L., (1997). 'Iceman's mummification-Implications from Infrared Spectroscopical and Histological Studies.' *Chemical European Journal* 3 (7)

BOANO, R., E. FULCHERI, *et al.* (2009). 'Neural tube defect in a 4000-year-old Egyptian infant mummy: A case of meningocele from the museum of anthropology and ethnography of Turin (Italy).' *European Journal of Paediatric Neurology* 13(6): 481-487.

BONI, T., RÜHLI, F.J. *et al.* (2004). 'History of paleoradiology: early published literature, 1896-1921.' *Canadian Association of Radiologists Journal-Journal De L Association Canadienne Des Radiologistes* 55(4): 203-210.

BRIER, B., WADE, R. S. (2001) 'Surgical procedures during ancient egyptian mummification.' *Chungará (Arica)* 33(1), 117-123.

BRILOT, M. (2000) 'Les tatouages des momies de l'Altai.' *L'Anthropologie* 104(3): 473-478.

BUCKLEY, S.A, EVERSLED, R.P.(2001). 'Organic chemistry of embalming agents in Pharaonic and Graeco-Roman mummies.' *Nature* 413 : 837-841

C

CARMINATI, P. (2010) 'Étude et conservation : Problématiques de la restauration d'une momie andine des collections du musée de l'Homme.' Mémoire de conservation-restauration. École Supérieure des Beaux-arts de Tours.

CERSOY, S., RICHARDIN, P. *et al.* (2012). 'Cluster TOF-SIMS imaging of human skin remains: analysis of a South-Andean mummy sample.' *Journal of Mass Spectrometry* 47(3): 338-346.

COCKBURN, A., COCKBURN, E. (1985). 'Mummies, Disease, and Ancient Cultures', Cambridge University Press.

COLLECTIF ZEM (2011) 'Mumien: Mensch, Medizin, Magie Aktuelle Forschungserkenntnisse für unsere Zukunft', fascicule de l'exposition, LifeScience

CONLOGUE, G., BECKETT, R. *et al.* (2008). 'Paleoimaging: The Use of Radiography, Magnetic Resonance, and Endoscopy to Examine Mummified Remains.' *Journal of Radiology Nursing* 27(1): 5-13.

COTTE, M. (2004). 'Développement de la microscopie infrarouge avec rayonnement synchrotron pour l'étude de pratiques pharmaceutiques anciennes' Thèse de doctorat de l'université Paris 6.

COTTE, M., WALTER, P. *et al.* (2005). 'Studying skin of an Egyptian mummy by infrared microscopy.' *Vibrational Spectroscopy* 38(1-2): 159-167.

D

DAVID, A. R. (1997). 'Disease in Egyptian mummies: the contribution of new technologies.' *The Lancet* 349(9067): 1760-1763.

DE HOFFMANN, E., STROOBANT, V. (2005). 'Spectrométrie de masse', Dunod.

DEBAINE-FRANCFORT, C., IDRIS, A., BINHUA W..(1994) 'Agriculture irriguée et art bouddhique ancien au cœur du Taklamakan (Karadong, Xinjiang, IIe-IVe siècles).' In: Arts asiatiques. Tome 49. pp. 34-52.

DEBAIN-FRANCFORT, C., IDRIS, A. *et al.* (2001). 'Keriya, mémoires d'un fleuve: archéologie et civilisation des oasis de Taklamakan', Findakly.

DEGANO, I., COLOMBINI, M.P. (2009). 'Multi-analytical techniques for the study of pre-Columbian mummies and related funerary materials.' *Journal of Archaeological Science* 36(8): 1783-1790.

DICK, I. P., SCOTT R.C. (1992). 'Pig ear skin as an *in vitro* model for human skin permeability.' *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 44(8): 640-645.

DICKSON, J.H., RICHARDS, M.P., HEBDA, R.J., MUDIE, P.J., *et al.* (2004) 'Kwäday Dän Ts'inchi, the first ancient body of a man from a North American glacier: reconstructing his last days by intestinal and biomolecular analyses' *The Holocene*, 14: 481-486

DUNAND, F., LICHTENBERG, R. (2006). 'Mummies And Death in Egypt', Cornell University Press.

E

EDWARDS, H. G. M., GNIADOCKA, M. *et al.* (2002). 'NIR-FT Raman spectroscopy as a diagnostic probe for mummified skin and nails.' *Vibrational Spectroscopy* 28(1): 3-15.

ERMINI, L., OLIVIERI, C. *et al.* (2008). 'Complete Mitochondrial Genome Sequence of the Tyrolean Iceman.' *Current Biology* 18(21): 1687-1693.

EVERSHED, R. P. (1992). 'Chemical composition of a bog body adipocere.' *Archaeometry* 34(2): 253-265.

ÉVIN, J., LAMBERT, G.N. *et al.* (2005). 'Datation en laboratoire', Errance, Faton.

F

FITZGERALD, A. J., WALLACE, V.P. *et al.* (2006). 'Terahertz pulsed imaging of human breast tumors.' *Radiology* 239(2): 533-540.

FLECKINGER, A. (2010) 'People from the Ice'. In : Wiczorek, A., Rosendahl, W., "Mummies of the World", Prestel.

FORBES, S. L., STUART, B. H., *et al.* (2005). 'The effect of the burial environment on adipocere formation.' *Forensic Science International* 154(1): 24-34.

FRIEDRICH, K. M., NEMEC, S. *et al.* (2010). 'The story of 12 Chachapoyan mummies through multidetector computed tomography.' *European Journal of Radiology* 76(2): 143-150.

FUKUNAGA, K., CORTES, E. *et al.* (2011). 'Investigating the use of terahertz pulsed time domain reflection imaging for the study of fabric layers of an Egyptian mummy.' *Journal of the European Optical Society-Rapid Publications*, 6.

G

GAUTHIER, D., (2009). 'Dialyse.' Site internet d'introduction aux techniques utilisées en biochimie, <http://www.chimie-biochimie.umoncton.ca/bch/dg/siitub/gendialyse.html>

GILBERT, M. T. P., KIVISILD, T. *et al.* (2008). 'Paleo-Eskimo mtDNA Genome Reveals Matrilineal Discontinuity in Greenland.' *Science* 320(5884): 1787-1789.

GILBERT, S. G. (2001). 'Tattoo History: a Source Book', Juno Books-New-York.

GILL-FRERKING, H., (2010) 'Bog Bodies-Preserved Bodies from Peat' In : Wieczorek, A., Rosendahl, W., "Mummies of the World", Prestel.

GRAEFEN, A., ALT, K.W., (2010) Mummification today-A very modern affair In : Wieczorek, A., Rosendahl, W., "Mummies of the World", Prestel.

GUICHAOUA, J. J. (1977). 'La peau du porc: histologie, histochimie, ultrastructure, comparaison avec l'homme', Thèse de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

GUILLOT, D., (2005). 'La momie de sa confection à son utilisation.' Histoire de la Pharmacie.

H

HART-HANSEN, J-P.,(1996). 'The mummy find from Quilakitsoq in northwest Greenland'. In "The man in ice 3 : Human Mummies.", Spindler, K.

HEREMANS, J. F. (1978). 'Éléments d'immunochimie', Fonteyn Medical Books.

HERODOTUS (-460 environ) 'Histoires', Livre Second traduction : Legrand, P. E. (1972). Hérodote: Livre II. Euterpe, Belles Lettres.

J

JIT, I., SEHGAL, S. *et al.* (2001). 'An Indian mummy: a case report.' *Forensic Science International* 117(1-2): 57-63.

JÜRGEN-FISCHER, K. "Mumia" and Asphalt in the Art of Painting" In : Wieczorek, A., Rosendahl, W., "Mummies of the World", Prestel.

K

KARLIK, S. J., BARTHA, R. *et al.* (2007). 'MRI and multinuclear MR spectroscopy of 3,200-year-old Egyptian mummy brain.' *American journal of roentgenology* 189(2): W105-W110.

KLUGER, N., ALDASOUQI, S. (2012) 'A new purpose for tattoos: Medical alert tattoos.' *La Presse Médicale*, en cours d'impression.

KLUGER, N., KOLJONEN, V. (2012). 'Tattoos, inks, and cancer.' *The Lancet Oncology* 13(4): e161-e168.

KLYS, M., LECH, T. *et al.* (1999). 'A chemical and physicochemical study of an egyptian mummy 'Iset Iri Hetes' from the Ptolemaic period III-I B.C.' *Forensic Science International* , 99(3): 217-228.

KOWALSKA-PYŁKA, H., CYBULSKI, W. (2009). 'Animaux et éthique -Aperçu des principales approches éthiques concernant les animaux' In : Ouvrage collectif d'enseignement du programme européen « Bioéthique en sciences de la vie et de l'environnement ».

KUTSCHERA, W., MÜLLER, W. (2003). "'Isotope language" of the Alpine Iceman investigated with AMS and MS.' *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 204(0): 705-719.

L

LANGENHEIM, J. H. (2003). 'Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany', Timber Press.

LANGLOIS, J. , CERSOY, S., RICHARDIN, P. (2010) 'Rapport d'étude GC-MS des résines déposées à la surface de la peau de momie Tarapacá', Rapport d'étude C2RMF.

LANGLOIS, J. (2011) 'Analyse de la substance noire visible à la surface du linceul d'une momie d'enfant égyptienne d'époque romaine', Rapport d'étude C2RMF n° 21604.

LE HÔ A.-S., BOREL T., LAVIER C., RICHARDIN P., *et al.* (2011) 'Examens, analyse et datation de trois portraits en cire d'Henri IV - A la recherche d'une technique et d'une chronologie'. In : Actes du colloque ' Henri IV. Images et remembrance ', Institut de France, Fondation de Chantilly, juin 2010, 39-52.

LEE, I. S., KIM, M.J. *et al.* (2007). 'Three-dimensional reconstruction of medieval child mummy in Yangju, Korea, using multi-detector computed tomography.' *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* 189(6): 558-568.

LICHTENBERG, R.*et al.* (2000). 'Aspects techniques de la momification'. Dijon, FRANCE, Faton.

ŁUCEJKO, J. J., LLUVERAS-TENORIO, A. *et al.* (2012). 'An analytical approach based on X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy and gas chromatography/mass spectrometry to characterize Egyptian embalming materials.' *Microchemical Journal* 103(0): 110-118.

LYNNERUP, N. (2010). 'Medical Imaging of Mummies and Bog Bodies - A Mini-Review.' *Gerontology* 56(5): 441-448.

M

MADEA, B., PREUSS J., MUSSHOF, P. (2010) 'From Flourishing Life to Dust-The Natural Cycle of Growth and Decay' In : Wiczorek, A., Rosendahl, W., "Mummies of the World", Prestel.

MARRO, C., BAKHSHALIYEV, V., SANZ, S., (2010). 'Archaeological investigations on the salt mine of Duzdagi (Nakhchivan, Azerbaïdjan).' *Tüba-ar (Annual Journal of Archaeology)*, 13 : 229-244.

MEKOTA, A. M., VERMEHREN, M. (2005). 'Determination of optimal rehydration, fixation and staining methods for histological and immunohistochemical analysis of mummified soft tissues.' *Biotechnic & Histochemistry* 80(1): 7-13.

MÜNNEMANN, K., BONI, T. *et al.* (2007). 'Noninvasive (1)H and (23)Na nuclear magnetic resonance imaging of ancient Egyptian human mummified tissue.' *Magnetic Resonance Imaging* 25(9): 1341-1345.

N

NANIKAWA, R. (1973). 'Über die Bestandteile von natürlichen und experimentell hergestellten Leichenwachsen.' *International Journal of Legal Medicine* 72(3): 194-202.

NICOLA, G.L. *et al.* (2008). 'Preservation and conservation of mummies and sarcophagi.' *E-conservation ,the online magazine*, 3 : 22-47

NUNN, J.F., TAPP, E., (2000) 'Tropical disease in ancient Egypt' *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene* 94 : 147-153

O

ÖHRSTRÖM, L., BITZER, A. *et al.* (2010). 'Technical note: Terahertz imaging of ancient mummies and bone.' *American Journal of Physical Anthropology* 142(3): 497-500.

P

PABST, M. A., LETOFISKY-PAPST, I. *et al.* (2009). 'The tattoos of the Tyrolean Iceman: a light microscopical, ultrastructural and element analytical study.' *Journal of Archaeological Science* 36(10): 2335-2341.

PAINTER, T. J., (1991). 'Lindow man, Tollund man and other peat-bog bodies - the preservative and antimicrobial action of sphagnum, a reactive glycuronoglycan with tanning and sequestering properties.' *Carbohydrate Polymers* 15(2): 123-142.

PAPAGEORGOPOULOU, C., RENTSCH, K. *et al.* (2010). 'Preservation of cell structures in a medieval infant brain: A paleohistological, paleogenetic, radiological and physico-chemical study.' *Neuroimage* 50(3): 893-901.

PAPAGEORGOPOULOU, C., XIROTIRIS, N.I. *et al.* (2009). 'Indications of embalming in Roman Greece by physical, chemical and histological analysis.' *Journal of Archaeological Science* 36(1): 35-42.

POLLARD, A.M., BROTHWELL, D.R., AALI, A., BUCKLEY, S., *et al.*, (2008), 'Below the salt: a preliminary study of the dating and biology of five salt-preserved bodies from Zanjan Province, Iran', *Iran-Journal of the British Institute of Persian Studies*, 46 : 135-150

POMMERENING, T. (2010) 'Mumia-From Ozokerite to Cure-All' In: Wieczorek, A., Rosendahl, W., "Mummies of the World", Prestel.

PRINOTH-FORNWAGNER, R., NIKLAUS, T.R. (1994). 'The man in the ice: results from radiocarbon dating.' *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 92(1-4): 282-290.

PROEFKE, M. L., RINEHART, K.L. (1992). 'Analysis of an Egyptian mummy resin by mass spectrometry.' *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 3(5): 582-589.

R

RABINO-MASSA, E.,(1981). 'Etude de la peau des égyptiens prédynastiques.' *Bulletins et Mémoires de la Société d'anthropologie de Paris*, 8 (3): 291-296.

RAMAROLI, V., HAMILTON, J. *et al.* (2010). 'The Chehr Abad 'Salt men' and the isotopic ecology of humans in ancient Iran.' *American Journal of Physical Anthropology* 143(3): 343-354.

RENAUD, P., RENAUD, F.(2008) . 'Diagnostic des maladies infectieuses chez les momies et les squelettes.' *Bulletin de l'association des anciens élèves et des élèves de l'ENSET et de l'ENS de Cachan*, 234 : 2-9

RICHARDIN, P., GANDOLFO, N., CARMINATI, P., WALTER, P., (2011) 'A new protocol for radiocarbon dating of hair and keratin type samples—application to an Andean mummy from the National Museum of Natural History in Paris.' *Archaeological and Anthropological Sciences*, 1-6.

RICHARDIN, P., GANDOLFO, N., SELIER, M., ROTTIER V., (2010). 'Datation par le carbone-14 de 42 échantillons d'origine animale issus des fouilles des sites de Karadong, Djoumboulak Koum et quelques sites en prospection (Chine)'. Complément au compte-rendu d'étude C2RMF n° 11700.

RICHARDIN, P., DURIEUX J., FOSSEY A., COUVREUR, *et al.* (2007). 'Datation par le carbone-14 d'échantillons d'origine végétale issus des fouilles des sites de Karadong, Djoumboulak Koum et quelques sites en prospection (Chine)', Rapport d'étude C2RMF N°11700.

RICHARDIN, P., GUERRA, M.F., SALOMON, J. (2003) 'LMC14 : le nouveau laboratoire pour la mesure du carbone-14 par spectrométrie de masse par accélérateur', *Technè*, 17, 99-100.

RICHARDIN, P., COPY, S., CHAHINE, C., SALTRON, F., *et al.*(1996) 'GC and GC/MS characterization of degradation amino acids in naturally and artificially aged leathers' *Journal of the American Leather Chemists Association (JALCA)*, 91 (1), 2-17.

ROSENDAHL, W., (2010) 'Natural Mummification-Rare, but Varied' In: Wieczorek, A., Rosendahl, W., "Mummies of the World", Prestel.

RÜHLI, F. J., BONI, T. *et al.* (2007a). 'Non-invasive spatial tissue discrimination in ancient mummies and bones in situ by portable nuclear magnetic resonance.' *Journal of Cultural Heritage* 8(3): 257-263

RÜHLI, F.J., *et al.*(2007b). 'Clinical Magnetic Resonance Imaging of Ancient Dry Human Mummies without Rehydration.' *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 298(22): 2618-2620.

S

SANDISON, A.T.,(1955) 'The histological examination of mummified material.' *Staining Technology* 30 : 277

SHIN, D. H., YOUN, M. *et al.* (2003). 'Histological analysis on the medieval mummy in Korea.' *Forensic Science International* 137(2-3): 172-182.

SMITH, G. D, CLARK, R. J. H. (2004). 'Raman microscopy in archaeological science.' *Journal of Archaeological Science* 31(8): 1137-1160.

SOTO-HEIM, P. *et al.* (2000). 'La momie de Martres d'Artières (Auvergne).' Dijon, France, Faton.

SPINDLER, K., (1996). 'Human Mummies: A Global Survey of Their Status and the Techniques of Conservation', Springer.

STÜCKER, M., BECHARA, F.G. *et al.* (2001). 'What happens to skin after 2000 years in a bog?' *Hautarzt* 52(4): 316.

SYDLER, T. BONI, T. *et al.* (2009). 'CT-based assessment of relative soft tissue alteration in different types of ancient mummy.' *American Journal of Physical Anthropology*: 251-252.

T

TACITUS, C. (98) « De Origine et Situ Germanorum » chapitre 12 traduction Patrick Voisin 2009.

TAKATORI, T. (2001). 'The mechanism of human adipocere formation.' *Legal Medicine* 3(4): 193-204.

TCHAPLA A., MEJANELLE P., BLETON J., GOURSAUD S., (2004). 'Characterisation of embalming materials of a mummy of the Ptolemaic era. Comparison with balms from mummies of different era.' *Journal of Separation Science*, 27: 217-234.

TELLENBACH, V., TELLENBACH, M. (2010) 'Mummies in the Andean Regions-The Presence of the Dead'. In: Wieczorek, A., Rosendahl, W., "Mummies of the World", Prestel.

THIEMER-SACHSE, U. (2010) 'Mummies of the Indigenous Inhabitants on the Canary Islands'. In: Wieczorek, A., Rosendahl, W., "Mummies of the World", Prestel.

V

VENABLE, S. L. (2011). 'Gold: A Cultural Encyclopedia', ABC-CLIO.

W

WANG, B.-H. (1996) 'Excavation and preliminary study of the ancient mummies of Xinjiang in China'. In Spindler, K., "Human Mummies: A Global Survey of Their Status and the Techniques of Conservation", Springer.

WERNING, J. (2010) 'Mummies in China'

WIECZOREK, A. AND W. ROSENDAHL (2010). 'Mummies of the World', Prestel.

WILLCOX, A. W. (2002). 'Mummies and molecules: Molecular biology meets paleopathology.' *Clinical Microbiology Newsletter* 24(8): 57-60.

WILLIAM J. BACHA, J., BACHA, L.M. (2012). 'Color Atlas of Veterinary Histology', John Wiley & Sons.

Z

ZWEIFEL, L., BÜNI, T. *et al.* (2009). 'Evidence-based palaeopathology: Meta-analysis of PubMed-listed scientific studies on ancient Egyptian mummies.' *HOMO - Journal of Comparative Human Biology* 60(5): 405-427.

Conclusion

La richesse et la diversité des analyses en imagerie chimique d'échantillons biologiques protéiques d'origine archéologique montrent la puissance de l'imagerie TOF-SIMS en complément des méthodes d'analyses chimiques et biologiques plus classiques. Cette technique offre en effet des caractéristiques particulièrement intéressantes pour l'étude de la dégradation à long terme de ces matériaux rares et complexes. Ainsi il a été possible à travers cette thèse d'identifier et de localiser, à l'échelle submicrométrique, une large gamme de composés, organiques comme minéraux, présents en mélange comme dans des stratigraphies multicouches (épiderme, derme, hypoderme par exemple). Même si l'abondance d'informations recueillies en une seule expérience, sans marquage, rend parfois le dépouillement des données difficilement exhaustif, l'analyse du tissu est plus complète que dans le cas des méthodes biochimiques classiques comme l'histologie. On accède en effet non seulement à la structure des tissus, éventuellement à des marqueurs de leur dégradation, mais aussi à l'identification des protéines et des lipides présents.

Richesse et complexité des analyses par TOF-SIMS

L'étude en imagerie chimique de la peau de momie, tissu complexe dégradé et éventuellement modifié, s'est avérée particulièrement compliquée. Nous avons dû effectuer deux étapes préliminaires : (1) La première a consisté à étudier des matériaux modernes de la même famille mais plus simples chimiquement, composés de collagène seul (cas de l'os) ou de kératine seule (cas des cheveux et des cornes) ; elle nous a permis d'enrichir nos connaissances et de constituer une base de données de spectres TOF-SIMS pour ces tissus. (2) Ce référentiel a été complété par l'étude de matériaux similaires mais anciens (os médiéval et de la Renaissance, cheveux de momies, cornes d'Auroch et de rhinocéros) pour appréhender la dégradation des protéines encore présentes au sein de tissus parfois vieux de plus de dix mille ans.

Grâce à cet « apprentissage » de l'étude des signaux protéiques dans des cas particuliers, nous avons pu nous intéresser au cas de la peau de momies naturelles (momies chinoises du désert du Taklamakan et momie andine de la culture Tarapacá)

comme artificielles (momies égyptiennes du site d'Antinoë, parmi lesquelles la momie dorée exposée au musée de Dunkerque et trois momies égyptiennes conservées au musée d'Athènes). Dans le cas de momies préparées, des composés ayant servi à l'embaumement et la momification, tels que des baumes, du natron et de l'or, ont pu être mis en évidence à la surface de la peau.

Si, comme nous l'avons vu lors de l'étude d'acides aminés isolés et de protéines animales, aucun ion moléculaire d'acide aminé ou à fortiori de peptide n'est détecté en TOF-SIMS, il est néanmoins possible de s'assurer, lors de l'imagerie de tissus, de leur présence et de distinguer directement sur les images chimiques les deux familles de protéines (les collagènes et les kératines) qui les composent. En effet, seuls des fragments d'acides aminés sont détectés par TOF-SIMS et l'identification rigoureuse d'un polypeptide n'est donc pas possible (nous sommes loin des résultats obtenus avec les techniques analytiques employées en protéomique). En revanche, en s'appuyant sur l'étude préalable des acides aminés caractéristiques ou majoritaires de la séquence d'une protéine, nous avons pu détecter des fragments discriminants grâce à leur masse exacte. L'information essentielle recueillie par imagerie TOF-SIMS est donc la localisation de fragments moléculaires sur les images ioniques de la coupe et donc d'acides aminés caractérisant plus spécifiquement l'une ou l'autre des protéines de la peau, mais aussi parfois un lipide ou un phospholipide. Cette nature moléculaire des signaux constitue ici un avantage déterminant sur d'autres techniques d'imagerie élémentaire comme le microscope électronique à balayage couplé à un détecteur de rayons X.

Les composés, organiques comme minéraux, peuvent être identifiés précisément par TOF-SIMS, ce qui offre une complémentarité très intéressante avec les techniques d'imagerie par spectroscopie vibrationnelle (infrarouge ou Raman), plus, a priori, pour caractériser la structure secondaire des protéines. Nous avons ainsi identifié sans ambiguïté l'hydroxyapatite dans la matrice osseuse riche en collagène, avec une résolution spatiale d'environ 300 nm. La résolution atteinte permet également de visualiser et surtout de caractériser in situ les principales structures histologiques des tissus anciens. Il a par exemple été possible de localiser les fibres de collagène du derme et les gouttelettes lipidiques de l'hypoderme, au sein de la peau de différentes momies, d'étudier l'état de dégradation de la matrice d'os anciens à l'échelle d'un ostéon, et également d'effectuer l'image chimique de tubules dans une corne de rhinocéros laineux. Dans le cadre de notre étude, une autre spécificité de l'analyse TOF-SIMS a en outre été exploitée et développée : nous avons pu effectuer une quantification relative des intensités ioniques qui offre une première indication sur les modifications chimiques qui ont eu lieu, à l'échelle microscopique, au sein des tissus archéologiques enfouis depuis

plusieurs centaines d'années au moins. Le calcul de rapports ioniques a permis par exemple d'observer la diffusion de fluor du milieu environnant dans différents os (un phénomène caractéristique de la transformation de l'hydroxyapatite en fluoroapatite qui est parfois utilisé pour dater les ossements), de cartographier la diminution de la portion organique collagénique par rapport à la fraction minérale de l'os (un des aspects de la fossilisation dans les sols) et de caractériser la nature des phases de phosphate de calcium dans les os anciens et modernes comme dans la corne de rhinocéros ancienne.

Enfin, dans le domaine particulier du patrimoine, nous avons pu apprécier le caractère microdestructif du TOF-SIMS : les prélèvements précieux, de taille micrométrique, ont ainsi pu faire l'objet d'analyses complémentaires et l'absence de dépôts de surface (substance conductrice pour le MEB ou matrice MALDI par exemple) rend des analyses futures toujours possibles.

La délicate application aux matériaux anciens

Pour les matériaux anciens, souvent fragiles et difficiles à manipuler, une recherche approfondie a été entreprise afin d'établir le protocole de préparation le plus adapté pour l'étude en imagerie chimique des différents échantillons. Outre le caractère indispensable déjà établi de l'ultramicrotomie, le choix d'un agent enrobant de dureté adaptée et la mise en œuvre de l'inclusion se sont parfois révélés déterminants. Dans le cas délicat de la peau de momie, des essais au cas par cas restent néanmoins nécessaires du fait de la fragilité et de l'hétérogénéité de ces tissus déshydratés. Les autres difficultés de préparation sont liées à la présence de plis dans les coupes de tissus à stratigraphie hétérogène comme la corne de bovidé, et à l'existence d'un phénomène de retrait dans le cas des fibres kératinisées comme les cheveux rendant difficile une imagerie de qualité à haute résolution spatiale.

Outre la distinction de différentes protéines au sein des tissus ou directement sur des protéines riches en cystine telles que la kératine et l'insuline, les indices de dégradations caractéristiques de l'ancienneté de ces matériaux ont été recherchés. Structurellement, nous avons constaté, sur les images de microscopie électronique, comme sur les images chimiques, la présence fréquente de fibres conservées (collagène) mais aussi la disparition de la plupart des structures cellulaires et dans le cas de la peau, de la disparition de la couche supérieure, l'épiderme.

Chimiquement, j'ai pu constater, dans la plupart des cas, que les signaux protéiques pouvaient encore être détectés au sein des tissus, y compris les plus anciens comme la corne de rhinocéros laineux, ce qui témoigne d'une étonnante conservation. Comme constaté par d'autres études de ce type réalisées par histologie, microscopie électronique à transmission ou spectroscopie Raman, les tissus durs (os, cheveux, corne) se sont révélés mieux conservés structurellement et chimiquement que la plupart des tissus mous (peaux dans notre cas). La proportion relative de signaux protéiques, en comparaison des composés minéraux par exemple, s'avère toutefois moins importante pour les tissus anciens. Dans le cas de l'os médiéval par exemple, l'imagerie a même permis de mettre en évidence une plus grande dégradation du collagène au centre de la coupe, près du canal de Havers, par rapport à la fraction minérale d'hydroxyapatite.

D'autres composés d'intérêt biologique ainsi que des minéraux ont également été détectés. Les lipides, lorsqu'ils étaient présents, étaient le plus souvent sous forme oxydée ou dégradée et le cholestérol comme les phospholipides ne semblaient plus présents contrairement au cas des tissus modernes équivalents. Des phosphates de calcium spécifiques ont également pu être mis en évidence pour la première fois à l'échelle moléculaire, dans le cas de la corne de rhinocéros laineux. Leur phase a pu être caractérisée comme des phosphates d'octacalcium, étayant les hypothèses sur ce tissu encore peu étudié. Enfin, deux types de produits exogènes, liés à l'histoire des tissus étudiés, ont pu être identifiés :

- les composés minéraux de surface, liés au milieu d'enfouissement : aluminosilicates, gypse. Ces identifications ont pu être précisées par analyse élémentaire (MEB-EDX) et diffraction des rayons X. Ces données sont importantes pour mieux comprendre l'évolution de la surface des corps au cours de leur enfouissement ou bien plus récemment durant leur stockage dans les réserves des musées.

- les substances correspondant à la préparation et à la décoration de peaux de momies artificielles. Des feuilles d'or décorant le corps du défunt, des traces du natron desséchant employé par les anciens Egyptiens pour la momification et des baumes ont pu être retrouvés. Dans ce dernier cas, il aurait été intéressant de compléter les analyses par des mesures par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour préciser leur nature à partir d'une détermination plus précise de leur composition moléculaire.

Perspectives

Notre travail illustre ainsi la variété des résultats qu'il est possible d'obtenir en TOF-SIMS ainsi que les avantages particulièrement intéressants qu'offre cette technique en complément des autres techniques d'imagerie chimique, pour l'étude des tissus archéologiques anciens et plus largement des objets du Patrimoine. Nous avons aussi montré l'importance des spectres et des cartes de répartition obtenus en imagerie chimique avec les données résultant d'analyses plus classiques souvent globales, ciblées et/ou destructives. Cette même méthode avait déjà été employée pour l'étude de fragments de peinture ou de patines sur des objets africains par exemple.

Néanmoins, notre travail a également mis en évidence les limites de l'identification chimique des protéines. Comme nous l'avons vu, leur haut degré de fragmentation (malgré l'amélioration apportée par l'utilisation de sources d'ions primaires polyatomiques) rend difficile les distinctions en l'absence de base de données. On peut espérer voir se développer dans l'avenir de nouvelles techniques qui permettront d'aller plus loin dans la compréhension des processus de momification et de dégradation des vestiges biologiques anciens. En ce sens, la réalisation dans un avenir proche d'un instrument SIMS MS/MS permet d'espérer obtenir des informations plus précises sur la fragmentation des polypeptides et des protéines. L'augmentation de la résolution accessible en imagerie MALDI TOF est aussi à suivre, cette méthode d'ionisation restant une technique de choix pour l'analyse des protéines.

Dans le cas de la peau de momie chilienne, l'interprétation des données TOF-SIMS doit être poursuivie, afin de comprendre la composition et la formation de la matière très visqueuse et d'aspect vitreux observée en surface. En particulier, la question de l'origine bactérienne ou chimique de la dégradation du tissu cutané n'a pas pu être tranchée au cours de cette thèse. Une étude plus poussée et en collaboration avec des biochimistes est en cours pour appréhender les mécanismes de transformation à l'œuvre. Les facteurs physico-chimiques ou biologiques les plus influents doivent être identifiés. La réversibilité du processus se pose ici de manière critique et nous espérons que nos recherches pourront, si cela est possible, l'inverser pour permettre la conservation à long terme de ces momies particulièrement anciennes.

Des analyses complémentaires et les développements de méthodes de traitement des données, riches et complexes, recueillies en imagerie chimique sont proposées pour répondre aux nombreuses questions ouvertes soulevées par cette thèse.

- Ainsi, en ce qui concerne la préparation des peaux de momies, on peut se demander si la réhydratation de peaux de momies très sèches pourrait être améliorée en travaillant en atmosphère contrôlée. Ainsi, les peaux de momies les plus sèches et/ou les plus hétérogènes pourraient peut-être être préparées en ultramicrotomie de façon plus satisfaisante. La compatibilité des supports de coupes pour l'analyse combinée multi-techniques en histologie, immunologie et imagerie chimique doit également continuer à être recherchée afin de pouvoir confronter l'ensemble des informations recueillies sur une même coupe.

- En ce qui concerne les échantillons étudiés, nous avons pu avoir accès à des prélèvements précieux particulièrement intéressants et variés. Toutefois des analyses complémentaires pourraient confirmer et compléter les résultats de ce travail. Ainsi, l'analyse d'une corne de rhinocéros moderne permettrait de connaître la phase native des phosphates de calcium présents dans ce tissu et de comprendre leur modification au cours du temps. L'étude de la soie, dont les enjeux ont été évoqués, pourrait également être approfondie afin de répondre aux différentes questions archéologiques et technologiques encore ouvertes : fixation des colorants, dégradation chimique au cours du temps, réalisation ou non d'un décreusage des fibres aux époques anciennes. En ce qui concerne l'étude de la peau, l'approfondissement des analyses effectuées sur des peaux tannées (cuir) commencées au cours de la thèse (non présentées dans ce manuscrit) permettrait de mieux documenter et comprendre la dégradation de peaux protégées par une préparation organique.

Au-delà de l'étude des produits de conservation et de leur mode d'action, liées aux pratiques funéraires, il serait intéressant, à l'avenir, d'exploiter la puissance de l'imagerie chimique (en particulier la sensibilité et la résolution spatiale) pour effectuer des analyses toxicologiques au sein de coupes de cheveux ou de peau et ainsi mieux appréhender certaines pratiques culturelles ou médicales anciennes. Il est peut-être possible de détecter des drogues, des médicaments et des éléments toxiques ingérés durant la vie du défunt. En Amérique du Sud, il est bien connu que certaines substances hallucinogènes étaient employées, mais aussi que les populations des Andes étaient soumises à de nombreuses intoxications aux métaux lourds à cause de leur environnement riche en minerais métalliques et des eaux polluées. Dans le même ordre d'idée, la composition de tatouages, de maquillages de momies et d'onguents protecteurs ainsi que leur pénétration dans les premières couches de la peau pourraient faire l'objet d'études complémentaires. Enfin, si l'on souhaite comprendre de manière plus complète comment évolue la peau au cours du temps, sans préparation du corps, dans différents

environnements (conditions de températures et d'humidité variées), il serait intéressant de pouvoir étudier des peaux conservées dans le permafrost, souvent moins dégradées.

- Du point de vue de la méthode d'analyse et de traitement des données, il serait intéressant de pouvoir améliorer la distinction des protéines entre elles mais aussi la caractérisation de la structure secondaire de celles-ci en TOF-SIMS, comme il est possible de le faire en décomposant les bandes amides en spectroscopies vibrationnelles. Ainsi, il serait intéressant de pouvoir, moyennant une base de données sur les protéines ou un moyen d'identification plus sophistiqué et sensible, identifier les protéines du cheveu autre que la kératine ou celle de l'os autre que le collagène. Pourra-t-on un jour distinguer chimiquement la kératine de structure secondaire en hélices α (présente dans les poils ou la corne des mammifères) de celle de structure secondaire en feuillettes β (dans les écailles ou les plumes des reptiles et des oiseaux) ? L'étape suivante consisterait à distinguer l'espèce animale correspondante à partir de l'étude des protéines du tissu, comme cela fut réalisé sur les tissus accompagnants la momie Ötzi en MALDI-TOF, par combinaison des informations obtenues en MS et MS/MS ainsi que par des calculs de corrélation entre la signature spectrale des protéines digérées issues des fibres anciennes de 5300 ans avec celles issues de références modernes. D'autre part, l'amélioration de la sensibilité, de la haute résolution spatiale et de la préparation de fibres de soie pourrait permettre d'étudier la stratigraphie protéique (séricine et fibroïne) de cette fibre de faible diamètre et ainsi de répondre aux questions citées précédemment.

Le développement actuel des analyses multivariées en TOF-SIMS, en particulier sur les images ioniques après une normalisation appropriée des données, serait une aide précieuse pour déterminer les signaux discriminants des différentes protéines ou différentes structures secondaires au sein d'un même tissu ou dans un corpus d'échantillons. Il est nécessaire, pour cela, de disposer, d'une part, d'ordinateurs suffisamment puissants pour gérer des fichiers de données de plusieurs gigaoctets mais aussi d'assurer la compatibilité des données exportées à partir des logiciels d'imagerie avec ceux permettant les analyses multivariées.

Enfin les recherches actuelles liées au développement des faisceaux d'ions primaires à base d'agrégats lourds, d'argon par exemple, pourraient permettre, à terme, de recueillir des informations sur la composition moléculaire de l'échantillon en trois dimensions. L'analyse de la stratigraphie des matériaux du Patrimoine culturel, et des tissus biologiques en particulier, en profondeur plutôt qu'en coupe transverse, pourrait permettre de s'affranchir des problèmes liés à la réalisation de coupes. Pour préserver

néanmoins la richesse des analyses effectuées, la profondeur pulvérisée devra rester réduite et la sensibilité suffisamment conservée pour la détection de composés présents en petite quantité.

Figures

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1-1 : Structure de la peau humaine et des couches kératinisées de l'épiderme.	6
Figure 1-2 : Schéma de la structure secondaire en feuillet bêta. A titre d'exemple, une liaison hydrogène entre les deux brins plissés de la chaîne est indiquée par des pointillés rouges. Le trait noir matérialise le squelette polypeptidique.	10
Figure 1-3 : Schéma de la section d'un filament de soie Bombyx Mori (d'après Hardy, 2010).	14
Figure 2-1 : Images au microscope optique de coupes histologiques (a-c) de peaux de momies chinoises enrobées dans l'OCT et préparées en cryomicrotomie, colorées (a) à l'H&E, (b) au Trichrome de Masson et (c) au rouge de Nile. Les flèches blanches désignent les gouttelettes lipidiques et la flèche rouge une zone enrichie en lipides. (d) Coupe de fibres de laine moderne colorée au bleu de méthylène.	18
Figure 2-2 : Exemple d'image de microscopie électronique. (a) Image MEB-BSE en mode "pression variable" d'une peau de momie du Pérou. Zoom sur la jonction entre le derme (fibres de collagène à gauche de l'image) et l'épiderme (à droite). (b) Image MET d'une coupe de fil de soie moderne. Tension d'accélération : 80 kV. Grossissement : x2800.	20
Figure 2-3 : Exemple d'analyse élémentaire en MEB-EDX. (a) Image MEB-BSE d'une peau de momie du Pérou sur laquelle est délimitée la zone étudiée et (b) spectre EDX de cette zone.	22
Figure 2-4 : Principe d'émission des ions secondaires.	23
Figure 2-5 : Schéma du dispositif d'analyse TOF-SIMS (d'après http://www.ion-tof.com/).	24
Figure 2-6 : Comparaison des modes haute et basse résolution spatiale. (a-b) Spectres de masse en basse (a) et haute (b) résolution spatiale (peau de momie du Pérou, mode d'ionisation négatif). (c-d) Courants ioniques totaux en basse (c) et haute (d) résolution spatiale (même échantillon en mode d'ionisation négatif). Le carré blanc correspond à la zone bombardée en haute résolution spatiale.	27
Figure 2-7 : Pollutions en TOF-SIMS. (a) Images ioniques correspondants à une pollution liée à la présence de PDMS. Mode d'ionisation positif. (Coupe d'os moderne). (b) Exemple de spectre TOF-SIMS où l'on détecte une pollution de type LABS (os ancien). Mode d'ionisation négatif.	33
Figure 2-8 : Exemple d'images ioniques (en mode d'ionisation positif) : (a) Image ionique totale et (b) image ionique correspondant uniquement à l'ion-fragment $C_4H_8NO^+$ (m/z 86.06).	35
Figure 2-9 : Image ionique résultant de l'addition des fragments de la kératine et du plomb. Puis superposition de ces images : en rouge la kératine et en vert le plomb. La couleur jaune (vert + rouge) indique une colocalisation de la kératine (rouge) et du plomb (vert), au niveau de la partie périphérique du crin de cheval.	37
Figure 2-10 : Préparation des tissus biologiques en ultramicrotomie : inclusion en résine polyester, fraisage et meulage du bloc, coupes en ultramicrotomie à l'aide d'un couteau	44

diamant.

- Figure 2-11** : Exemples de préparation de tissus biologiques pour l'analyse en imagerie TOF-SIMS. (a-d) Inclusion en résine et ultramicrotomie : (a) Bloc d'inclusion contenant la peau de momie Tarapacá et (b) coupe de fils de soie moderne, inclus dans la résine polyester Sody 33, (c) coupe de corne de bœuf moderne avec son cornillon et (d) image MEB en mode BSE de l'épiderme d'une peau de momie égyptienne dorée incluse dans la résine LR-White Medium. (e-f) Enrobage dans l'OCT et cryomicrotomie : (e) coupe de peau de momie égyptienne du site d'Antinoë et (f) coupe de peau de cochon moderne. 47
- Figure 2-12** : Préparation des tissus mous en cryomicrotomie, enrobage dans la colle OCT, solidification et taille du bloc, coupes à l'aide d'un lame de rasoir. Les coupes sont réalisées dans l'enceinte d'un cryomicrotome (photo). 48
- Figure 2-13** : Formules semi-développées de la proline (a) et de l'hydroxyproline (b) 54
- Figure 2-14** : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) d'une référence d'hydroxyproline. 55
- Figure 2-15** : Formule développée de trois acides aminés soufrés : la cystéine (a), la cystine (b) et la lanthionine (c). Leur masse moléculaire est précisée. 56
- Figure 2-16** : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) d'une référence de cystéine. 57
- Figure 2-17** : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) d'une référence de cystine. 59
- Figure 2-18** : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) d'une référence de lanthionine. 60
- Figure 2-19** : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) d'une référence de collagène. 62
- Figure 2-20** : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) d'une référence de kératine. 64
- Figure 2-21** : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) d'une référence de l'insuline. 66
- Figure 2-22** : (a) Photographie des ossements de la main droite. L'échantillon de phalange choisi est indiqué. (b) Photographie sous loupe binoculaire de l'échantillon après sciage et (c) zoom sur la zone de coupe. Les zones internes (endoste) et externe (périoste) de l'os sont indiquées. (d) Photographie sous microscope optique d'une coupe d'os déposée sur wafer de silicium. Grossissement x 10. Le cadre rouge indique la zone analysée en TOF-SIMS. 68
- Figure 2-23** : Schéma représentant la structure de l'os cortical, d'après (Stevens, 1997). 70
- Figure 2-24** : Spectre de l'os en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) ● Ronds rouges : fragments d'hydroxyapatite. ▲ Triangles bleus : ions calcium et hydroxyde de calcium (en positif) et phosphates (en négatif). ■ Carrés verts : fragments protéiques. ◆ Losanges jaunes : ions sodium et potassium (positif) et fluor et chlore (négatif). ■ Carrés magenta : fragments polysaccharides. ▲ Éclairs gris : fragments correspondant à une pollution de type PDMS. 71
- Figure 2-25** : Ostéocalcine : Formule développée de l'acide carboxyglutamique et sa masse moléculaire. 72

Figure 2-26 : Images d'une coupe d'os moderne : répartition spatiale des différents fragments d'acides aminés en mode d'ionisation positif, des fragments de chaîne polypeptidique et de mucopolysaccharides en mode d'ionisation négatif. Les images ont été normalisées par rapport à l'image la plus intense, correspondant au fragment de la proline en mode d'ionisation positif (m/z 70.07) et au fragment CN^- (m/z 26.00) en mode d'ionisation négatif. Taille de l'image TOF-SIMS : $500 \times 500 \mu m^2$.

74

Figure 2-27 : (a) Photographie sous loupe binoculaire de l'os de porc ancien étudié. (b) Photographie sous loupe binoculaire de l'échantillon après sciages. (c) Photographie au microscope optique de l'échantillon après la coupe (d) et zoom sur la pyramide tronquée de coupe. Les flèches indiquent les bords de la pyramide tronquée. (e) Images MEB en mode BSE de l'échantillon. Grossissement $\times 50$. (f) et zoom $\times 350$ sur un ostéon de la zone de coupe. Les flèches rouges indiquent les ostéocytes. Les cercles noirs délimitent un ostéon (trait plein) et son canal de Havers (pointillés).

75

Figure 2-28 : Spectre de l'os ancien en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b) ● Ronds rouges : fragments d'hydroxyapatite. ▲ Triangles bleus : ions calcium et hydroxyde de calcium (en positif) et phosphates (en négatif). ■ Carrés verts : fragments protéiques. ◆ Losanges jaunes : ions sodium et potassium (positif) et fluor et chlore (négatif). ■ Carrés magenta : fragments polysaccharides. ▲ Éclairs gris : fragments correspondant à une pollution de type PDMS.

79

Figure 2-29 : État de dégradation d'un os humain médiéval. (a) Photographie à la loupe binoculaire de l'os étudié et (b) de la section sciée. Chaque graduation de la mire correspond à 1 mm. (c) Image TOF-SIMS de la somme des fragments d'acides aminés (collagène) et d'hydroxyapatite (mode d'ionisation positif). Les images ont été normalisées par rapport à la plus intense. (d) Rapport des images présentées en (c). (e) Rapport des images ioniques correspondant au fluor et aux ions phosphates. Taille des 3 images superposées : $500 \times 500 \mu m^2$ chacune.

80

Chapitre 2

Figure 2-1 : Formule développée et masse moléculaire de la citrulline.

103

Figure 2-2 : Caractérisation structurale de cheveux modernes et anciens. (a) Photographie au microscope optique d'une coupe de cheveux modernes préparés en cryomicrotomie et (b) image ionique TOF-SIMS de l'ion CNO^- en haute résolution spatiale. (c-f) Cheveux anciens : (c) photographie de la tête de la momie Tarapacá © P. Carminati et. (d) Photographie à la loupe binoculaire des cheveux de la momie. (e-f) Images au microscope optique de coupes de cheveux anciens.

105

Figure 2-3 : Analyse TOF-SIMS des cheveux modernes. Spectres en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b).

108

Figure 2-4 : Analyse TOF-SIMS des cheveux modernes. Images ioniques, en mode d'ionisation positif et négatif des protéines, des lipides et des phosphates contenus dans le cheveu et

113

superposition des images correspondant aux ions de la cuticule (rouge), aux acides gras C16-C18 (vert) et à un ion caractéristique de la résine d'inclusion à m/z 121.04 (bleu).

Figure 2-5 : Spectres TOF-SIMS des cheveux anciens en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b). 114

Figure 2-6 : Analyse de crins de cheval. Photographies de la coupe étudiée dans la chambre d'ionisation du SIMS. 115

Figure 2-7 : Analyse de crins de cheval. Superposition d'images en mode d'ionisation positif et négatif. Taille des images : $500 \times 500 \mu\text{m}^2$. 116

Figure 2-8 : Comparaison des structures de la laine et de la soie. Laine (a-d) Photographie à la loupe binoculaire d'un fil (a), vue longitudinale d'un fil au microscope optique (b), vue de fils, en coupe transverse, colorés au bleu de méthylène (c) et vue de la surface du bloc d'inclusion des fils au microscope optique. Soie (e-h). Photographies d'un fil de soie à la loupe binoculaire (e-f), Photographie au microscope optique d'une coupe avec zoom sur les brins (g) et image au MEB, en mode BSE, de brins d'un fil de soie de cocon (h). 119

Figure 2-9 : Comparaison de la laine et de la soie. Images ioniques et superposition correspondants aux choix de la ROI. Mode d'ionisation positif. Taille des images : $500 \times 500 \mu\text{m}^2$. 120

Figure 2-10 : Comparaison de la laine et de la soie. Spectres TOF-SIMS de la laine (en rouge) et de la soie (en bleu), en mode d'ionisation positif et négatif. ◆ Losanges jaunes : ions sodium et potassium (positif). ✚ Croix noires : fragments correspondant à la résine d'inclusion. 121

Figure 3-1 : Schéma, en coupe axiale, d'une corne de bovidé, d'après Krölling (Krölling, 1960). Les principales structures anatomiques sont indiquées. 123

Figure 3-2 : Corne de vache moderne. (a) Photographie de la corne étudiée. Les localisations relatives de l'étui corné et de l'os (cornillon) sont indiquées. (b) Photographie de la tranche du prélèvement. (c) Photographie, sous loupe binoculaire, de sections fraisées dans la tranche. Chaque graduation noire de la mire est espacée d'1 mm. (d-e) Images, au microscope optique, de la zone de transition os/corne et (e) de la coupe déposée sur un wafer de silicium. (f) Image MEB, en mode BSE, de la coupe déposée sur un plot en inox. (g-h) Image au microscope optique de la coupe déposée sur une lame de verre (g) zoom sur la partie os (X10) et (h) sur la partie corne (x20). 125

Figure 3-3 : Analyse de la corne moderne en microspectroscopie infrarouge. (a) Vue sous le microscope de la zone osseuse (b) et de la zone de la corne analysées et (c) Spectres obtenus sur ces deux zones (os en rouge et corne en vert). 127

Figure 3-4 : Analyse TOF-SIMS de la corne moderne en mode d'ionisation positif : (a) Images ioniques globale, de la résine et des zones d'intérêt (ROI) et spectres correspondant à l'échantillon uniquement (résine exclue), extrait de la ROI 1 (cadre jaune), uniquement à l'os (cadre rouge) et à la corne (cadre vert). (b) Comparaison des spectres de la corne (vert) et de l'os (rouge) sur la gamme m/z 1-200. ● Ronds rouges : fragments d'hydroxyapatite. ▲ Triangles bleus : ions calcium et hydroxyde de calcium. ■ Carrés verts : fragments d'acides aminés. ◆ Losanges jaunes : ions sodium et potassium. ✚ Croix noires : fragments correspondant à la résine d'inclusion. □ Carré violet évidé : phosphocholine. ● Ronds violets évidés : cholestérol. 131

- Figure 3-5 :** Images en mode d'ionisation positif de la corne moderne : répartition spatiale des différents fragments d'acides aminés majoritaires dans la corne (kératine) et dans l'os (collagène), des fragments polypeptidiques, de la phosphocholine, de la phase minérale de l'os (calcium et hydroxyapatite) et des espèces soufrés (corne) puis superposition des images ioniques du soufre (vert), du chlore (rouge) et somme des images ioniques des ions fragments du LABS (en bleu). Les images ont été normalisées par rapport à l'image la plus intense. Taille des images TOF-SIMS : 2.2 x 2.2 mm. 134
- Figure 3-6 :** Comparaison des spectres, en mode d'ionisation négatif, de la corne (en vert) et de l'os (en rouge) sur la gamme m/z 1-150. 135
- Figure 3-7 :** (a) Photographie de la corne d'Auroch étudiée. (b) Photographie du prélèvement après abrasion ©Nathalie Gandolfo. (c) Image au microscope optique d'une coupe déposée sur lame de verre, colorée au bleu de méthylène et (d) zoom sur les stries. (e-f) Images au microscope électronique à transmission d'une coupe ultrafine de la corne. Tension d'accélération : 80 kV. (g) Grossissement : x18 000 et (h) grossissement x44 000. 137
- Figure 3-8 :** Analyse TOF-SIMS de la corne ancienne d'Auroch : (a) Images ioniques totales, d'un fragment de la résine d'inclusion et ROI correspondant à la corne uniquement et (b) comparaison des spectres de la corne ancienne (vert foncé) et de la corne moderne (vert clair). (c) Spectre correspondant à la corne d'Auroch (sans résine) et (d) images ioniques correspondant aux fragments soufrés et aux ions phosphates. Les images ont été normalisées par rapport à l'image la plus intense. Taille des images TOF-SIMS : 500 x 500 μm^2 . 140
- Figure 3-9 :** (a) Squelette complet du rhinocéros laineux avec au premier plan la grande corne nasale étudiée et (b) Photographie de la corne étudiée. ©C2RMF, Dominique Bagault. 142
- Figure 3-10 :** (a-b) Photographie de détail de la corne nasale étudiée : (a) extrémité de la corne avec lamellae se détachant et (b) zone creusée laissant apparaître une zone de fibres rouges. © C2RMF, Dominique Bagault. (c) Photographies à la loupe binoculaire de fibres marron et (d-f) photographies au microscope optique de fibres rouges (d) Grossissement : x5. Les flèches rouges indiquent une zone de la fibre dépourvue de dépôt rouge. (e-f) Zoom, grossissement : x10 avec (f) détail des grains de surface. 143
- Figure 3-11 :** Analyse structurale de fibres de la corne : (a-b) Images MEB de la surface de fibres rouges en mode BSE (0.9 mbar) (a) et en mode SE (b). (c-d) Photographies au microscope optique de coupes transverses de fibres marron avec (c) 3 parties de tubules, la matrice intertubulaire et (d) un tubule avec son canal médullaire (pointillés rouges). (e) Image MEB en mode BSE d'un tubule d'une fibre marron (0.7 mbar) et (f-h) spectres EDX correspondants aux zones externe (jaune), interne (bleu) et centrale (rouge). 145
- Figure 3-12 :** Analyses TOF-SIMS de fibres de corne marrons et rouges : (a-b) Images ioniques en haute résolution spatiale des fragments de glycine et proline pour la première coupe de fibre marron analysée (c). Les flèches blanches indiquent les zones de plis. (d-e) Photographies dans la chambre d'ionisation du SIMS du bloc de fibre marron avec matrice intertubulaire (d) et (e) de la coupe de fibre rouge sur une plaque de silicium. 147
- Figure 3-13 :** Analyse TOF-SIMS de fibres de corne de rhinocéros laineux. Images ioniques correspondant aux protéines, aux espèces soufrées et aux phosphates dans des fibres marron 149

et rouge avec zoom en haute résolution spatiale sur une fibre rouge.

Figure 3-14 : Graphique représentant les valeurs du rapport $\text{PO}_3^-/\text{PO}_2^-$ en TOF-SIMS selon la phase des phosphates de calcium, avec les barres d'erreur (en **jaune**) d'après (Chusuei, 1999) et position des rapports calculés dans notre cas pour la corne de rhinocéros (ligne **verte**) et aux os du chapitre 1 (ligne noire pour l'os moderne et **rouge** pour l'os ancien). Les lignes pleines correspondent à la valeur moyenne, les lignes en pointillés délimitent les barres d'erreurs correspondantes. β -TCP : phosphate tricalcique β , HAP : hydroxyapatite, α -TCP : phosphate tricalcique α , OCP : phosphate octocalcique, ACP : phosphate amorphe de calcium, brushite ou phosphate dicalcique hydraté.

151

Figure 3-15 : Analyse en microdiffraction des rayons X. (a) Figure de diffraction d'une fibre marron en capillaire et (b) spectre correspondant à une fibre marron (en noir) et à une fibre rouge (en orange) en capillaire. Sur ces spectres sont identifiés le quartz (en rouge), la silice (en violet), l'albite (en bleu) et l'illite (en bordeaux).

152

Chapitre 3

Figure 1-1 : Préparation de la peau de porc en cryomicrotomie. (a) Échantillon dans le cryomicrotome et (b) zoom sur la fixation à l'aide de la colle O.C.T. (c-e) Coupes obtenues avec (d) zoom sur un follicule pileux et (e) sur les fibres de l'hypoderme et le cartilage.

164

Figure 1-2 : Analyses TOF-SIMS d'une peau de porc : spectres totaux en mode d'ionisation positif et négatif. ■ Carrés verts : fragments protéiques. ◆ Losanges jaunes : ions sodium et potassium (positif) et fluor et chlore (négatif). □ Carrés violets évidés : lipides. ■ Carrés magenta : fragments polysaccharides. ▲ Triangles bleus : ions phosphates (en négatif). ○ Ronds violets évidés : cholestérol.

165

Figure 1-3 : Analyses TOF-SIMS d'une peau de porc : images ioniques correspondant aux principaux fragments d'acides aminés (mode d'ionisation positif), aux composés lipidiques (mode d'ionisation négatif) et superposition des images sommes correspondantes.

166

Figure 1-4 : Analyses TOF-SIMS d'une peau humaine moderne : (a) Images somme correspondant aux principaux fragments d'acides aminés, au cholestérol, aux carboxylates d'acides gras en C16 et C18 et superposition de ces images. (b) Comparaison des spectres extraits des trois couches principales (derme, épiderme, hypoderme), gamme de masse m/z 1-200.

167

Figure 2-1 : Typologie des momies : (a) Momie naturelle égyptienne de l'époque prédynastique dite « Ginger » (b) Momie artificielle égyptienne de l'époque copte, provenant du site d'Antinoë © Pascale Richardin (c) Carte présentant la répartition des principales découvertes de momies naturelles à travers le monde. **Bleu** : momies glacées, **Rouge** : momies des déserts chauds. **Jaune** : momies des tourbières. **Vert** : momies des mines de sel. **Violet** : momies desséchées (cryptes, abris) et (d) Carte présentant la répartition des principales découvertes de momies artificielles. Les cartes ont été réalisées à l'aide de

169

l'application Quickmap. ©Ken Hoetmer, à partir des références suivantes : (Wieczorek, 2010), (Aufderheide, 2003) et (Spindler, 1996).

Figure 2-2 : Photographies à la loupe binoculaire des échantillons du site de Djoumboulak Koum (Taklamakan, Xinjiang, Chine) étudiés. (a-b) Prélèvement de peau de jambe de la momie MD16, (c) fils de laine d'une chemise en toile de laine et (d) cuir (échantillon DK5) © Nathalie Gandolfo. L'écart entre deux graduations de la mire correspond à 1 mm. 191

Figure 2-3 : Préparation de la peau de momie du Taklamakan. (a) Photographie annotée du protocole de réhydratation. (b) Photographie à la loupe binoculaire d'un échantillon de peau de jambe de la momie MD16, (c) de l'échantillon réhydraté après 24h dans l'eau ultrapure et (d) du processus de coupe d'un bloc en ultracryomicrotomie à l'aide d'un couteau de verre. 193

Figure 2-4 : Analyse TOF-SIMS d'une peau de momie du Taklamakan. (a) Photographie au microscope optique d'une coupe d'échantillon inclus dans l'OCT. (b-c) Photo de l'échantillon étudié dans la chambre d'ionisation du TOF-SIMS. Le cadre vert correspond à la zone analysée. Images ioniques et superposition (d) en mode d'ionisation positif et négatif. 194

Figure 2-5 : Momie égyptienne du musée d'Athènes (a) Photographie à la loupe binoculaire du prélèvement et (b) de l'échantillon réhydraté. (c) Photo de la coupe étudiée déposée sur wafer, dans la chambre d'ionisation du TOF-SIMS. (d) Image somme des fragments d'acides aminés majoritaires dans le collagène et (e) Images ioniques correspondant au sodium et à l'ion Na_2OH^+ . 196

Figure 2-6 : Momie égyptienne du musée d'Athènes. Spectre en mode d'ionisation positif correspondant à la zone protéique. Carrés verts : fragments d'acides aminés. Losanges jaunes : ions sodium et potassium. 197

Figure 2-7 : Étude de la momie dorée du musée de Dunkerque. Échantillon non doré (a) Photographie de la tête de la momie © Pascale Richardin. (b) Photographie à la loupe binoculaire de l'échantillon. (c) Photographie au microscope optique d'une coupe et (d) zoom sur les alvéoles. (e-h) Images MEB de la coupe (mode BSE). 199

Figure 2-8 : Étude de la momie dorée du musée de Dunkerque. Échantillon doré (a) Photo, à la loupe binoculaire, de l'échantillon doré et (b) surface du bloc préparé en ultramicrotomie. (c) Image MEB de la surface du bloc et (d) cartographies élémentaires associées (mode BSE, pression partielle 0.8 mbar). 200

Figure 2-9 : Analyse de la momie dorée de Dunkerque. Spectre du baume de momification en mode d'ionisation positif (a) et négatif. 201

Figure 2-10 : Analyse de la momie de Dunkerque. Images ioniques correspondant aux fragments d'acides aminés et au calcium. Superposition et images ioniques correspondant à des fragments protéiques et aux protéines, sulfates, phosphates et soufre. Images TOF-SIMS : $500 \times 500 \mu\text{m}^2$. 203

Figure 2-11 : Analyse de la momie de Dunkerque. Échantillon de peau dorée. Images ioniques correspondant à l'or, en mode d'ionisation négatif et spectre de la ROI correspondante. ♦ Losanges jaunes : chlore. ■ Carrés jaunes évidés : agrégats d'or. ■ Carrés bleus évidés : Chlorures d'or. 204

Figure 2-12 : Photographies de la momie andine étudiée. Vue de face (a), de dos (b), profil 206

droit (c) et profil gauche (d). © Pauline Carminati.

Figure 2-13 : Photographies à la loupe binoculaire des échantillons complexes prélevés sur la momie. (a) Échantillon complexe contenant de la peau apparente et (b) zoom sur la peau. (c) Deuxième échantillon complexe feuilleté recto, prélevé sur le genou, et (d) verso. Les graduations de la mire sont espacées d'1 mm. 207

Figure 2-14 : Analyse en GC-MS. (a) Chromatogramme d'un grain prélevé sur la couche blanche et (b) sur la couche de résine. **Rouge:** acides gras pairs. **Violet :** acides gras impairs. **Rose:** diacides (DIC). **Jaune:** acide déhydroabiétique et acide 7-oxo-déhydroabiétique. **Bleu :** stérols animaux et noir : composé triterpénique de structure dammarane. Les points verts ● indiquent les pics de pollution des phtalates. 210

Figure 2-15 : Stratigraphie et minéraux. (a) Image optique avec carré rouge indiquant la zone analysée en TOF-SIMS, (b-d) Images MEB (BSE) du bloc (a) avec délimitation des couches. Rouge : couche fibreuse, vert : couche compacte médiane, et noir : couche superficielle. Les bords du bloc sont indiqués en pointillés jaunes. (c) Zoom sur la zone de transition et (d) sur les fibres profondes. (e-h) Spectres MEB-EDX et localisation correspondante sur les images électroniques (contour rouge). 211

Figure 2-16 : Analyse TOF-SIMS de la peau de momie andine. Images ioniques des fragments des principaux acides aminés de la peau (mode d'ionisation positif). Images sommes correspondant à la kératine et au collagène et superposition des images sommes du collagène (en rouge), de la kératine (en vert) et du calcium (en bleu). Taille des images : 500x500 μm^2 . 215

Figure 2-17 : Analyse TOF-SIMS de la peau de momie andine. (a) Image somme des acides gras (mode d'ionisation négatif) et (b) spectre extrait de la ROI correspondant comparé à celui extrait de la même zone dans la peau moderne humaine. Taille des images : 500x500 μm^2 . 216

Figure 2-18 : Analyse TOF-SIMS de la peau de momie andine. (a) Images ioniques correspondant aux minéraux (modes d'ionisation positif et négatif). Taille des images : 500x500 μm^2 . (b) Superposition d'images ioniques et somme en haute résolution spatiale : à gauche hydroxyproline (en rouge), leucine (en vert) et calcium (en bleu) en mode positif, et à droite : protéines en rouge et lipides en bleu (mode négatif). Taille des images : 200x200 μm^2 . Résolution : 390 nm. 217

Figure 2-19 : (a) Photographie de la momie étudiée et (b) zoom sur la zone de prélèvement de l'échantillon de peau © Marcela A. Sepulveda Retamal (c-d) Photographies à la loupe binoculaire du prélèvement et (e-f) de l'échantillon étudié. 219

Figure 2-20 : Spectre FTIR de la couche brillante à la surface de la peau de la momie étudiée. 221

Figure 2-21 : Échantillon de peau de momie Chinchorro. Images au microscope optique, au MEB et ioniques totales en TOF-SIMS dans les deux modes de la surface du bloc étudié. Les carrés rouges délimitent les zones étudiées en TOF-SIMS sur les différentes images. 221

Figure 2-22 : Échantillon de peau de momie Chinchorro. Cartographie MEB-EDX des principaux éléments d'intérêt (mode BSE, pression partielle de 0.8 mbar). 222

Figure 2-23 : Analyse de la peau de momie Chinchorro. (a) Image ioniques des fragments d'acides aminés (mode d'ionisation positif), de fragments protéiques et de fragments inconnus colocalisés avec les signaux protéiques (mode d'ionisation négatif). 223

- Figure 2-24** : Analyse de la peau de momie Chinchorro. Images ioniques correspondant aux sulfates, phosphates et polysaccharides ainsi qu'aux minéraux. Taille des images TOF-SIMS : 500 X 500 μm^2 . 225
- Figure 2-25** : Analyse de la peau de momie Chinchorro. Spectre de la ROI correspondant aux protéines, en mode d'ionisation positif. Carrés verts : fragments protéiques. Losanges jaunes : ions sodium et potassium. Croix noires : fragments correspondant à la résine d'inclusion. 226
- Figure 2-26** : Analyse de la peau de momie Chinchorro en IR-ATR. (a) Photographie au microscope optique des grains analysés et (b) comparaison du spectre d'un grain marron (bleu) et de colle de peau moderne (rouge). 227

Tableaux

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1-1 : Comparaison de la composition en acides aminés du collagène de derme bovin (Bowes, 1955), de la kératine issue du cheveu (Akhtar, 1997) et de la fibroïne de soie (Saravanan, 2006). La composition est donnée en % de l'acide aminé dans la séquence de chaque protéine. Les nombres indiqués en gras correspondent aux acides aminés majoritaires dans la séquence, ceux en italique correspondent aux acides aminés caractéristiques de la protéine.	9
Tableau 1-2 : Structures hiérarchiques du collagène de type I (peau, os, tendon), de la kératine du cheveu et de la fibroïne de soie.	12
Tableau 2-1 : Échantillons étudiés et leur mode de préparation.	40
Tableau 2-2 : Comparaison de la composition en acides aminés du collagène de derme bovin, de la kératine issue du cheveu et de l'insuline de pancréas de porc (Rawn, 1990).	61
Tableau 2-3 : Attribution des principaux pics du spectre de la Figure 2 21 a.	67

Chapitre 2

Tableau 1-1 : Comparaison de la composition en acides aminés des kératines de cheveu (Akhtar, 1997b), de corne de bœuf (Ward, 1954) et de plume (Mills, 1999).	102
Tableau 2-1 : Comparaison de la composition en acides aminés des kératines de cheveu (Akhtar, 1997) et de la laine ainsi que de la fibroïne de soie (Saravanan, 2006).	118
Tableau 3-1 : Comparaison de la composition en acides aminés de la kératine de corne de bœuf (Ward, 1954) et de la kératine de corne de rhinocéros (Crewther, 1966).	124

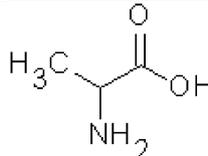
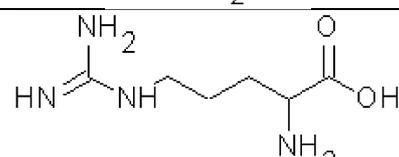
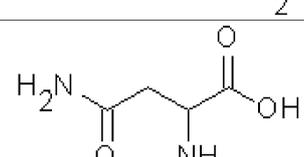
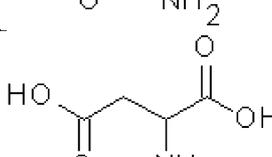
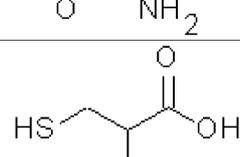
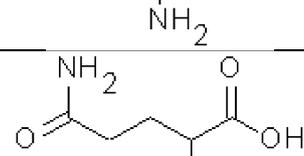
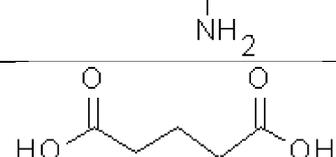
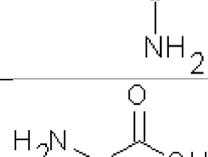
Chapitre 3

Tableau 2-1 : Techniques d'études scientifiques des momies.	181
Tableau 2-2 : Attribution des principaux pics du spectre de la Figure 2 11.	204

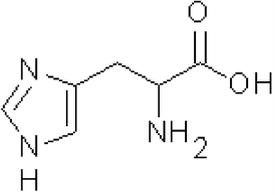
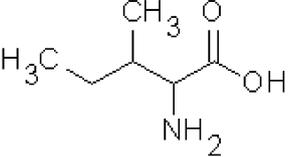
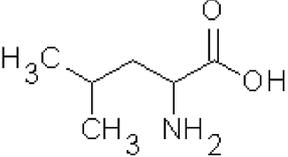
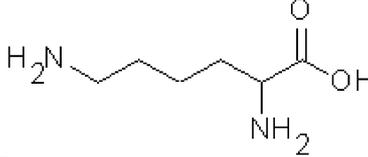
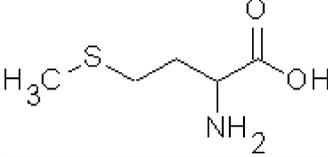
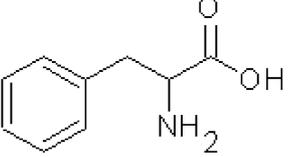
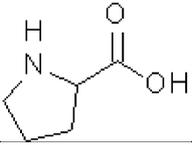
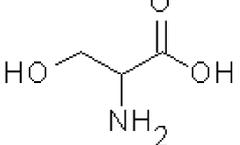
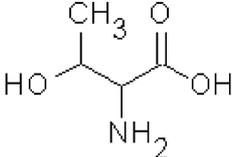
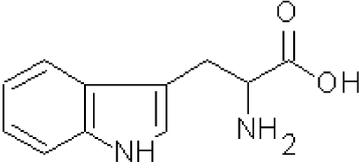
Annexes

Annexe 1

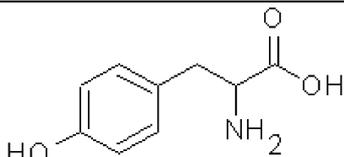
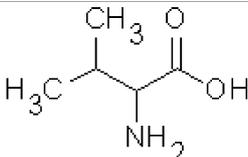
Caractéristiques des acides aminés constituant les protéines des tissus animaux et végétaux.

Nom	Structure	Abréviation	Propriétés	Masse moléculaire (en Da) ¹
Alanine		Ala	Apolaire, aliphatique	89.09
Arginine		Arg	Basique, fonction amine	174.20
Asparagine		Asn	Polaire, fonction amide	132.12
Acide aspartique		Asp	Acide	133.10
Cystéine		Cys	Soufré, Polaire	121.16
Glutamine		Gln	Polaire, fonction amide	146.14
Acide glutamique		Glu	Acide	147.13
Glycine		Gly	Apolaire, aliphatique	75.07

¹ Le symbole Da correspond à une unité de masse, le Dalton. Cette unité ne fait pas partie du système international. Utilisée en biochimie, en hommage à John Dalton (1766-1844), elle correspond exactement à l'unité de masse atomique (symbole : u). Par définition, un atome de ¹²C pèse 12 Da=12 u. Ainsi 1 Da = $\frac{1}{N}$ g où N désigne le nombre d'Avogadro.

Histidine		His	Basique, cyclique	155.15
Isoleucine		Ileu	Apolaire, aliphatique	131.17
Leucine ²		Leu	Apolaire, aliphatique	131.17
Lysine		Lys	Basique, fonction amine	146.19
Méthionine		Met	Apolaire, Soufré	149.21
Phényl- alanine		Phe	Apolaire, cyclique (noyau phénol)	165.19
Proline		Pro	Apolaire, cyclique	115.13
Serine		Ser	Fonction alcool, Polaire	105.09
Thréonine		Thr	Fonction alcool, Polaire	119.12
Tryptophane		Trp	Apolaire, cyclique (noyau indol)	204.23

² Comme l'indiquent leurs formules développées, la leucine et l'isoleucine sont des isomères de position. Malgré leurs propriétés et leurs fonctions biochimiques différentes, ils ont la même masse moléculaire et la même formule brute. Notons en outre, que la leucine est l'acide aminé le plus fréquent dans les séquences de protéines.

Tyrosine		Tyr	Polaire, cyclique (noyau phénol)	181.19
Valine		Val	Apolaire, aliphatique	117.15

Annexe 2

Ions recherchés pour l'analyse
des matériaux biologiques anciens en TOF-SIMS et
références bibliographiques

Composés	Mode d'ionisation positif			Mode d'ionisation négatif		
	fragment	<i>m/z</i>	Référence	fragment	<i>m/z</i>	Référence
HAP	CaPO ₂ ⁺	102.92	Malmberg 2007	Ca ₂ (OH) ₃ ⁻	130.93	Aranyosiova 2011
	Ca ₂ PO ₃ ⁺	158.88		Ca ₂ H ₂ PO ₄ ⁻	176.90	
	Ca ₂ PO ₄ ⁺	174.88		CaP ₂ O ₆ H ⁻	198.89	
	Ca ₃ PO ₅ ⁺	230.83		Ca(PO ₃) ₃ ⁻	276.85	
	Ca ₄ PO ₆ ⁺	286.78		Ca ₄ (PO ₄) ₃ OH ⁻	461.71	
	Ca ₅ PO ₇ ⁺	342.73				
	Ca ₆ PO ₈ ⁺	398.70				
	Ca ₅ P ₃ O ₁₂ ⁺	454.69				
	Ca ₆ P ₃ O ₁₃ ⁺	540.66				
	Ca ₇ P ₃ O ₁₄ ⁺	596.60				
	Ca ₈ P ₃ O ₁₅ ⁺	652.57				
	Ca ₈ P ₃ O ₁₆ ⁺	708.53				
Calcium	Ca ⁺	39.96				
	CaOH ⁺	56.96				
	CaOOH ⁺	112.92				
Phosphates				P ⁻	30.97	Gotliv 2006
				PO ⁻	46.96	
				PO ₂ ⁻	62.96	
				PO ₃ ⁻	78.96	
Minéraux						
Sodium	Na ⁺	22.99				
Magnésium	Mg ⁺	23.98				
Aluminium	Al ⁺	26.98				
Silicium	Si ⁺	27.97				
	SiH ⁺	28.98				
Potassium	K ⁺	38.96				
Manganèse	Mn ⁺	54.94				
Fer	Fe ⁺	55.94				
	FeH ⁺	56.94				
	FeO ⁺	71.93				
Fluor				F ⁻	19.00	Aranyosiova 2011
Fluorure de calcium				CaF ⁻	58.96	
				CaF ₂ ⁻	77.96	
Oxyde de magnésium				MgO ₂ ⁻	55.98	

Chlore				Cl ⁻	34.97	
				³⁷ Cl ⁻	36.97	
Or				Au ⁻	196.96	
				Au ₂ H ⁻	394.91	
				Au ₃ ⁻	590.84	
				Au ₄ ⁻	787.84	
				Au ₅ ⁻	984.84	
Soufre				S ⁻	31.97	Poleunis 2006, Sosnik 2006
				HS ⁻	32.98	
				S ₂ ⁻	63.94	
				S ₃ ⁻	95.91	
Autres espèces soufrées	C ₂ H ₅ S ⁺	61.03		SCH ₂ ⁻	45.99	
	C ₂ H ₄ SN ⁺	74.02		SCN ⁻	57.98	
	C ₂ H ₆ SN ⁺	76.02		C ₂ N ₂ S ⁻	83.87	
Sulfates				SO ₂ ⁻	63.96	
				SO ₃ ⁻	79.96	
				HSO ₃ ⁻	80.96	
				SO ₄ ⁻	95.96	
				HSO ₄ ⁻	96.96	
				H ₂ SO ₄ ⁻	97.96	
				H ₃ SO ₄ ⁻	98.96	
				C ₃ H ₅ SO ⁺	89.01	
				C ₃ H ₅ SO ₂ ⁺	105.00	
				Na ₃ SO ₄ ⁺	164.93	
				KNa ₂ SO ₄	180.90	
Silicates				SiO ₂ ⁻	59.97	Van Ham 2006
				(SiO ₂)OH	76.97	
				(SiO ₂) ₂ O H ⁻	136.93	
				(SiO ₂) ₃ O H ⁻	196.90	
Protéines	Fragments d'acides aminés					
Gly	CH ₄ N ⁺	30.03	Lhoest 2001, Sanni 2002, Wagner 2004	CN ⁻	26.00	Poleunis 2006, Jones 2006, Sosnik 2006, Mazel 2006b
OH-Pro	C ₄ H ₆ N ⁺	68.05	Farre 2011	CNO ⁻	42.00	

Pro	$C_4H_8N^+$	70.07	Lhoest 2001, Sanni 2002, Wagner 2004	C_3N^-	50.00	Mazel 2006b
OH-Pro	$C_4H_8NO^+$	86.06	Gotliv 2006	$C_2N_3^-$	66.00	
Ala	$C_2H_6N^+$	44.05	Lhoest 2001, Sanni 2002, Wagner 2004			
Arg	$C_4H_{10}N_3^+$	100.11	Farre 2011			
Ser	$C_2H_6NO^+$	60.04				
Lys	$C_5H_{10}N^+$	84.10	Lhoest 2001, Sanni 2002, Wagner 2004			
Leu/Ileu	$C_5H_{12}N^+$	86.10				
Val	$C_4H_{10}N^+$	72.10				
Tyr	$C_7H_7O^+$	107.06	Farre 2011			
	$C_8H_{10}NO^+$	136.08				
Asn/Asp	$C_3H_4NO^+$	70.03				
Phe	$C_8H_{10}N^+$	120.08				
His	$C_5H_8N_3^+$	110.10				
Thr	$C_4H_5O^+$	69.09				
Sels	Na_2OH^+	62.98		Jones 2006		
	$CNNa_2^+$	71.98				
	$CNKNa^+$	87.96				
	CNK_2^+	103.94				
Lipides	Acides gras					
C16:0	$[M-H]^-$	255.24	Tahallah 2008			
C18:1	$[M-H]^-$	281.24				
C18:0	$[M-H]^-$	283.24				
OH-C18:0	$[M-H]^-$	297.28				
Oxo-C18:0	$[M-H]^-$	295.26				
OH-C16:0	$[M-H]^-$	269.25				
	Cholestérol			$[M-H]^-$	385.38	Tahallah 2008
	$[M-H_2O]^+$	368.46	Tahallah 2008			
	$[M-H]^+$	385.34				
Fragments	Céramide					
			284.32			Tahallah 2008

Fragments	Phosphocholine			Tahallah 2008
	$C_5H_{12}N^+$	86.13		
	$C_5H_{14}NO^+$	104.12		
	$C_5H_{13}NO_3P^+$	166.07		
	$C_5H_{15}NO_4P^+$	184.10		
Fragments	Sphingomyéline			Tahallah 2008
		158.93		
		198.92		
Fragments	Phosphatidylinositol			Tahallah 2008
		137.03		
		153.05		
Acide malique		$[M-H]^-$	133.05	Piras, 2009
		$[M+Na-2H]^-$	155.10	
		$[M+K-2H]^-$	171.08	
Poly- saccharide		CHO_2^-	45.00	Mazel 2006b
		$C_2H_3O_2^-$	59.02	Mazel 2006b
		$C_3H_3O_2^-$	71.03	Mazel 2006b
		$C_4H_3O_3^-$	99.02	Mazel 2006b
Acides nucléiques				
Cytosine		$C_4H_4N_3O^-$	110.04	Hashimoto 2004
Thymine		$C_5H_5N_2O_2^-$	125.12	Hashimoto 2004
Adénine		$C_5H_4N_5^-$	134.06	Hashimoto 2004
Guanine		$C_5H_4N_5O^-$	150.08	Hashimoto 2004

Pollutions						
PDMS	$(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+$	73.05	Delcorte 2004			
	$\text{C}_5\text{H}_{15}\text{OSi}_2^+$	147.07	Delcorte 2004			
	$\text{C}_5\text{H}_{15}\text{O}_2\text{Si}_3^+$	207.03	Delcorte 2004			
	$\text{C}_7\text{H}_{21}\text{O}_2\text{Si}_3^+$	221.09	Delcorte 2004			
	$\text{C}_7\text{H}_{21}\text{O}_4\text{Si}_4^+$	281.05	Delcorte 2004			
LABS				$\text{C}_8\text{H}_7\text{SO}_3^-$	183.01	Nishikawa,2 003, Mazel 2006b
				$\text{C}_{10}\text{H}_{21}^-$	297.15	Nishikawa 2003, Mazel 2006b
				$\text{C}_{11}\text{H}_{23}^-$	311.17	Nishikawa 2003, Mazel 2006b
				$\text{C}_{12}\text{H}_{25}^-$	325.18	Nishikawa 2003, Mazel 2006b
				$\text{C}_{13}\text{H}_{27}^-$	339.20	Nishikawa 2003, Mazel 2006b

Annexe 3

Fiche signalétique du porc étudié

④

Fiche Abattoir Porc

N° Elevage FR372

Caractéristiques de l'animal

N° National FR372Q42010002 N° Ordre 000268 Race Large White Date Naissance 12/06/2010 Sexe F

Date de Sortie de l'animal 10/01/2011

V viande Commercialisable Oui

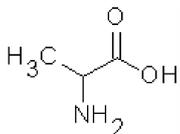
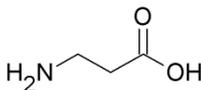
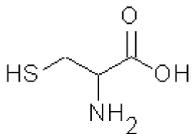
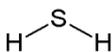
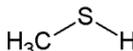
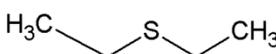
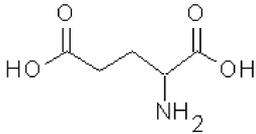
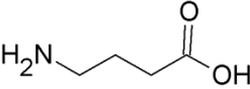
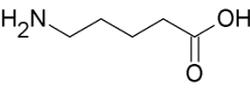
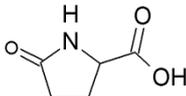
Date Possible de Commercialisation

Les traitements

Produit	Date début traitement	Date fin traitement	Dose	Unité	Délai d'attente	Ordonnance	Commentaire	Protocole
PERIVAL 200	12/06/2010	12/16/2010	1	ml	0	0174465		
RUVAX	15/11/2010	15/11/2010	2	ml	0	0172194		

Annexe 4

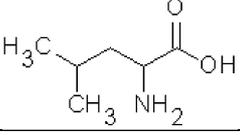
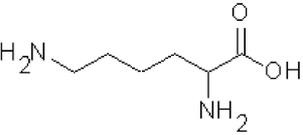
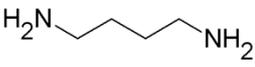
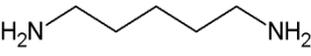
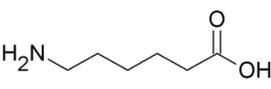
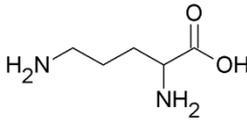
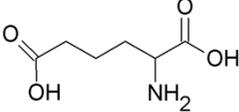
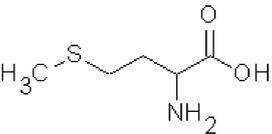
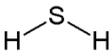
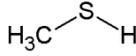
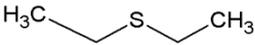
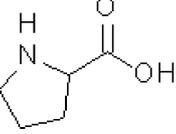
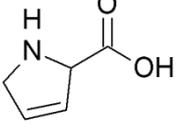
Produits de dégradations connus d'acides aminés standards³

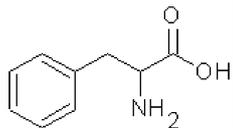
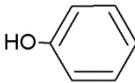
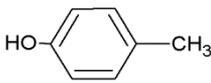
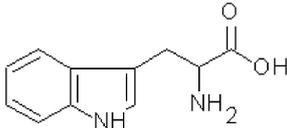
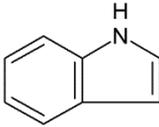
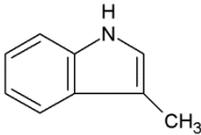
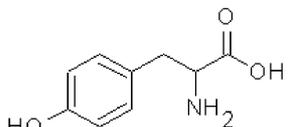
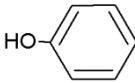
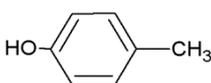
Acide aminé	Structure	Produits de dégradation	Structure	Masse moléculaire (en Da)
Alanine		β-alanine ⁴		89.09
Cystéine		Sulfure d'hydrogène		34.08
		Méthane-thiol		48.11
		Éthyl-sulfure		90.19
Acide glutamique		Acides α- et γ-amino-butérique ⁵		103.12
		Acide δ-amino-valérique		118.15
		Acide pyro-glutamique ⁴		129.11

³ Le tableau a été établi à partir des études de Madea sur la décomposition de corps humains (Madea, 2010)

⁴ Ce produit de dégradation a été mis en évidence lors de l'étude en GC-MS de la dégradation de cuirs anciens (Richardin, 1996) mais n'a pas été, à ce jour, remarqué dans d'autres peaux dégradées.

⁵ Ces produits de dégradation ont également été mis en évidence lors de l'étude en GC-MS de la dégradation de cuirs anciens (Richardin, 1996)

Leucine Isoleucine		Acides gras à chaîne courte		
Lysine		Putrescine		88.15
		Cadavérine		102.18
		Acide 6- amino- héxanoïque		131.17
		Ornithine ⁴		132.16
		Acide α- amino- adipique ⁴		161.16
Méthionine		Sulfure d' hydrogène		34.08
		Méthane- thiol		48.11
		Éthyl- sulfure		90.19
Proline		Déhydro- proline ⁴		114.13

Phénylalanine		Phénol		94.11
		p-crésol		108.14
Tryptophane		Scatol		117.15
		Indole		131.17
Tyrosine		Phénol		94.11
		p-crésol		108.14

Résumé

Parmi les matériaux archéologiques, les restes humains, comme la peau de momie, constituent un héritage précieux et particulier des pratiques funéraires et des modes de vie anciens. Ils donnent également accès à des informations sur la dégradation des tissus biologiques sur des échelles de temps particulièrement longues.

L'imagerie chimique, notamment par spectrométrie de masse TOF-SIMS a été appliquée à l'analyse de ces matériaux hybrides, particulièrement complexes. Complétée par d'autres méthodes d'analyse (MEB-EDX, FT-IR, DRX), cette étude a permis de préciser la structure et la composition de micro-échantillons de peau de momies naturelles ou artificielles. Pour cela, l'étape cruciale de préparation des échantillons a été optimisée.

Afin de comprendre les processus de dégradations, protéiques en particulier, des tissus biologiques, anciens et modernes, de composition proches ont également été analysés (os, cornes, laine, soie, cheveux et poils animaux).

Notre étude a ainsi pu mettre en évidence l'apport de l'imagerie TOF-SIMS pour comprendre les processus de préparation des corps et de dégradation des tissus au cours des siècles.

Mots-clés : Imagerie par spectrométrie de masse, TOF-SIMS, imagerie chimique, tissus biologiques anciens, peau de momie, microtomie.

Abstract

Among archaeological materials, human remains as mummy skin bear precious and specific witness of ancient burial practices and lifestyles. They also give access to informations about degradations processes of biological tissues over a very long time scale.

Chemical imaging, especially using cluster TOF-SIMS imaging, was applied to analyze complex hybrid materials. Using other analytical methods as a complement (SEM-EDX, FT-IR, DRX) this study could precise the structure and composition of human skin microsamples, from artificial and natural mummies. To achieve it, the crucial sample preparation step should be optimized.

To understand the degradation processes, particularly proteic ones, ancient and modern biological tissues of similar composition (bones, horns, wool, silk, hair) were also analyzed.

Our work could thus emphasize the benefit of TOF-SIMS imaging to understand mummification and degradation processes of tissues during centuries.

Keywords : Mass spectrometry imaging, TOF-SIMS, chemical imaging, ancient biological tissues, mummy skin, microtomy.