



HAL
open science

Nouvelles approches par spectrométrie de masse pour la caractérisation de systèmes archéologiques et biologiques : application à l'étude de cheveux de momies préhispaniques de la côte andine

Margaux Fresnais

► To cite this version:

Margaux Fresnais. Nouvelles approches par spectrométrie de masse pour la caractérisation de systèmes archéologiques et biologiques : application à l'étude de cheveux de momies préhispaniques de la côte andine. Chimie analytique. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAF033 . tel-01508533

HAL Id: tel-01508533

<https://theses.hal.science/tel-01508533>

Submitted on 14 Apr 2017

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR 7140

THÈSE présentée par :

Margaux FRESNAIS

soutenue le : 21 septembre 2016

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie / Chimie Analytique

**Nouvelles approches par spectrométrie
de masse pour la caractérisation de
systèmes archéologiques et
biologiques**

**Application à l'étude de cheveux de momies
préhispaniques de la côte andine**

THÈSE dirigée par :

Dr Armelle CHARRIE-DUHAUT

Chargée de recherche, HDR, CNRS

RAPPORTEURS :

Dr Gérard BOLBACH

Rapporteur externe, Université Pierre et Marie Curie

Pr Ludovic BELLOT-GURLET

Rapporteur externe, Université Pierre et Marie Curie

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr Myriam SEEMANN

Présidente du jury, CNRS

Pr Brice APPENZELLER

Examinateur, Luxembourg Institute of Health

À mes parents,

« Il y a des circonstances où je vois clairement l'alliance possible et désirable de la science et de l'art, et où le chimiste et le physicien peuvent prendre place auprès de vous et vous éclairer »

Louis Pasteur

Remerciements

L'ensemble de ces travaux n'aurait pas été réalisable sans les collègues, les collaborateurs et les proches avec qui j'ai pu interagir, et qui m'ont soutenu durant ces trois années de thèse.

Avant tout, je tiens à remercier mes rapporteurs, le Dr Gérard Bolbach et le Pr Ludovic Bellot-Gurlet, ainsi que le Dr Myriam Seemann, Présidente du jury, et le Pr Brice Appenzeller, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche.

Je souhaite tout particulièrement remercier ma directrice de thèse, Armelle Charrié-Duhaut, pour m'avoir encadrée durant ces recherches. Je lui exprime toute mon estime et ma gratitude pour la confiance qu'elle a su m'accorder au cours de ces trois années et pour les connaissances qu'elle m'a transmises. Merci pour sa présence et son soutien au quotidien et en toutes circonstances, merci de m'avoir poussée à toujours chercher plus loin, et merci pour sa patience pendant mes périodes de galères et de maladresses. Enfin, je la remercie d'avoir partagé avec moi sa passion et son engagement pour le domaine extraordinaire qu'est l'archéométrie.

Je tiens également à exprimer mes plus sincères remerciements à Pascale Richardin, ma co-encadrante au Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France, à Paris, pour m'avoir accompagnée depuis le début de ce projet et pour m'avoir accordé sa confiance. Je la remercie pour sa présence, au quotidien pour commencer, puis à distance mais toujours disponible, et merci pour tous ses conseils.

Je souhaite remercier Marcela Sepúlveda, notre collaboratrice chilienne du Laboratoire d'Analyses et de Recherches Archéométriques (Arica, Chili). Je la remercie pour sa confiance, sa disponibilité et ses conseils durant ces trois années. Merci plus particulièrement pour son accueil lors de mon séjour au Chili. Cette opportunité m'a beaucoup apporté dans la compréhension du contexte archéologique du projet.

Merci à toutes les trois. Je ne les remercierai jamais assez de m'avoir offert cette incroyable opportunité de réaliser ma thèse à l'interface entre deux domaines qui me tiennent particulièrement à cœur, la chimie analytique et l'archéologie. Merci infiniment pour ces trois années extraordinairement enrichissantes, tant au niveau scientifique, que personnel.

Au cours de ces trois années, le LSMIS est devenu ma maison. Je souhaite remercier Emmanuelle Leize-Wagner pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je la remercie pour sa confiance, ses enseignements et ses conseils.

J'aimerais aussi remercier Noëlle et Nathalie, pour leur accueil et l'aide qu'elles m'ont apporté lorsque j'en avais besoin. Merci à Hélène pour sa gentillesse, ses conseils et son soutien, et merci à Mélanie, toujours prête à m'aider, pour sa bonne humeur.

Je souhaite plus particulièrement remercier Yannis, pour sa bonne humeur, ses blagues pourries, et l'option « *jukebox* » pour les journées au labo. Nos discussions aux pauses café, les débats enflammés sur Game of Thrones et autres sujets plus ou moins sérieux, et ses moqueries sur l'option « coiffure et tatouages » de ma thèse vont me manquer.

Merci à Stéphanie, pour sa gentillesse, son sourire et son oreille attentive. Sa présence pendant cette dernière année aura été d'un grand soutien.

Un grand merci à toute la bande de lâcheurs qui ont déserté les uns après les autres : Cécile pour nos longues discussions par-dessus l'écran du PC et nos craquages, Marianne pour ses gâteaux et ses chansons, NhaThi pour son dynamisme, Rabah pour les pauses café qui s'éternisent (alors c'est qui le bavard ?) et Michaël, Mr Keratin Free, pour ne pas m'avoir abandonné comme les autres pour ma première semaine et pour tes bonnes idées. Merci pour votre bonne humeur, nos délires et discussions, pour tous ces supers moments partagés, et pour votre soutien et vos conseils.

Enfin merci à Nassur, malgré tout, tu m'auras fait beaucoup rire. Merci à Jérémie, ça aurait été un plaisir de terminer ma thèse avec toi comme co-thésard, je te souhaite beaucoup de réussite pour les trois années à venir. Merci aussi à Aurélien, pour avoir subi mes taquineries sans broncher et merci pour ton aide. Enfin merci à Clothilde et Alice, et aux autres stagiaires qui sont venus au laboratoire depuis le début de ma thèse.

J'ai eu la chance d'avoir une deuxième maison pour ces trois années de thèse, le C2RMF. Je tiens à remercier Michel Menu de m'avoir accueillie au sein du département Recherche.

Je suis extrêmement reconnaissante envers toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide au C2RMF. Merci à Thomas Calligaro pour son aide avec la XRF et le PIXE et pour ses précieux conseils, merci à Eric Laval pour sa formation et son assistance pour le SEM et la XRF. Enfin, merci à l'équipe d'AGLAE+ pour la conduite des analyses PIXE, leurs précieux conseils, leur disponibilité et leur gentillesse : Claire Pacheco, Laurent Pichon, Quentin Lemasson et Brice Moignard.

Je pense aussi aux thésards du C2RMF, Karim, mon co-stagiaire, Victor, Manon, Anita et Anaïs, merci à vous pour ces quelques moments passés ensemble et pour votre accueil à chacun de mes passages.

Je tiens aussi à remercier les membres de l'Université de Tarapacá au Chili et toutes les personnes qui ont rendu ce projet possible en autorisant les prélèvements de cheveux sur les momies des collections du musée universitaire San Miguel de Azapa. Merci à Ivan Muñoz, son directeur, merci à Vivien Standen, chargée des collections d'anthropologie physique, et merci à leurs équipes.

Je remercie Sebastián, pour m'avoir accompagnée sur les sites et pour ses conversations en anglais, et José pour la visite du laboratoire. Merci à Veronica pour son aide et pour les prélèvements de cheveux, et merci à toutes les personnes que j'ai rencontrées à Arica pour leur accueil chaleureux et leur gentillesse malgré la barrière de la langue.

J'aimerais également remercier Philippe Hammann, Lauriane Kuhn et Johanna Chicher de la plateforme de protéomique de l'IBMC. Merci pour toutes ces analyses et pour vos précieux conseils, et toutes vos réponses à mes questions, merci pour votre disponibilité et votre gentillesse.

Je tiens particulièrement à remercier Myriam Maumy-Bertrand de l'IRMA pour avoir accepté de nous aider et de nous accompagner pour la conduite des techniques statistiques. Merci à elle pour ses conseils, sa gentillesse et pour sa disponibilité.

Merci également à Laura Bom, pour son soutien aussi bien technique que moral au cours de ces trois années de thèse. Merci de m'avoir supportée et d'avoir toujours répondu présente à mes appels à l'aide.

Je remercie également Valérie Berl du laboratoire de dermatochimie de l'Université de Strasbourg, pour son aide et pour avoir accepté de nous prêter ses locaux au cours de ces travaux. Merci aux laboratoires de Petra Hellwig et Burkhard Bechinger pour nous avoir donné l'accès à leurs lyophilisateurs.

Enfin, je tiens à remercier l'Association des Membres de l'Ordre des Palmes Académiques du Bas Rhin de m'avoir fait l'honneur de m'accorder un prix d'encouragement qui a permis l'organisation de ma mission au Chili, pour effectuer de nouveaux prélèvements de cheveux. Merci également au réseau CAI-RN de nous avoir accordé une subvention dans le cadre de l'Incitation au Transfert de Compétences

Je n'oublie pas mes amis, thésards et non thésards qui m'ont soutenue au cours de ces trois ans. Merci à Léa (BANANA !), Marie (ça y est ta fille est arrivée au bout !), Blandine, Juliette, Eloyse, Julie, Chloé, Anne-Laure, Sophie, Doriane, Maiwenn, Marie et Franck et tous les autres.

Mais surtout, je remercie infiniment mes parents, Thierry et Marie-Claire. Merci d'être les meilleurs parents au monde et merci de m'avoir permis d'arriver là où je suis aujourd'hui. Merci à ma sœur et à ma filleule, mon petit rayon de soleil. Merci à toute ma famille, et plus particulièrement aux parisiens Fernand et Maryline. Merci de m'avoir accueillie si souvent, merci de m'avoir soutenue, jusqu'aux derniers instants.

Enfin, je remercie Rémi. Merci pour ton amour et ton soutien, pour m'avoir supportée jusqu'au bout, et merci pour ton expertise en MALDI-TOTOFLE.

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	7
Liste des abréviations	11
Introduction générale.....	15
Chapitre A - Introduction bibliographique	21
1. Spectrométrie de masse pour l'étude de systèmes biologiques	24
1.1. Les sources d'ionisation pour l'étude de biomolécules	25
1.2. L'interface du spectromètre de masse	34
1.3. L'analyseur à temps de vol et la séparation des ions avant le détecteur.....	37
1.4. La détection des ions	39
1.5. Approche protéomique et caractérisation des protéines.....	41
2. Couplage TLC-MS : une technique en évolution perpétuelle	49
2.1. Etat de l'art des couplages TLC-MS.....	50
2.2. Développements du couplage direct TLC-MALDI-MS	53
2.3. Applications et enjeux.....	60
3. Connaissance de la fibre capillaire.....	63
3.1. Etat de l'art pour l'étude du protéome de la fibre capillaire	64
3.2. Structure et composition de la fibre capillaire.....	65
3.3. Protéome de la fibre capillaire.....	75
4. Connaissance des civilisations anciennes du désert d'Atacama	83
4.1. Situation géographique, environnementale et économique durant les périodes préhispaniques	84
4.2. Rites funéraires et momies du désert d'Atacama.....	90
4.3. Enjeux de l'étude physico-chimique des cheveux de momies.....	100

Chapitre B - Mise en œuvre expérimentale	105
1. Matériels et précautions spécifiques	108
1.1. Produits chimiques	108
1.2. Matériels.....	108
1.3. Précautions contre les contaminations.....	109
2. Analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF	110
2.1. Préparation des échantillons pour les analyses par spectrométrie de masse MALDI.....	110
2.2. Paramètres d'analyse en MS.....	113
2.3. Traitement des données	115
3. Analyses protéomiques	116
3.1. nanoLC-ESI-QTOF-MS/MS.....	116
3.2. nanoLC-ESI-tripleTOF-MS/MS.....	119
3.3. Recherches dans les bases de données protéomiques.....	120
4. Analyses physico-chimiques	124
4.1. Préparation des échantillons	124
4.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier	125
4.3. Analyses élémentaires	125
 Chapitre C - Approche protéomique pour l'étude de la conservation de cheveux de momies préhispaniques de la côte andine	 129
1. Observations préliminaires des cheveux de momies préhispaniques de la côte andine	132
1.1. Cas des momies des sites archéologiques Playa Miller, Quiani et Camarones	132
1.2. Etude visuelle et structurale	141
1.3. Conclusion	146
2. Développement méthodologique pour l'analyse par spectrométrie de masse d'échantillons archéologiques	147
2.1. Avant-propos	147
2.2. Publication: Characterization of ancient human hair by a proteomic approach.....	149
2.3. Choix de la technique d'analyse.....	163

2.4.	Conclusion	163
3.	Conservation moléculaire des cheveux de momies	166
3.1.	Identification des protéines capillaires de cheveux de momies.....	166
3.2.	Marqueurs moléculaires de dégradation liés au vieillissement	168
3.3.	Conclusion	174
4.	Détection des métaux lourds.....	176
4.1.	Introduction.....	176
4.2.	Analyses préliminaires par microanalyse élémentaire et fluorescence des rayons X.....	177
4.3.	Analyses de traces : Imagerie PIXE et analyse élémentaire par faisceau d'ions.....	183
4.4.	Apports complémentaires de la spectrométrie de masse aux analyses élémentaires	189
4.5.	Conclusions pour les analyses élémentaires.....	195
5.	Conclusions	197
Chapitre D - Etude de systèmes complexes précieux : Développement du couplage TLC-MALDI-		
MS.....		199
1.	Développements méthodologiques.....	202
1.1.	Optimisation du couplage TLC-MALDI-MS en mode « <i>spotting</i> »	202
1.2.	Optimisation du couplage TLC-MALDI-MS en mode « élution »	224
2.	Application à l'étude de systèmes archéologiques	231
2.1.	Matériaux organiques solubles	231
2.2.	Digests de cheveux de momies.....	234
3.	Conclusion et perspectives.....	241
Chapitre E - Traitement, interprétation et gestion des données dans le cadre de projets		
interdisciplinaires		243
1.	Statistiques et interprétation des données de protéomique	246
1.1.	Analyse de la variance pour plans à mesures répétées	247
1.2.	Première application de l'ANCOVA pour l'approche protéomique.....	247
2.	Création d'une base de données archéométrique.....	251
2.1.	Phase d'audit	252

2.2. Développement de la base	256
2.3. Conclusion	262
Conclusion générale et perspectives	263
Références bibliographiques	273
Annexes.....	291
Annexe 1 – Datation par le carbone 14	293
Annexe 2 – Supporting Information for “Characterization of ancient human hair by a proteomic approach”	296
Annexe 3 – Données de reference pour le couplage TLC-MALDI-MS.....	296
Annexe 4 – Publications, communications et prix.....	301
Annexe 5 – Publication dans Forensic Science International (2014)	303
Annexe 6 – Proceedings of the Analytical, Clinical and Forensic Toxicology International Meeting ..	304

Liste des abréviations

ACN : Acétonitrile
ANCOVA : Analyse de la co-variance
ANOVA : Analyse de la variance
BSA : Sérum d'albumine bovin
BSE : Electrons rétrodiffusés
CA : Acide caféique
CAM15 : Site Camarones 15
CI : Ionisation chimique
CID : Dissociation induite par collision
CMC : Complexe cellulaire membranaire
Da : Dalton
DCM : Dichlorométhane
DCO : Désoxycholate de sodium
DHB (2,5-DHB) : Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DIT : 1,8,9-anthracènetriol ou dithranol
DMA : Acide diméthylarsinique
DTT : DL-dithiothréitol
ECD : Dissociation par capture d'électrons
EI : Impact électronique
ESI : Ionisation électrospray
ETD : Dissociation par transfert d'électrons
FA : Acide formique
FDR : Taux de faux positifs
FEG : Canon à effets de champ
FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GC : Chromatographie en phase gazeuse
KAP : Protéine associée aux kératines
KIF : Kératine des filaments intermédiaires
HCCA : Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
HGT : Haute teneur en glycine et tyrosine
HPA (3-HPA) : Acide 3-hydroxypicolinique
HPLC : Chromatographie liquide haute performance
HPTLC : Chromatographie sur couche mince haute performance

HS : Haute teneur en soufre
IAM : Iodoacétamide
IT : Ion Trap
ISD : Fragmentation en source
LA-ICP : Ionisation par torche à plasma couplée à l'ablation laser
LC : Chromatographie liquide
LD : Désorption laser
LDI : Laser désorption/ionisation
LSIMS: Spectrométrie de masse d'ions secondaires en phase liquide
MALDI : Désorption/ionisation laser assistée par une matrice
MCD : Modèle conceptuel de données
MCP : Galette de micro-canaux
MMA : Acide méthylmonoarsonique
MRD : Modèle relationnel de données
MS : Spectrométrie de masse
MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem
MT : métallothionéine
MTLC : Chromatographie sur couche mince de qualité MS
m/z : rapport masse/charge
nanoLC : Chromatographie liquide à nano-débits
NPOE : 2-nitrophényl octyl éther
PC : Phosphatidylcholine
PE : Phosphatidyléthanolamine
PFF : Empreinte des fragments peptidiques
PI : Phosphatidylinositol
PIXE : Spectroscopie d'émission de rayons X induite par particules chargées
PL : Phospholipides
PLM7 : Site Playa Miller 7
PMF : Empreinte peptidique massique
PTM : Modifications post-traductionnelles
QUI7 : Site Quiani 7
SA : Acide sinapique
SDD : Détecteur à dérive au silicium
SDS : Dodécyl sulfate de sodium
SE : Electrons secondaires

SEM : Microscopie électronique à balayage

SEM-EDS : Microscopie électronique à balayage - Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie

SGBD : Système de gestion de la base de données

SM : Sphingomyéline

S/N : rapport signal/bruit

SPE : Extraction sur phase solide

TCA : Acide trichloroacétique

TFA : Acide trifluoroacétique

TLC : Chromatographie sur couche mince

TOF : Temps de vol

Tris-HCL : Hydrochlorure Trizma®

UHS : Très haute teneur en soufre

uma : Unité de masse atomique

XRF : Spectroscopie de fluorescence des rayons X

Introduction générale

L'archéométrie s'est développée dans la deuxième partie du XX^{ème} siècle et constitue un domaine dans lequel collaborent différentes disciplines, dans le but d'apporter des réponses aux problématiques archéologiques. Cette interdisciplinarité apporte ainsi de nouveaux angles de vue et de nouveaux éléments de réponses à ces problématiques, et permet, entre autre, de valider ou non les hypothèses formulées par les archéologues. Les sciences physico-chimiques, plus particulièrement, prennent une part importante dans ce domaine, grâce à l'application de techniques analytiques générant des données précises sur les matériaux étudiés. Les artefacts archéologiques, tels que les objets, outils et textiles anciens, ou encore les restes humains et animaux, constituent des sources d'information extrêmement importantes dans la compréhension des civilisations anciennes et de leur mode de vie, et permettent également de mieux appréhender l'influence de l'environnement sur ces civilisations. L'étude de l'état de conservation de ces biomatériaux anciens peut également servir de modèle, dans le cadre de la compréhension des processus de dégradation des systèmes biologiques modernes, par l'action du temps, des conditions environnementales ou de l'Homme. Pour cela, l'utilisation des techniques d'analyses physico-chimiques a ouvert l'accès à de nombreuses informations, de l'échelle macroscopique jusqu'à l'échelle atomique et ce, aux niveaux visuel¹, structurel^{2,3}, élémentaire^{4,5} ou moléculaire^{6,7}. Compte tenu des altérations anthropiques ou naturelles ayant mené à une complexification de la composition chimique des archéomatériaux⁸, l'obtention d'une caractérisation précise de ces échantillons précieux représente un enjeu majeur, et pose plus particulièrement un certain nombre de difficultés d'un point de vue analytique, qu'il faut surmonter une à une.

Dans ce contexte, les momies ont fait l'objet de nombreuses recherches, dans le but de comprendre les sociétés anciennes, l'origine idéologique des rites funéraires – dans le cas des momies artificielles ou améliorées – ou les recettes de leur conservation exceptionnelle. Pendant longtemps, les os et les dents ont constitué les objets d'études principaux dans le cadre de recherches anthropologiques⁹⁻¹², isotopiques¹³⁻¹⁵, ou génétiques¹⁶. L'utilisation de ces biomatériaux requiert cependant le plus souvent un échantillonnage invasif, problème crucial dans l'étude d'échantillons précieux.

Ces dernières décennies, l'utilisation des cheveux archéologiques en tant que matériaux d'étude a été largement acceptée par les chercheurs, donnant accès à des informations similaires, voire complémentaires, à l'analyse des os et des dents. Les cheveux constituent en effet un biomatériau robuste, ainsi qu'un indicateur biologique et environnemental puissant^{17,18} et ils peuvent être très bien conservés à travers les siècles, grâce à des conditions environnementales extrêmes (aridité, chaleur, anoxie, etc.). Ils représentent donc un matériau de choix en archéométrie pour répondre à de nombreux questionnements concernant les civilisations anciennes et leur environnement, sans compromettre l'intégrité des restes humains considérés. En effet, extraire les protéines capillaires – molécules cibles dans la majorité des travaux de recherche et représentant entre 80 et 90 % de la

masse du cheveu – demande un échantillonnage nettement moins invasif que pour les analyses d'os ou de dents. Grâce aux analyses des cheveux archéologiques, il est ainsi possible de dater des restes humains¹⁹, d'obtenir des indices sur les rituels culturels anciens – rites funéraires par exemple^{9,20} – mais aussi sur le régime alimentaire^{21,22} ou la santé^{5,23} des peuples étudiés.

Les travaux actuels de caractérisation des cheveux archéologiques sont pour la plupart basés sur des analyses élémentaires (spectrométrie de masse à torche à plasma couplée à l'ablation laser – LA-ICP-MS, spectroscopies de fluorescence des rayons X – XRF – et par émission de rayons X induite par particules chargées – PIXE), structurales (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et diffraction des rayons X) et biologiques^{5,23-28}. Peu de projets s'intéressent à l'étude moléculaire des protéines des cheveux anciens, et plus particulièrement à leur état de conservation.

Les protéines capillaires – principalement les kératines – constituent la cible principale ou le support de ces différentes approches. S'assurer de leur bonne conservation à un niveau moléculaire est donc un enjeu primordial, puisque de celle-ci dépendront, non seulement la stratégie analytique à adopter, mais aussi la fiabilité des résultats d'analyse. De plus, caractériser l'état de conservation moléculaire des archéomatériaux peut apporter une aide précieuse à leur préservation, d'une part, en aidant à mettre en place des protocoles de conservation et de restauration adaptés. D'autre part, la conduite d'une étude moléculaire comparative, en amont et en aval de ces techniques, permet de s'intéresser aux effets des techniques d'analyse, dites non-destructives, sur les molécules de l'échantillon. Enfin, l'analyse des cheveux archéologiques offre la possibilité d'étudier les processus de dégradation pouvant intervenir sur les fibres capillaires modernes, ainsi que l'influence de l'environnement sur la fibre et sa conservation moléculaire.

La recherche actuelle pour l'étude des archéomatériaux s'attache à optimiser les protocoles de préparation d'échantillon, afin de limiter le caractère invasif des prélèvements et de préserver au mieux l'intégrité des biomatériaux étudiés, rares et précieux par nature. Il s'agit également de développer de nouvelles techniques analytiques permettant d'obtenir un maximum d'informations, et le plus précisément possible, à partir d'une quantité minimale de matériau, tout en tenant compte des altérations anthropiques ou naturelles, qui ont rendu la composition chimique extrêmement hétérogène⁸. Cette complexité fait de ces études un véritable challenge analytique.

Les derniers développements dans les domaines des techniques séparatives et de la spectrométrie de masse ont donné accès à de meilleures performances analytiques, en termes de sensibilité, de résolution ou encore de précision de masse. Ces nouvelles techniques ont ainsi conduit à l'obtention de données expérimentales massives, à partir de faibles quantités d'analyte, permettant une caractérisation poussée des échantillons d'intérêt. Les techniques d'analyse par spectrométrie masse constituent par conséquent un moyen plus qu'approprié pour l'étude et la caractérisation des

systèmes archéologiques et biologiques, quelle que soit la gamme de masse ciblée, des molécules de faible poids moléculaire ($m/z < 5\ 000$) aux protéines de plus de 20 kDa.

L'enjeu de ces travaux de recherche était donc de mettre en place une approche interdisciplinaire, adaptée à l'étude de faibles quantités d'archéomatériaux biologiques et organiques et basée sur ces techniques d'analyse par spectrométrie de masse. Dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Interactions et des Systèmes (LSMIS, Strasbourg), le Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France (C2RMF, Paris) et le Laboratoire d'Analyses et de Recherches Archéométriques (LAIA, Arica, Chili), ces développements ont été appliqués à la caractérisation de cheveux de momies préhispaniques de la côte andine.

Dans un premier temps, le travail de recherche a été focalisé sur la mise en place d'une approche protéomique, en optimisant le protocole de préparation des cheveux, ainsi que le processus de traitement bioinformatique des données de spectrométrie de masse et ce, afin de vérifier que les protéines de cheveux archéologiques sont toujours identifiables. Dans l'affirmative, il s'agissait d'aller plus loin dans leur caractérisation, grâce à l'étude des modifications post-traductionnelles (PTMs), dans le but d'avoir un aperçu de l'état de conservation des fibres capillaires et de leur protéines majoritaires – les kératines. Parallèlement, le projet a été axé sur le développement et la mise en place du couplage direct chromatographie sur couche mince – spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser assistée par une matrice (TLC-MALDI-MS), pour l'étude de systèmes complexes et précieux, tels que les archéomatériaux organiques et biologiques. Cette stratégie permet, sur de faibles quantités de matériau, d'introduire une technique séparative directement sur le support d'analyse par spectrométrie de masse MALDI, donnant ainsi accès à une large gamme de composés, des lipides aux protéines, en passant par les peptides. Il a ainsi fallu résoudre pas à pas les problèmes rencontrés au cours du développement.

Enfin, des axes de réflexion quant au traitement et à l'interprétation des données générées dans le cadre de projets interdisciplinaires seront abordés. Pour cela, une étude statistique est actuellement en cours de développement, afin de favoriser l'interprétation des données protéomiques des cheveux de momies, en intégrant les paramètres archéologiques d'intérêt (site d'origine, époque, type de momification, etc.). De même, une base de données archéométrique, interne au groupe de recherche, a également été mise en place, pour faciliter la gestion, l'organisation, la mise à disposition et l'interprétation des données expérimentales.

Ce manuscrit se divise en cinq chapitres :

- Le **Chapitre A** présente une **introduction bibliographique** concernant les différents aspects des travaux de recherche, à savoir les techniques de spectrométrie de masse et de chromatographie utilisées au cours de ce travail et leurs apports à l'étude des systèmes

biologiques, ainsi que les aspects relatifs à la connaissance de la fibre capillaires et des civilisations anciennes de la côte andine.

- Le **Chapitre B** décrit la **mise en œuvre expérimentale** des différents travaux présentés, et plus particulièrement, les différents protocoles de préparation des échantillons, les méthodes analytiques utilisées et les différents traitements de données effectués.
- Le **Chapitre C** présente la mise en place d'une **approche protéomique pour l'étude de la conservation de cheveux de momies préhispaniques de la côte andine** et l'intégration de cette étude dans une approche interdisciplinaire, combinant les données archéologiques, la spectrométrie de masse, la datation et les analyses structurales et élémentaires.
- Le **Chapitre D** présente le **développement du couplage TLC-MALDI-MS pour l'étude de systèmes complexes précieux**. Dans ce chapitre, sont détaillées les différentes étapes de la mise en place du couplage au laboratoire et son application à deux échantillons archéologiques, pour l'analyse des composés organiques solubles d'une part, et celle des digests de cheveux d'autre part.
- Le **Chapitre E** est dévolu à la problématique **du traitement, de l'interprétation et de la gestion des données dans le cadre des projets interdisciplinaires**. Cet aspect a été abordé à travers la mise en place d'un modèle statistique, pour l'interprétation interdisciplinaire des données générées par les analyses protéomiques des cheveux anciens, ainsi que la création d'une base de données archéométrique pour la gestion de ces « *Big Data* ».

Chapitre A

-

Introduction bibliographique

Ce premier chapitre s'attache à décrire les connaissances existantes utiles à la compréhension de ces travaux de recherche. Ainsi, les différents aspects relatifs aux techniques de spectrométrie de masse et de chromatographie mises en œuvre seront abordés, ainsi que les aspects relatifs à la caractérisation des cheveux et à la compréhension du contexte archéologique de ces travaux.

Cette introduction bibliographique se divise donc en quatre parties :

1. Spectrométrie de masse pour l'étude de systèmes biologiques
2. Couplage chromatographie sur couche mince – spectrométrie de masse (TLC-MS, *Thin Layer Chromatography - Mass Spectrometry*) : une technique en évolution perpétuelle
3. Connaissance de la fibre capillaire
4. Connaissance des civilisations anciennes du désert d'Atacama

1. Spectrométrie de masse pour l'étude de systèmes biologiques

La spectrométrie de masse (*MS, Mass Spectrometry*) permet la détection, l'identification et parfois la quantification des molécules composant un échantillon, grâce à leur ionisation puis à la séparation des ions générés en phase gazeuse selon leur rapport masse/charge (m/z). Depuis la création du premier spectromètre de masse au début du XX^{ème} siècle par Thompson, la MS s'est considérablement développée permettant d'atteindre des performances toujours plus avancées en termes de sensibilité – de l'ordre de la femto mole, de précision de masse – inférieure à 0,01 unité de masse atomique (uma), ou de résolution – jusqu'à 1 000 000 actuellement. Il est aujourd'hui possible d'analyser une très large gamme de composés, de l'élément seul aux grosses biomolécules d'environ 2 MDa, et d'obtenir dans certains cas des informations sur la structure des molécules d'intérêt.

Le spectromètre de masse est divisé en quatre parties (Figure A.1) permettant l'obtention d'un spectre de masse à partir d'un échantillon liquide, solide ou gazeux²⁹.

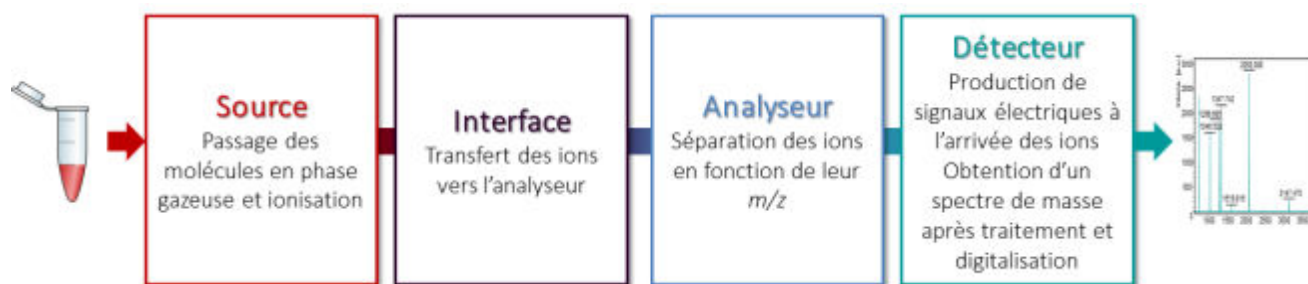


Figure A. 1 – Schéma des composantes d'un spectromètre de masse permettant l'obtention d'un spectre de masse à partir de l'échantillon étudié.

La MS s'est imposée, ces dernières décennies, comme une technique analytique idéale pour l'étude d'échantillons très variés, du composé pur à l'échantillon complexe, à l'image des systèmes biologiques. Pour cela, de nouvelles stratégies analytiques ont été développées pour l'étude des biomolécules comme les protéines, ainsi que des spectromètres de masse équipés de différentes sources et analyseurs, possédant leurs propres performances pour des applications bien précises. Dans cette partie, nous ne présenterons que les composantes des spectromètres de masse adaptées à l'étude des biomolécules, ainsi que les stratégies d'analyse des protéines en spectrométrie de masse utilisées dans le cadre des travaux de thèse.

1.1. Les sources d'ionisation pour l'étude de biomolécules

Les sources d'ionisations permettent la volatilisation et l'ionisation en phase gazeuse des composés analysés. Différentes sources existent donnant accès à divers types d'ionisation, de l'ionisation douce permettant la conservation du précurseur moléculaire, à l'ionisation dure donnant accès à des fragments de celui-ci. Ainsi, le choix de la source est particulièrement important selon l'application souhaitée et s'appuie sur différents critères, tels que la volatilité, la thermosensibilité et la taille des analytes, la quantité de produit à injecter et le mode d'injection souhaité – infusion ou couplage avec une méthode séparative. Dans cette partie, seules les sources de désorption/ionisation laser assistée par une matrice et l'ionisation par électrospray seront détaillées.

1.1.1. Source de désorption/ionisation laser assistée par une matrice

La spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser assistée par une matrice (MALDI-MS, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry*) s'est démocratisée il y a une trentaine d'années suite aux travaux de l'équipe de Karas et Hillenkamp démontrant qu'il est possible de détecter les molécules d'un échantillon après irradiation par un faisceau laser, si celui-ci est mélangé à des molécules comportant des groupements aromatiques et absorbant à la longueur d'onde du laser³⁰. Ces travaux, ainsi que ceux de l'équipe de Tanaka, mettent en avant l'utilisation de la source MALDI pour l'analyse de composés non-volatils pouvant aller jusqu'à 100 kDa³¹⁻³³. Son mode d'ionisation douce permettant de conserver les interactions moléculaires non covalentes et la possibilité d'analyser une large gamme de composés ont fait de la spectrométrie de masse MALDI l'une des techniques les plus adaptées pour l'étude des biomolécules.

Compte tenu de la complexité de nos échantillons pouvant être composés de lipides, de peptides et protéines dégradées ou encore de protéines intactes, une partie des analyses de ces travaux de thèse ont donc été réalisées sur un spectromètre de masse équipé d'une source MALDI.

En spectrométrie de masse MALDI, l'échantillon est co-cristallisé avec une solution de matrice saturée sur une cible, la plus classique utilisée étant en acier inoxydable, métal conducteur chimiquement inerte. L'ionisation des molécules d'intérêt repose sur l'utilisation de cette matrice comportant des groupes aromatiques et absorbant à la longueur d'onde du laser, ce qui permet de transférer l'énergie d'irradiation du laser à l'échantillon pour former des ions monochargés. Les mécanismes conduisant à cette ionisation restent aujourd'hui assez mal connus du fait de la diversité des paramètres impliqués – matrice utilisée, longueur d'onde du laser, puissance du laser, solvant utilisé, etc. – cependant certains travaux de recherche permettent une compréhension globale du processus³⁴. Le tir laser sur le dépôt provoque la désorption rapide des molécules de matrices et des

analytes dans un « panache » composé de molécules isolées et de clusters de taille plus ou moins importante selon la puissance du laser appliquée. Sur le dépôt au niveau du tir laser et dans le « panache », des réactions primaires d'ionisation ont lieu et les ions formés sont ensuite soumis à de nombreuses collisions avant leur sortie de la source. Les ions primaires subissent ainsi des réactions secondaires d'ionisation conduisant aux ions qui seront finalement accélérés, grâce à l'application d'une différence de potentiel entre la cible et les lentilles électrostatiques à l'entrée de l'analyseur, puis transférés dans celui-ci (Figure A.2). Les processus développés ici concernent plus particulièrement la formation des ions observés en mode d'ionisation positif, mode d'ionisation majoritairement utilisé dans ce travail de thèse.

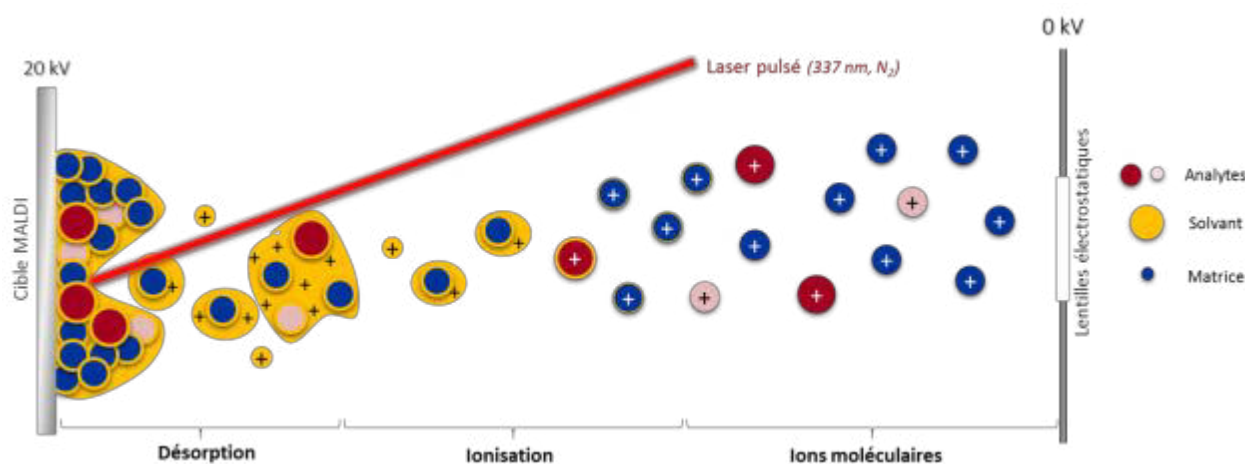


Figure A. 2 – Principe schématisé de la désorption/ionisation des molécules dans la source MALDI.

▣ Processus de formation des ions primaires

Ce processus est très complexe et ne se limite probablement pas à un seul mécanisme, mais à plusieurs plus ou moins prépondérants selon les paramètres de l'analyse. Globalement, ces mécanismes s'appuient sur l'éjection des molécules de matrice et d'analyte dans la phase gazeuse lors du tir laser, créant ainsi un gaz très dense qui prendra la forme d'un panache, plus communément nommé « *plume* ». Les hypothèses concernant ces mécanismes sont encore aujourd'hui controversées.

Parmi les hypothèses les plus développées, 2 modèles pouvant cohabiter semblent aujourd'hui être les plus cohérents. Le premier est le modèle des centres multiples, aussi appelé « *pooling model* », qui combine un processus de photo-excitation, impliquant le transfert de photons aux molécules de matrice lors de l'irradiation laser, suivi d'une mise en commun des énergies de deux ou plusieurs molécules de matrice excitées. L'énergie mise en commun peut ainsi être, soit redistribuée aux molécules de l'analyte pour former un radical cation $M^{+\bullet}$, soit induire la fragmentation des cristaux de matrice. La mise en commun de ces énergies est possible notamment grâce à la proximité des

molécules dans le dépôt cristallisé ou dans les clusters du « panache » formé par le tir laser. Ce processus est supposé être la première étape d'un certain nombre de réactions secondaires de formation des ions observés³⁵.

Le second, le modèle du « *lucky survivor* »^{34,36}, met en avant l'existence d'ions préformés dans l'échantillon déposé – soit déjà présents dans l'échantillon, soit induits par l'acide fort ajouté au mélange matrice/échantillon – qui sont encapsulés dans le dépôt cristallisé et libérés dans les clusters formés par le tir laser.

▣ Processus d'ionisation secondaire

Les réactions de formation d'ions secondaires sont quant à elles beaucoup mieux étudiées. Ainsi, les ions primaires seraient soumis, avant leur extraction de la source, à des transferts en phase gazeuse de protons (H^+) ou de cations (C^+) – notamment Na^+ et K^+ issus d'impuretés³⁵, à des transferts d'électrons entre les molécules d'analyte et de matrice, et à des déprotonations afin de compenser les charges acquises lors du transfert d'un cation multichargé ou de plusieurs cations monochargés. Les ions accélérés et transférés à l'analyseur seront finalement monochargés de la forme $[M+H]^+$, $[M+C]^+$, $[M+C^{y+}-(y-1)H]^+$ ou $[M+yC-(y-1)H]^+$ dans le cas du mode d'ionisation positif.

▣ Dépôt de l'échantillon et performances de l'analyse

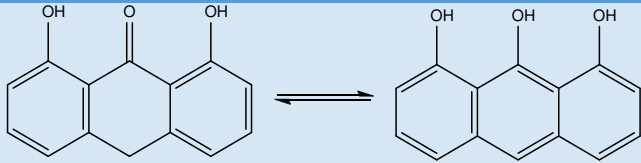
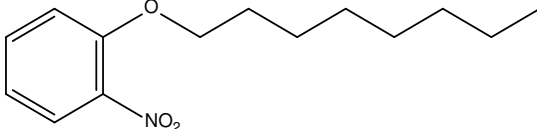
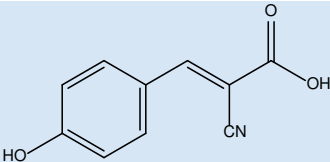
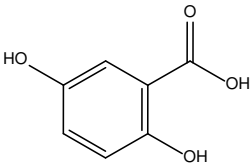
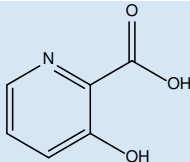
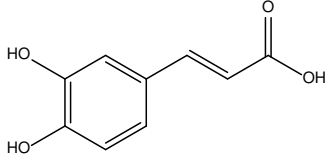
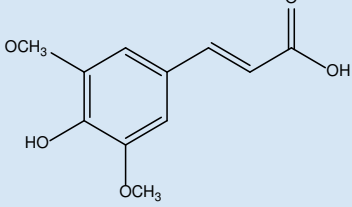
Comme expliqué précédemment, l'échantillon d'intérêt est préalablement co-cristallisé en présence d'un excès de matrice (rapport molaire d'environ 1:10 000) sur une cible en acier inoxydable. Pour favoriser l'ionisation, le dépôt peut nécessiter l'ajout d'une petite quantité d'un agent de cationisation, généralement 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA, *Trifluoroacetic acid*). Différents modes de dépôts existent :

- i) Le dépôt en goutte séchée : l'échantillon solubilisé est mélangé en proportions 1:1 (v/v) avec une solution de matrice saturée préparée dans le même solvant, puis le mélange est déposé sur la cible. La goutte sèche alors à l'air ambiant pour obtenir une co-cristallisation des analytes et de la matrice.
- ii) Le dépôt en couche mince : la solution de matrice saturée dans l'acétone est tout d'abord déposée sur la cible puis séchée à l'air ambiant pour obtenir sa cristallisation. L'échantillon solubilisé est ensuite déposé sur le spot de matrice cristallisée puis séché à l'air ambiant jusqu'à obtention de cristaux incorporés dans les couches supérieures de la matrice. Ce type de dépôt est supposé apporter une meilleure résolution et sensibilité de l'analyse MS, grâce notamment à l'obtention de cristaux d'analytes plus homogènes.

iii) Le dépôt en sandwich : celui-ci est similaire au dépôt en couche mince, mais comporte une couche supplémentaire formée par un nouveau dépôt de matrice saturée dans un solvant adapté aux analytes étudiés.

La qualité du dépôt est extrêmement importante en MALDI-MS puisque de celle-ci dépend la sensibilité et la résolution de l'analyse. Ainsi, si le type de dépôt joue un rôle important, le ou les solvants choisis, ainsi que le mode de séchage du dépôt sont également des facteurs déterminants³⁶. De manière générale, le solvant choisi doit pouvoir s'évaporer rapidement à l'air libre afin de favoriser la formation de petits cristaux répartis de manière homogène sur le dépôt.

Tableau A. 1 – Exemples de matrices MALDI utilisées dans le cas d'appareils équipés d'un laser à azote émettant à 337 nm.^{36,37}

Matrice	Structure	Application
1,8,9-anthracènetriol ou Dithranol (DIT)		Peptides, carbohydrates, polymères
2-nitrophényl octyléther (NPOE)		Polymères synthétiques
Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA)		Peptides, fragmentation
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB)		Protéines, peptides, carbohydrates, polymères synthétiques
Acide 3-hydroxypiccolinique (3-HPA)		Acides nucléiques
Acide caféique (CA)		Protéines, peptides
Acide sinapique (SA)		Protéines, peptides

Egalement, le choix d'une matrice adaptée à l'échantillon considéré et aux problématiques posées est crucial pour obtenir des performances d'analyses optimales – matrice choisie, état physique de la matrice : solide, liquide ou biphasique³⁸. Une matrice adaptée doit notamment posséder certaines propriétés primordiales, telles que :

- i) la capacité d'absorber à la longueur d'onde du laser – dans notre cas, un laser à azote émettant à 337 nm,
- ii) posséder une faible masse moléculaire afin de faciliter sa vaporisation et celle de l'échantillon dans la source,
- iii) présenter une acidité suffisante, i.e. comporter un nombre de protons labiles suffisants, pour le processus d'ionisation des analytes,
- iv) être soluble dans les solvants de solubilisation de l'échantillon,
- v) former un solide non-covalent afin de permettre la désorption des analytes.

Le Tableau A.1 donne un aperçu des matrices communément utilisées pour différentes applications sur un spectromètre de masse MALDI-TOF équipé d'un laser à azote émettant à 337 nm.

La MALDI-MS présente aussi l'avantage non négligeable d'être très tolérant face à la présence de sels et détergents, contrairement à d'autres techniques à l'image de l'ESI-MS. Cependant, lorsque présents en quantités trop importantes dans certains protocoles de protéomique, ceux-ci peuvent empêcher ou limiter les performances de l'analyse. Par exemple, la présence de concentrations importantes en dodécylsulfate de sodium (SDS, *Sodium Dodecyl Sulfate*) – détergent fréquemment utilisé en biochimie pour la dénaturation des protéines – formera une couche polymérique facilement ionisable en surface du dépôt, ce qui induira une compétition et une baisse de sensibilité pour la détection des composés d'intérêt. De même, une concentration élevée en urée – agent chaotropique utilisé pour l'extraction de protéines – produira une couche cristallisée de sels extrêmement difficile à ioniser et empêchant le laser d'atteindre les molécules d'intérêt ou la matrice de jouer son rôle. Lorsqu'il n'est pas possible de réaliser un dessalage de l'échantillon ou un changement de tampon en amont de l'analyse MALDI, une étape de dessalage sur cible (Figure A.3) peut malgré tout être réalisée sur un dépôt goutte séchée ou couche mince. Cette méthode permet l'élimination rapide des sels, grâce au dépôt d'une goutte d'eau acidifiée laissant les molécules d'intérêt sur la cible, co-cristallisées avec la matrice, et facilite ainsi l'obtention d'un spectre de masse.

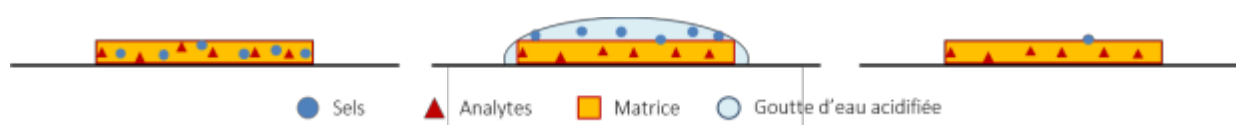


Figure A. 3 – Principe du dessalage sur cible pour l'élimination de sels et détergents en amont de l'analyse MALDI-TOF-MS.

L'ionisation MALDI est une technique très répandue pour l'étude de molécules biologiques, mais son application reste délicate afin d'optimiser au mieux les conditions de dépôt de l'échantillon et d'atteindre des performances d'analyses optimales. De plus, les couplages directs avec des techniques chromatographiques, telles que la chromatographie liquide (LC, *Liquid Chromatography*) ou gazeuse (GC, *Gas Chromatography*), restent difficiles à mettre en place dans le cadre d'analyse d'échantillons complexes. Ce sujet sera abordé par la suite.

1.1.2. La source d'ionisation par électrospray

L'ionisation par électrospray (ESI, *Electrospray Ionization*) ou électronébulisation est extrêmement répandue en spectrométrie de masse pour diverses applications, et notamment pour les recherches menées en protéomique. Les prémices de cette source ont été développés par Malcolm Dole³⁹, dans le but d'analyser des solutions de polymères *via* la production en phase gazeuse d'un faisceau de macro-ions, détectés à l'aide d'une cage de Faraday. Une vingtaine d'années plus tard, l'équipe de John Fenn⁴⁰⁻⁴² développe le concept de Dole et démontre l'efficacité d'une source d'ionisation douce par électrospray pour l'analyse de macromolécules biologiques, travail récompensé par le prix Nobel de chimie en 2002. Depuis ces premiers développements, la source ESI a été largement adoptée par les scientifiques. Son mode d'ionisation douce permet la conservation des molécules sans fragmentation et sa capacité à générer des ions multichargés permet d'analyser des composés de haut poids moléculaire, et ce malgré une gamme limitée de m/z . Ainsi, ce type d'ionisation est adapté à l'étude d'une grande variété de composés parmi lesquels les composés polaires, non-volatiles ou thermosensibles, et plus particulièrement à l'étude de molécules biologiques à l'image des protéines et des peptides.

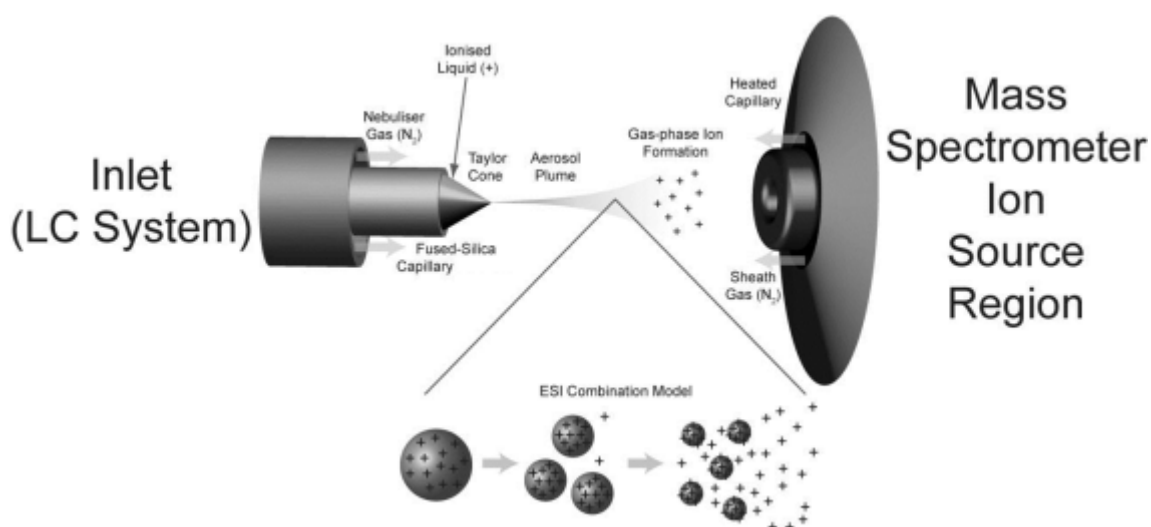


Figure A. 4 – Représentation schématique du principe de l'ionisation électrospray. (Source : Nanotechnology Solutions).

Le processus d'ionisation de la source ESI consiste à produire des ions en phase gazeuse à partir de molécules-parents lourdes et fragiles, grâce à la vaporisation de l'échantillon liquide en fines gouttelettes chargées à pression atmosphérique.⁴³ Le processus d'ionisation par électrospray s'appuie sur l'application d'un champ électrique élevé sur le capillaire d'entrée et se décompose en plusieurs étapes, de la production de gouttelettes chargées à l'obtention d'ions en phase gazeuse en passant par la fission des gouttelettes chargées en « gouttelettes filles » (Figure A.4).

▣ De l'émission de gouttelettes chargées à la formation d'ions en phase gazeuse

L'échantillon liquide est introduit dans la source par un nébuliseur, capillaire en verre de silice très fin relié à la terre et assimilable à une aiguille, à un débit typiquement compris entre 1 et 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. L'application d'une tension entre 2 et 5 kV, au niveau du cône d'entrée du spectromètre de masse, permet de créer une différence de potentiel dans le nébuliseur entraînant la polarisation du liquide. Selon la polarité appliquée, il est possible de travailler en mode positif ou en mode négatif. Les analyses réalisées au cours de la thèse ayant toutes été effectuées en mode positif, nous nous concentrerons sur cet aspect pour la suite. Dans ce mode, les charges positives sont séparées des charges négatives et s'accumulent à l'extrémité de l'aiguille. La surface du liquide en sortie de nébuliseur, enrichie en charges positives, prend une forme pointue appelée « cône de Taylor ». Lorsqu'à la pointe du cône le liquide atteint la limite de Rayleigh, point auquel les répulsions coulombiennes dues aux charges de surface dépassent la tension de surface du liquide, des gouttelettes chargées sont extraites sous la forme d'un spray, grâce à l'aide d'un faible courant coaxial d'azote dit « gaz de nébulisation »⁴⁴⁻⁴⁶. Afin que cette première étape puisse avoir lieu, l'existence d'espèces ionisées dans l'échantillon étudié est un prérequis évident sans lequel l'ionisation par électrospray ne peut avoir lieu. Dans ce contexte, l'étude des peptides et protéines est bien adaptée à ce procédé du fait de la présence de nombreux acides aminés basiques permettant une protonation aisée de ces biomolécules et donc la formation d'ions positivement chargés.

Une fois détachées du cône de Taylor, les gouttelettes chargées se déplacent alors dans la source à pression atmosphérique vers l'entrée du spectromètre de masse, grâce à l'application d'une différence de potentiel, et subissent une désolvatation. Celle-ci est possible par l'action de plusieurs facteurs : la température élevée à l'intérieur de la source favorise l'évaporation du solvant et l'action du gaz de nébulisation aide à la désolvatation des gouttelettes chargées passant au travers du flux.^{43,46} Ainsi, les gouttelettes « parents », dont la charge reste constante, voient leur densité de charge augmenter à mesure que leur rayon diminue, jusqu'à atteindre le rayon de Rayleigh. A ce point critique, les forces de répulsion coulombiennes deviennent trop importantes pour le maintien de la cohésion de la gouttelette et provoquent sa fission asymétrique en plusieurs gouttelettes « filles »

plus fines⁴⁷. Une cascade de fissions coulombiennes se poursuit ainsi par évaporation du solvant des différentes « générations » de gouttelettes.

Les ions déjà formés et les gouttelettes chargées sont acheminés dans un capillaire de transfert en verre chauffé, dans lequel circule à contre-sens un flux d'azote, dit gaz de désolvatation, permettant l'évaporation des dernières molécules de solvant et l'obtention des ions en phase gazeuse. Les processus de formation de ces ions dans la source ESI ne sont cependant pas entièrement résolus, notamment en ce qui concerne cette dernière étape de l'ionisation. Ainsi, différents mécanismes ont été proposés (Figure A.5)^{43,46} : i) le mécanisme initial proposé par Dole³⁹ et ii) le mécanisme d'Iribarne et Thomson⁴⁸.

- i) Le modèle initial de Dole, ou modèle de la « charge résiduelle », s'appuie sur l'enchaînement en cascade des différentes fissions coulombiennes subies par les générations de gouttelettes chargées. Ces fissions produisent des gouttelettes de rayons de plus en plus faibles qui finalement ne contiennent plus qu'une molécule d'analyte. Ainsi, lorsque le solvant s'est totalement évaporé de la gouttelette finale, il ne reste plus qu'un ion libre positivement chargé.
- ii) Dans le modèle d'Iribarne et Thomson, la formation des ions en phase gazeuse est le résultat d'une « évaporation » de ces ions à partir de la surface d'une gouttelette multichargée, avant même que celle-ci n'ait atteint le rayon de Rayleigh, à cause de l'augmentation des répulsions coulombiennes au fur et à mesure de l'évaporation du solvant.

L'un ou l'autre scénario sont ainsi mentionnés dans la littérature comme possibles dans certaines conditions^{43,49,50}. Il n'existe cependant à l'heure actuelle aucune preuve qui permette de réfuter complètement tel mécanisme ou de démontrer la prépondérance de l'autre.

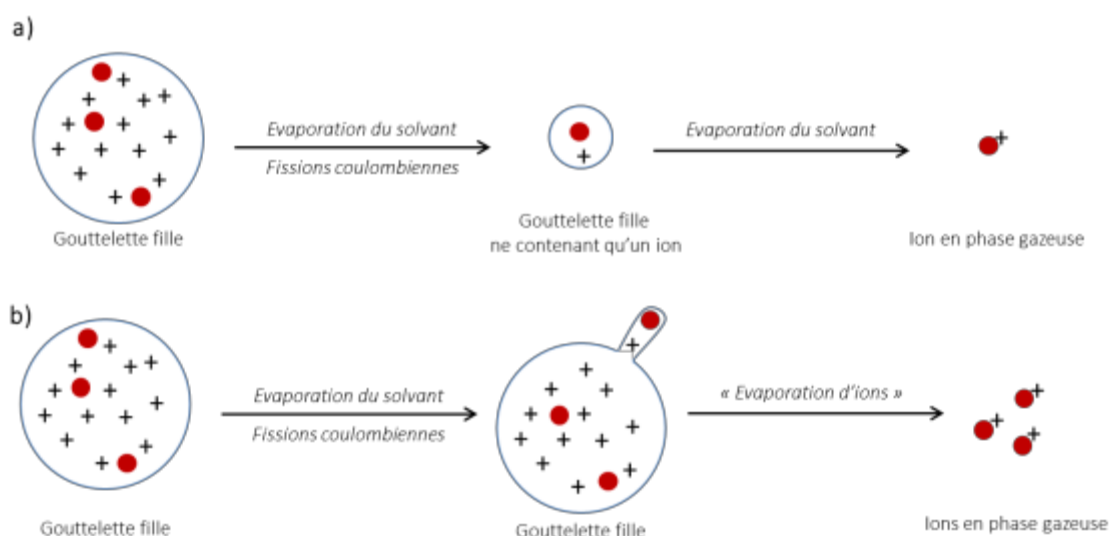


Figure A. 5 – Mécanismes de formation des ions en phase gazeuse selon a) le modèle de Dole et b) le modèle d'Iribarne et Thomson.

▣ Influence de la configuration de la source

Lors des premières expériences d'électronébulisation, la source était en configuration linéaire : l'aiguille de nébulisation alignée selon l'axe de l'entrée du spectromètre de masse. L'application du gaz de nébulisation sur un axe incliné par rapport à l'injection, en plus d'aider à l'évaporation du solvant des gouttelettes chargées, devait alors permettre l'élimination des molécules neutres du spray. Cependant dans cette configuration, certaines espèces neutres parviennent tout de même à passer le rideau d'azote, ce qui a mené au développement des sources orthogonales (Figure A.6), ainsi qu'à d'autres sources optimisées, comme la source Z-spray de Waters. Ces systèmes permettent de séparer de manière plus efficace les espèces neutres qui suivent la trajectoire du spray, des espèces chargées qui sont déviées à travers le gaz de nébulisation vers l'entrée de l'interface, grâce à l'application de champs électriques.

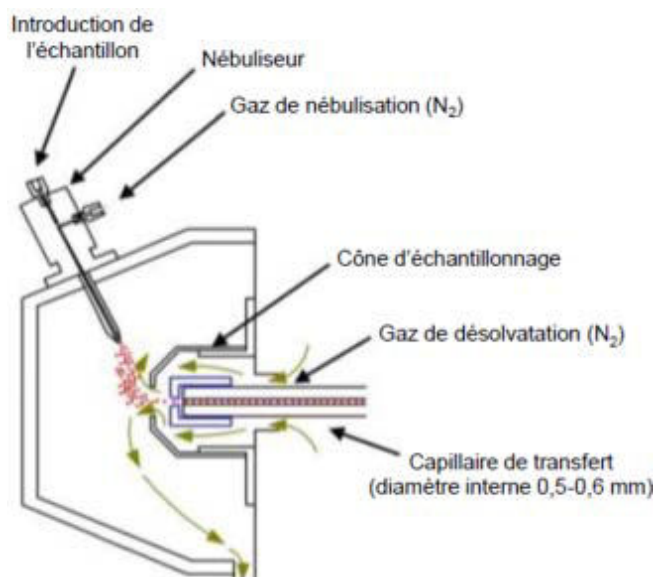


Figure A. 6 – Source d'ionisation par électrospray en configuration orthogonale (Bruker Daltonics).

▣ Nature des ions produits

L'ionisation par électrospray nécessite la présence d'ions dans l'échantillon injecté qui peuvent se former selon différents mécanismes en solution. En mode positif, le premier, comme mentionné précédemment, est la protonation des molécules possédant un ou plusieurs site(s) basique(s), comme les peptides ou les protéines. Les molécules peuvent subir des additions de cations en solution avant l'ionisation volontaires ou non – Na^+ , K^+ , Li^+ ou encore NH_4^+ , favorisant ainsi la formation d'ions en phase gazeuse, et également perdre des contre-ions négatifs, notamment dans le cas de molécules possédant des cations métalliques.

De plus, l'électronébulisation favorise la formation d'ions multichargés, détectés sous la forme d'une distribution de pics correspondants aux différents états de charge. Ainsi, sur un spectre, l'écart de

masse entre deux pics d'un massif isotopique, égal à $1/z$, permet de retrouver l'état de charge du composé observé.

▣ Source nano-électrospray et couplage avec la chromatographie liquide nano-débit

L'utilisation d'une source d'électronébulisation nécessite un échantillon liquide, ce qui présente l'avantage de permettre les couplages directs avec des méthodes séparatives, en plus de l'injection directe classique dans la source, dite « infusion ». Ainsi, les couplages LC-MS ou électrophorèse capillaire (CE, *Capillary Electrophoresis*)-MS, entre autres, sont couramment utilisés. Plus particulièrement, dans le cadre de ce projet, la majeure partie des analyses sera effectuée par couplage entre la LC nano-débit (nanoLC) et l'ESI-MS. Cette technique chromatographique permet la séparation de petits volumes d'échantillon, ce qui la rend particulièrement adaptée à l'étude d'échantillons rares et précieux.

Comme mentionné en introduction de cette partie, le nébuliseur classiquement utilisé en électrospray nécessite des débits importants de l'ordre de quelques $\mu\text{L}/\text{min}$, il est donc nécessaire de pouvoir réduire ce débit afin de permettre le couplage avec la nanoLC, tout en maintenant la stabilité du spray et la sensibilité de l'analyse. Dans le but initial de stabiliser le spray et de s'affranchir d'une certaine dépendance des performances de la source aux solvants et aux tampons, Wilm et Mann ont développé une source micro-électrospray⁴⁵ puis une source nano-électrospray⁵¹. Cette dernière est composée d'une aiguille de nébulisation possédant une extrémité en forme de pointe de 1 à 2 μm de diamètre, et permet l'injection d'échantillons à des débits de l'ordre de 20 nL/min. D'autres systèmes de nébulisation nano-débit existent, comme des capillaires de faibles diamètres – entre 20 et 70 μm – permettant l'obtention de débits de l'ordre de 100 nL/min et s'adaptant parfaitement au couplage direct nanoLC-MS. Le couplage utilisé dans le cadre de ce travail de thèse s'appuie sur l'utilisation de ce type d'aiguille.

Les sources nano-électrospray continuent de se développer, permettant d'atteindre toujours plus de stabilité de spray et de sensibilité d'analyse, à l'image de la CaptiveSpray de Bruker Daltonics particulièrement adaptée à l'infusion directe de faibles quantités d'échantillon.

1.2. L'interface du spectromètre de masse

L'interface du spectromètre de masse permet le transfert et la focalisation des ions formés dans la source à pression atmosphérique jusqu'à l'analyseur soumis à un vide poussé (10^{-6} - 10^{-7} mbar). Il est composé de différentes sections soumises à un vide partiel progressivement poussé afin d'atteindre le

niveau de vide de l'analyseur. Ainsi, les ions sont acheminés de la source vers l'analyseur, sous l'action commune de la différence de pression entre chaque section et de la différence de potentiel appliquée par des lentilles électrostatiques.

1.2.1. Composition de l'interface

Selon le spectromètre à source ESI utilisé – le microTOF-Q II ou le TripleTOF 5600 de Sciex, l'interface ne sera pas totalement le même.

Dans le cas du microTOF-Q II (Figure A.7), un capillaire de transfert en verre, dans lequel les ions se déplacent grâce à la différence de pression et au champ électrique appliqué entre la source et l'interface, permet de relier ces deux composantes la source à l'interface.

La première partie de l'interface renferme une association de lentilles ou de « *funnels* » entre lesquels sont appliquées des différences de potentiels et permettant la focalisation des ions et leur transport dans l'interface. Dans cette zone sont éliminées les éventuelles espèces neutres résiduelles, grâce à la configuration décalée de l'axe de sortie du capillaire de transfert et de la sortie au centre de la dernière lentille.

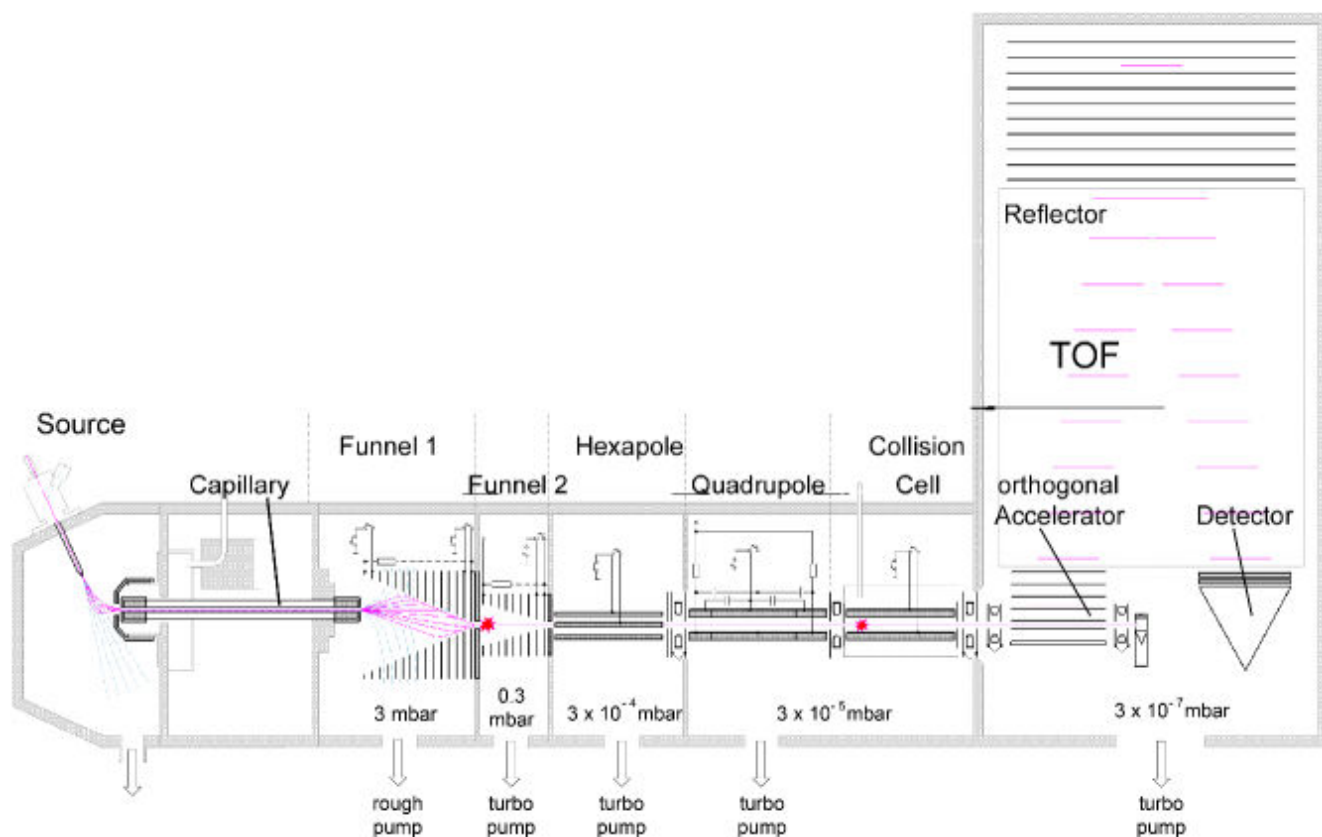


Figure A. 7 – Représentation schématique du spectromètre de masse ESI-microTOF-Q II (Bruker Daltonics).

La deuxième section joue également un rôle de focalisation des ions en trajectoire et en énergie cinétique, grâce à la présence d'un hexapôle.

Enfin, une troisième section permet la fragmentation des ions dans le cadre de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Elle se compose d'un quadripôle permettant la sélection et la focalisation de l'ion d'intérêt, ainsi que de la cellule de collision dans laquelle se passe la fragmentation induite par collision (CID, *Collision Induced Dissociation*) de l'ion parent en ions fils.

Dans le cas du TripleTOF 5600 (Figure A.8), l'entrée dans l'interface est marquée par le passage de la « *curtain plate* » derrière laquelle circule un gaz rideau, d'un débit pouvant aller jusqu'à 22 L/min. Ce flux de gaz est orthogonal au flux d'ions provenant de la source et permet l'élimination des molécules de solvant résiduelles. Les ions entrent alors dans le *Q jet*, soumis à un vide intermédiaire entre la pression atmosphérique et le vide appliqué aux autres composants de l'interface, dans lequel ils sont accélérés.

Les autres parties de l'interface sont similaires aux deuxième et troisième sections de l'interface du microTOF-Q II, destinées à la focalisation des ions en trajectoire et en énergie cinétique, puis à leur fragmentation CID dans le cadre d'analyses MS/MS.

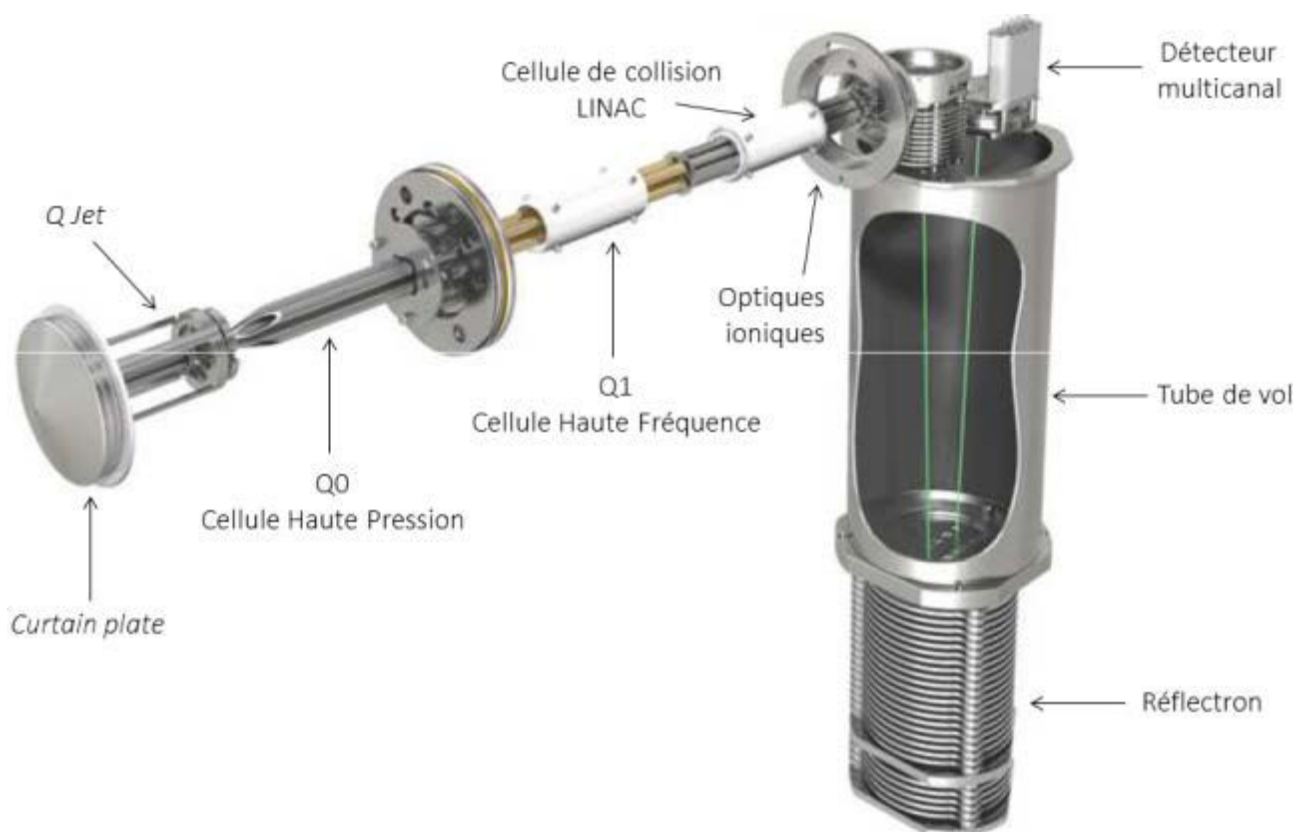


Figure A. 8 – Représentation schématique du spectromètre de masse ESI-TripleTOF 5600 (Sciex)

1.2.2. Spectrométrie de masse en tandem et dissociation induite par collision

En MS/MS, les molécules composant un échantillon sont détectées et leurs valeurs de m/z mesurées *via* l'obtention d'un spectre MS. L'ion d'intérêt est alors sélectionné et fragmenté dans une cellule de collision dans le but de mesurer les rapports m/z de ses ions fils et d'obtenir un spectre MS/MS. Parmi ces ions fils peuvent se trouver des fragments caractéristiques de l'ion parent et ainsi aider à confirmer une identification ou apporter des informations structurales sur la molécule d'intérêt. Différents types de fragmentation existent, permettant la formation de fragments différents du fait des niveaux d'énergie entrant en jeu dans les divers mécanismes, ainsi que l'obtention d'informations différentes concernant la molécule d'intérêt. Parmi ces processus se trouvent notamment la fragmentation en source (ISD, *In-Source Decay*), les dissociations par capture d'électrons ou par transfert d'électrons (ECD, *Electron Capture Dissociation*, et ETD, *Electron Transfer Dissociation*) ou encore la CID. Les autres processus n'ayant pas été utilisés dans le cadre de cette thèse, seule la CID sera développée ici.

Dans le cas du microTOF-Q II, le quadripôle placé en amont de la cellule de collision permet non seulement la sélection de l'ion parent, mais permet également d'éviter une dispersion du flux de fragments générés, en maintenant la focalisation du courant d'ions parents entrant dans la cellule. L'ion d'intérêt, accéléré et focalisé, entre alors dans la cellule de collision soumise à un vide partiel autour de 10^{-2} mbar, où il traverse un courant de gaz inerte orthogonal à sa trajectoire (en général un flux d'azote). L'ion et les molécules de gaz entrent donc en collision, ce qui induit une fragmentation de l'ion parent en ions fils. La CID est un processus nécessitant en général de faibles niveaux d'énergie qui permettent la rupture de liaisons faibles, mais aussi de liaisons covalentes, à l'image des liaisons peptidiques (ce point sera développé par la suite dans la Partie 1.5). Le processus de fragmentation peut être optimisé en faisant varier différents paramètres, tels que l'énergie cinétique des ions entrant dans la cellule de collision ou le débit du gaz inerte, permettant de réduire ou d'augmenter l'énergie de collision.

1.3. L'analyseur à temps de vol et la séparation des ions avant le détecteur

A la sortie de l'interface, les ions entrent dans l'analyseur où ils sont séparés en fonction de leur rapport m/z . Chaque analyseur mesure ce rapport de différentes manières, à l'aide d'une fréquence, d'une énergie cinétique ou encore d'un temps de vol, et possède des performances bien particulières. Comme pour les sources d'ionisation, seul l'analyseur présent dans les spectromètres de masse utilisés – l'analyseur à temps de vol – sera explicité dans cette partie.

1.3.1. Principe de l'analyseur à temps de vol

Le spectromètre de masse MALDI utilisé, l'AutoFlex II TOF/TOF de Bruker Daltonics, ainsi que le microTOF-Q II et le TripleTOF 5600, sont équipés d'un analyseur à temps de vol (TOF, *Time Of Flight*). Ce dernier est particulièrement répandu dans les spectromètres de masse compte tenu de sa gamme de m/z observable, théoriquement illimitée. Les appareils commerciaux peuvent atteindre des masses de l'ordre de 100 kDa avec cependant une diminution importante de la résolution et de la précision de masse, et des masses de 25 kDa en maintenant une haute résolution et précision de masse. L'analyse repose ici sur la mesure de la vitesse, ou du temps de parcours des ions, dans un tube de vol soumis à un vide poussé (de l'ordre de 10^{-6} - 10^{-7} mbar) et libre de tout champ. Cette vitesse dépend du rapport m/z caractérisant un ion : plus ce rapport est élevé, plus le temps de parcours sera long, et inversement. Sur une distance suffisamment longue, il est alors possible de séparer les ions de m/z différents. Les développements réalisés sur l'analyseur TOF offrent la possibilité de travailler avec deux modes différents, le mode linéaire ou le mode réflectron (Figure A.9), ce qui permet d'améliorer les performances en fonction des analytes considérés.

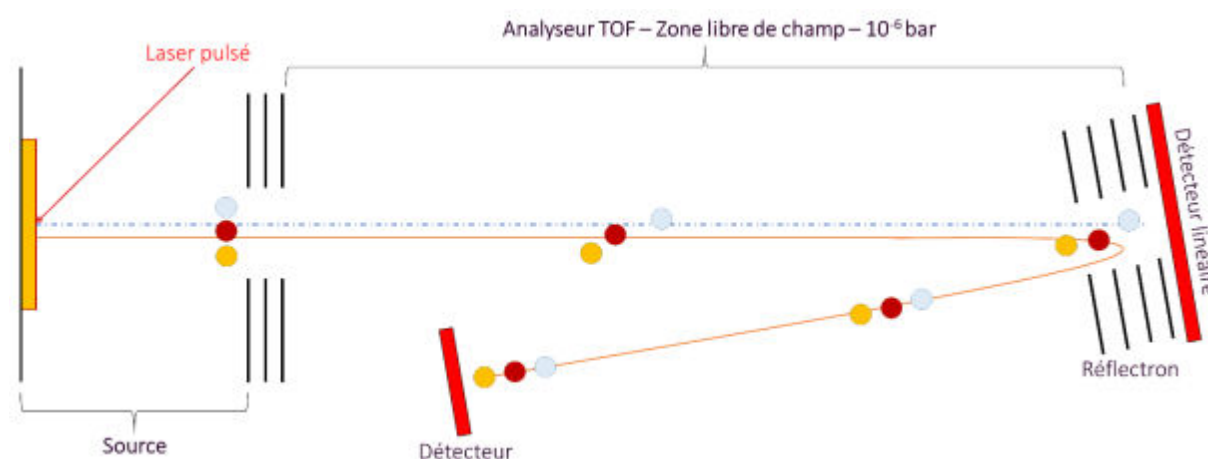


Figure A. 9 – Représentation schématique de l'analyseur TOF couplé à la source MALDI et des modes d'analyse linéaire (trait pointillé) et réflectron (trait plein).

La sensibilité et la résolution d'analyse du TOF peuvent être améliorées, grâce à la présence de lentilles à l'entrée du tube de vol permettant l'accumulation des ions pendant un temps donné, puis l'accélération du « paquet » d'ions. Cette action correspond au mode d'extraction retardée⁵² en MALDI-TOF-MS ou au réglage du temps de « *pre-pulse storage* » en ESI-TOF-MS⁵³.

1.3.2. Analyse en mode linéaire

Dans ce mode, les ions traversent le tube de vol jusqu'au détecteur linéairement. Dans ce cas, une certaine dispersion spatiale des ions de même m/z peut être observée, due à des différences d'énergie cinétique initiale ou de temps de formation⁵⁴, limitant la résolution de l'analyse.

1.3.3. Analyse en mode réflectron

Afin d'améliorer les performances observées en mode linéaire, un réflecteur électrostatique – plus communément appelé « réflectron » – composé d'électrodes annulaires aux potentiels décroissants et agissant comme un miroir, ralentit, réfléchit et accélère les ions vers un second détecteur. Ce dispositif permet un allongement du temps de vol des ions et une focalisation en énergie, réduisant la dispersion des ions de même m/z et améliorant de ce fait la résolution de l'analyse⁵⁴. L'utilisation du réflectron présente cependant une gamme de m/z limitée – inférieurs à 10 000, le choix du mode d'analyse sera donc à adapter selon les molécules d'intérêt.

1.4. La détection des ions

En sortie d'analyseur, les ions arrivent finalement au détecteur permettant la transmission des courants ioniques reçus en courants électriques puis en spectres de masse. De nombreux détecteurs existent, utilisant différents mécanismes. Sont utilisées par exemple la détection par la charge du cylindre de Faraday, la détection par effets inductifs, utilisée pour la spectrométrie de masse par résonance cyclotron des ions (FTICR, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*), la détection par émission d'électrons secondaires grâce aux détecteurs à dynodes discrètes ou continues, ou encore la détection par effet de saturation²⁹. Les appareils utilisés pour les analyses MALDI-MS et ESI-MS sont tous équipés d'un système de détection par émission d'électrons secondaires, le détecteur à galettes de micro-canaux (MCP, *Micro-Channel Plate*), dont le principe sera détaillé dans cette partie. Nous aborderons également le principe d'un détecteur nouvelle génération, dédié à la détection des ions de hauts m/z en MALDI-TOF-MS.

1.4.1. Détecteur à galettes de micro-canaux

Le détecteur MCP (Figure A.10.A) est un détecteur à dynodes continues utilisant le principe de comptage des électrons secondaires. Dans le cas d'un spectromètre de masse équipé d'un analyseur TOF, il offre le principal avantage de ne pas ajouter de dérive pour la mesure des temps de vol.

La galette du détecteur est percée de plusieurs milliers de micro-canaux légèrement inclinés, jouant chacun le rôle d'un multiplicateur d'électrons classique. Ainsi, lorsqu'un ion arrive dans un micro-canal et touche une paroi, cela produit des électrons secondaires qui produiront eux-mêmes de nouveaux électrons secondaires en touchant une paroi, provoquant ainsi un phénomène de cascade et amplifiant le signal de l'ion initial. En général, deux détecteurs MCP sont montés en série ou en chevrons (Figure A.10.B), ce qui permet d'atteindre un gain d'amplification de 10^6 . Le courant ionique, ainsi amplifié en courant électronique, est ensuite traité et digitalisé selon un processus qui ne sera pas développé ici.²⁹

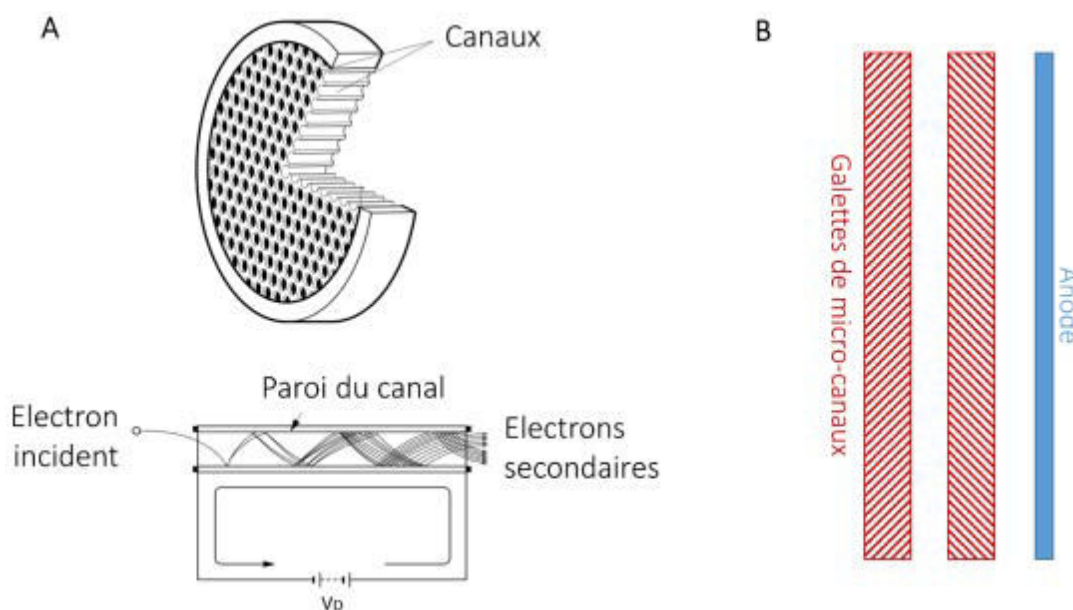


Figure A. 10 – A) Schéma d'une galette de micro-canaux constituant le détecteur MCP et principe d'amplification. B) Schéma d'un montage en chevrons de deux détecteurs MCP permettant d'augmenter le gain d'amplification jusqu'à 10^6 .^{29,55}

1.4.2. Détecteur CovalX pour les composés de haut poids moléculaire en MALDI-TOF-MS

Bien que la spectrométrie de masse MALDI-TOF dispose d'une gamme de masse mesurable très large, les performances obtenues sur des composés de très haut poids moléculaire sont relativement faibles, notamment en terme de sensibilité. Ce phénomène est dû à une faible vitesse de ces ions très lourds, induisant un faible gain d'amplification au niveau du détecteur MCP.

Dans ce contexte, le détecteur CovalX, utilisant la conversion ion-ion, a été développé pour être adapté au MALDI-TOF-MS et permet la détection en mode positif de composés à haut rapport m/z , comme des complexes de protéines par exemple. Un ion lourd positif vient frapper en mode linéaire une dynode de conversion composée de lames métalliques parallèles, éjectant alors un ion négatif secondaire de bas poids moléculaire, qui est ensuite accéléré vers un multiplicateur d'électrons fonctionnant selon le même principe que le détecteur MCP décrit précédemment^{29,56}. Sur les dernières générations de détecteurs CovalX, il est alors possible de détecter des composés jusqu'à 2 MDa avec une résolution et une sensibilité accrues.

1.5. Approche protéomique et caractérisation des protéines

Le terme protéomique a été utilisé pour la première fois par Peter James⁵⁷ en 1997 et désigne la science de l'étude du protéome, à savoir l'ensemble des protéines composant une cellule, un tissu ou un fluide biologique à un instant donné et dans des conditions données. Cette approche permet d'identifier, de quantifier et de localiser une protéine dans le système analysé, ainsi que d'étudier la fonction remplie par celle-ci, sa structure et la présence de modifications post-traductionnelles (PTMs, *Post-Translational Modifications*), modifications des acides aminés d'une protéine après sa production par l'organisme. Grâce à la protéomique, il est possible de suivre l'évolution du développement d'une protéine ou de son taux d'expression, ses interactions avec son environnement et l'influence de celui-ci sur sa composition. Par exemple, cette approche est particulièrement adaptée à l'étude de pathologies, puisqu'elle permet la mise en évidence de biomarqueurs diagnostiques de celle-ci et apporte ainsi une aide précieuse au développement de méthodes de diagnostic précoce ou de nouveaux traitements.

Le développement des techniques analytiques et de l'engouement pour la protéomique a permis l'émergence ou l'amélioration d'outils qui lui sont indispensables, tels que les innovations en spectrométrie de masse permettant d'atteindre toujours plus de sensibilité, de résolution ou encore de précision, la création de bases de données regroupant toutes les protéines connues pour un grand nombre d'espèces, ainsi que le développement de la bio-informatique, discipline nécessaire au traitement des données massives générées lors des analyses.

La protéomique est donc une discipline extrêmement vaste pour laquelle différentes stratégies ont été développées. Dans cette dernière partie, ces stratégies analytiques seront abordées, ainsi que les principes de base de l'identification et de la caractérisation des peptides et protéines.

1.5.1. Stratégies analytiques pour la protéomique en spectrométrie de masse

En protéomique, trois grandes stratégies peuvent être appliquées, combinant différents protocoles de préparation des échantillons et techniques analytiques de pointe.

- i) La stratégie « *bottom-up* » est utilisée depuis les débuts de la protéomique et est toujours aujourd'hui l'approche la plus répandue⁵⁸. Les protéines sont préalablement extraites de la matrice biologique puis coupées en peptides au niveau de sites spécifiques par digestion chimique ou enzymatique. Le digest peptidique obtenu est alors analysé par MS et MS/MS afin de retrouver les séquences en acides aminés des peptides présents, à partir desquelles seront identifiées les protéines composant l'échantillon, à l'aide des bases de données de protéomique.
- ii) L'approche « *top-down* » s'est développée plus tard comme alternative à la stratégie « *bottom-up* »⁵⁸⁻⁶⁰. Dans ce cas, les protéines sont injectées directement dans le spectromètre de masse, où elles sont ionisées puis analysées en MS et MS/MS, afin de déterminer leur masse moléculaire et celles des fragments générés. Afin de pouvoir casser les liaisons peptidiques de la protéine intacte en phase gazeuse et obtenir des fragments analysables en MS/MS, cette approche utilise les modes de fragmentation ETD et ECD déjà mentionnés plus tôt (Partie 1.2.2), modes plus énergétiques que la fragmentation CID.
- iii) La stratégie « *middle-down* » est la dernière approche développée et constitue un intermédiaire entre les deux précédentes⁶¹. Les protéines sont digérées de manière modérées en amont de l'analyse, générant des peptides lourds dont la masse est supérieure à 3 000 Da. Le digest peptidique est ensuite analysé en MS, puis en MS/MS après une fragmentation en mode ECD ou ETD.

Seule l'approche *bottom-up* a été utilisée dans le cadre de ce travail de thèse. La suite de cette partie se concentrera donc sur les méthodes analytiques mises en place pour ce type de stratégie.

▣ Préparation de l'échantillon

En protéomique, la préparation de l'échantillon constitue une étape primordiale. Les protéines sont souvent incluses dans une matrice biologique composée de différentes familles de molécules – notamment différentes classes de lipides ou des enzymes, il est donc souvent nécessaire d'extraire sélectivement les protéines et de les purifier avant de pouvoir les digérer et les analyser.

La première étape de la préparation de l'échantillon consiste à extraire ou solubiliser les protéines. Pour cela, différents agents d'extraction sont nécessaires : un agent réducteur permettant la rupture des ponts disulfures et facilitant la mise en solution, un agent chaotropique permettant de dénaturer et solubiliser la protéine en perturbant les liaisons hydrogène (liaisons H) et dans certains cas, un

détergent ionique, non-ionique ou zwitterionique^a empêchant l'agrégation des protéines. Egalement, la solution de solubilisation doit contenir un tampon permettant de fixer le pH à la valeur désirée pour l'extraction, c'est-à-dire au pH nécessaire pour que les agents d'extraction soient actifs sans que cela ne vienne modifier les protéines. Une fois les protéines solubilisées, il est nécessaire d'effectuer une étape d'alkylation, afin de protéger les cystéines qui étaient impliquées dans les ponts disulfures.

Dans certains cas, une seconde étape consiste à purifier les protéines en éliminant les sels, détergents et autres molécules issues de l'échantillon selon divers procédés. Parmi les plus communs, nous pouvons citer : la dialyse, ou la précipitation des protéines par effet de « *salting out* » (utilisation d'un sel très concentré), par action de l'acide trichloroacétique (TCA, *Trichloroacetic Acid*), d'acétone ou d'une combinaison de ces deux agents à basse température. Afin d'avoir une vision plus complète de la carte protéique d'un échantillon, une procédure d'enrichissement des protéines mineures ou de déplétion des protéines majeures peut être réalisée. Egalement, une étape de séparation des protéines est parfois nécessaire, afin de purifier une protéine d'intérêt, comme dans le cas de la protéomique ciblée pour l'étude de biomarqueurs par exemple.

Les protéines purifiées peuvent alors être digérées, chimiquement ou par une enzyme, afin de couper les protéines sur des sites spécifiques. Cette étape, générant des peptides de masse inférieure à 3 000 Da dans le cas de l'approche *bottom-up*, s'effectue dans un tampon de digestion afin de se placer dans des conditions de pH permettant l'activité de l'enzyme ou de l'agent chimique de digestion. Certains sels utilisés en tampon de digestion étant incompatibles avec les analyses en MS, le digest peptidique obtenu est finalement dessalé, généralement par extraction en phase solide (SPE, *Solid Phase Extraction*) ou par échange de tampon sur des cartouches adaptées, afin de placer l'échantillon dans les conditions de l'analyse. Dans le cas où le protocole n'inclut pas la seconde étape du traitement de purification de la protéine, ce dessalage permet également de s'affranchir des molécules de bas poids moléculaires de l'échantillon. Le digest dessalé est généralement solubilisé en conditions dénaturantes, dans un mélange eau/acétonitrile (ACN) (1:1, v/v) 0,1% d'acide formique (FA, *Formic Acid*), afin de permettre son analyse en MS ou en MS/MS.

☒ Couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse en tandem

Afin d'obtenir une identification précise et sensible en spectrométrie de masse, il est nécessaire d'effectuer une étape de séparation des peptides en amont du spectromètre de masse. Dans ce but, de nombreuses techniques de couplage avec la MS se sont développées, à l'image de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*). Cette technique permet la séparation des composés d'un échantillon en fonction de leur affinité relative avec la phase stationnaire et la phase mobile grâce à l'application sous haute pression d'un

^a Dont la somme des charges est égale à zéro

gradient, matérialisé par la variation du pourcentage en solvant organique dans la phase mobile. En HPLC sur phase inverse par exemple – typiquement une phase de silice greffée de groupements alkyles C8 ou C18, la phase mobile contient initialement un faible pourcentage de solvant organique qui est progressivement augmenté, afin de permettre la séparation des peptides du plus hydrophile au plus hydrophobe. Le gradient et le débit de la phase mobile doivent ainsi être optimisés pour chaque type d'échantillon dans le but d'atteindre la meilleure séparation de pics possible permettant d'obtenir un maximum d'information pour l'identification des protéines.

De nouveaux développements en HPLC ont permis de mettre au point des appareils toujours plus performants en termes de résolution chromatographique, de sensibilité d'analyse, de vitesse d'analyse, de robustesse et de reproductibilité, à l'image du système d'UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) de Waters, des appareils fonctionnant en nano-débit (nanoLC) ou encore des systèmes cHiPLC de Sciex. Comme mentionné en partie 1.1.2., nous avons utilisé dans le cadre de cette thèse un système nanoLC Ultimate 3000 de chez ThermoScientific permettant l'analyse de faibles quantités d'échantillon grâce à l'utilisation de nano-débites.

Dans le cas d'échantillons très complexes, il peut être parfois nécessaire d'effectuer une séparation orthogonale en LC, dite 2D, dans le but d'identifier un maximum de composés^{62,63}. Ce type d'approche consiste à effectuer une première séparation des peptides, dite « préparative », en HPLC par exemple, afin de séparer dans des conditions données les différentes classes de composés qui sont ensuite récupérées en fractions. Ces fractions sont alors séparées de manière orthogonale dans des conditions différentes de celle de la première dimension, sur HPLC ou nanoLC, afin de permettre la séparation des peptides dans chaque fraction avant leur analyse en MS. Dans ce travail, compte-tenu des faibles quantités d'échantillons disponibles, cette approche n'a pas été abordée.

Après leur séparation en nanoLC, les peptides sont injectés directement dans le spectromètre de masse équipé d'une source ESI, grâce à la connexion du capillaire de sortie de colonne chromatographique au nano-nébuliseur de la source.

1.5.2. Caractérisation des peptides et protéines par spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse en protéomique permet la mesure des masses d'une protéine entière, ou des peptides générés par la digestion de celle-ci, ainsi que la détermination des séquences peptidiques menant à l'identification des protéines de l'échantillon étudié.

Utilisée comme telle, la MS ne permet pas d'identifier la séquence d'une protéine à partir de sa masse seule mais peut parfois permettre l'identification de la protéine à partir des peptides obtenus par digestion enzymatique, grâce à son empreinte peptidique massique (PMF, *Peptide Mass*

Fingerprint)^{64,65}. Cette stratégie permet, par analyse en MALDI-MS ou en ESI-MS, de comparer la liste des masses monoisotopiques expérimentales des peptides à des listes de masses théoriques. Ces dernières sont générées par une digestion *in-silico* – digestion virtuelle réalisée avec l'enzyme utilisée pour la digestion de la protéine étudiée – à partir des bases de données de protéomique⁶⁶, *via* l'utilisation d'outils bioinformatiques dédiés. Ainsi, la recherche permet de lister la ou les protéine(s) présentant la même empreinte massique que celle déterminée expérimentalement.

Cette approche présente cependant certaines limitations qui ne permettent pas son application systématique. Dans le cas de mélanges complexes, de protéines susceptibles de comporter un nombre important de PTMs ou pour les protéines non-séquencées, d'autres stratégies existent et plus particulièrement la spectrométrie de masse en tandem. Ce dernier paragraphe s'intéresse donc à l'identification des peptides et protéines par MS/MS.

▣ Fragmentation des peptides

L'analyse des digests peptidiques par MS/MS en aval d'une séparation chromatographique s'appuie sur la fragmentation des peptides préalablement analysés en MS. Les ions les plus intenses détectés sur chaque cycle MS sont sélectionnés et fragmentés en phase gazeuse par CID (cf. Partie 1.2.2), afin d'obtenir les spectres MS/MS.

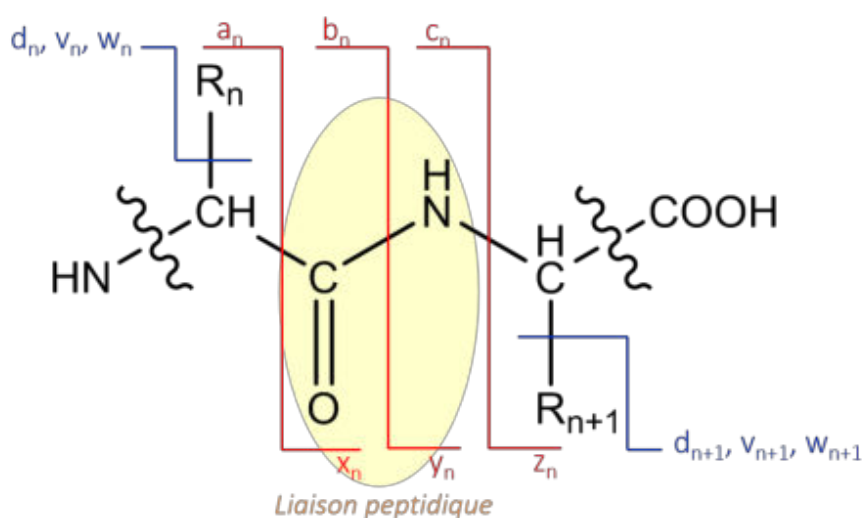


Figure A. 11 – Schéma de fragmentation des peptides et nomenclature utilisée.

Selon l'énergie apportée pour la fragmentation, différents fragments peuvent se former (Figure A.11) résultant d'une coupure des liaisons peptidiques – fragmentation basse énergie, d'une coupure au niveau de la chaîne latérale du peptide – fragmentation haute énergie, ou bien d'une perte de molécules neutres – typiquement NH_3 et H_2O . Afin de désigner plus facilement chaque type de fragments obtenus, une nomenclature a été mise en place (Figure A.11)⁶⁷.

- i) Les fragments des séries a, b et c désignent les ions fils dont la charge positive est portée par le fragment comportant l'acide aminé N-terminal.
- ii) Les fragments des séries x, y et z désignent les ions fils dont la charge positive est portée par le fragment comportant l'acide aminé C-terminal.
- iii) Les fragments des séries d, v et w désignent les ions issus de la coupure de la chaîne latérale du peptide.

La fragmentation CID est un mode de fragmentation basse énergie, seuls les ions des séries a, b, c, x, y et z peuvent donc être détectés sur les appareils utilisés pour cette thèse. Plus particulièrement, étant les plus abondants en CID, les ions des séries y et b seront majoritairement observés.

▣ Outils bioinformatiques pour la détermination des séquences peptidiques et l'identification des protéines

En protéomique, l'identification des peptides est basée sur la mesure de la masse monoisotopique en MS et sur l'identification des fragments générés par CID pour ce peptide en MS/MS. Plusieurs stratégies d'identification existent.

Le séquençage *de novo* à partir des spectres MS/MS permet d'identifier les séquences en acides aminés de protéines non répertoriées dans les bases de données. Cette stratégie s'appuie sur le principe que deux fragments consécutifs d'un même peptide auront une différence de masse correspondant à la masse moléculaire de l'acide aminé perdu entre ces deux fragments. En théorie, il est ainsi possible, en calculant les différences de masse entre chaque fragment consécutif d'un spectre de masse, de retrouver la séquence en acides aminés d'un peptide (Figure A.12). En pratique, certains facteurs empêchent parfois l'identification de la séquence complète, comme par exemple les acides aminés isobares leucine et iso-leucine. Cette approche a cependant l'avantage de permettre l'identification et la localisation des PTMs d'une protéine.

La seconde stratégie, dédiée aux protéines répertoriées dans les bases de données, est basée sur le même principe que l'approche PMF mentionnée précédemment et s'appuie sur l'étude de l'empreinte des fragments peptidiques (PFF, *Peptide Fragment Fingerprint*). Ainsi, les données MS/MS fournissent une liste des m/z expérimentaux des fragments générés par CID pour un peptide qui est comparée à la liste de m/z théoriques générée *in-silico*. La combinaison de la comparaison avec les bases de données de la masse moléculaire d'un peptide en MS et de la liste des m/z expérimentaux de ses fragments permet donc une identification fiable du peptide.

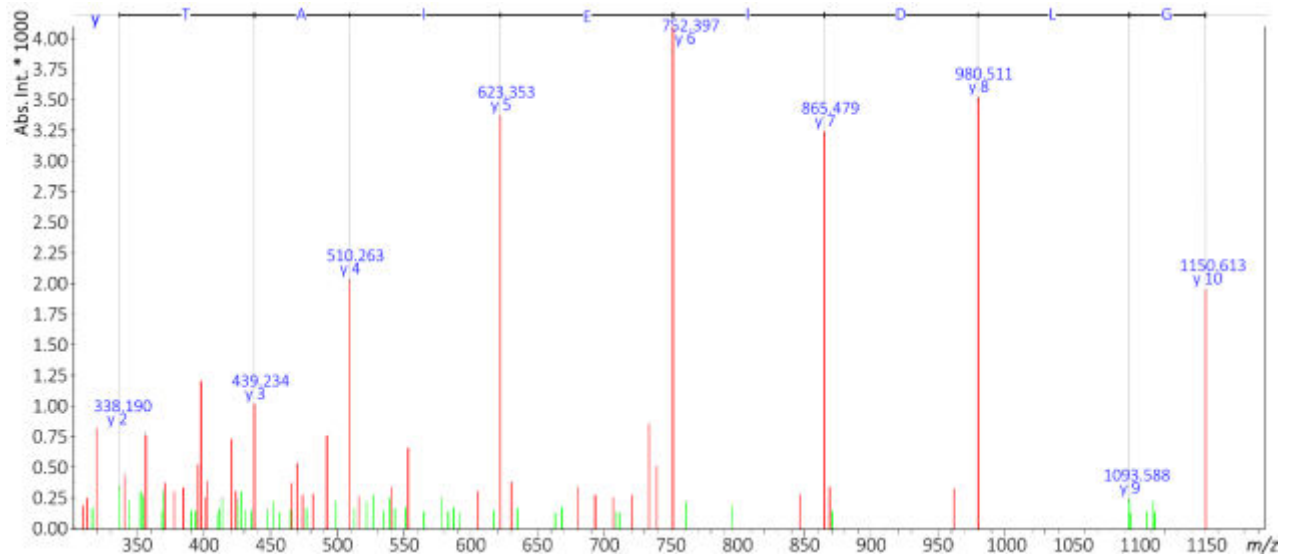


Figure A. 12 – Exemple de spectre MS/MS obtenu par analyse d'un peptide de kératine KRT86, et séquençage *de novo*

Dans le cas d'échantillons complexes, les analyses MS/MS génèrent des données massives qu'il faut interpréter. Un certain nombre d'outils informatiques – logiciels, algorithmes de recherche, bases de données – ont donc été développés ces dernières années, afin de réduire le temps de traitement et de faciliter l'interprétation des résultats. Notamment, l'algorithme de recherche *Mascot*, l'un des plus fréquemment utilisés par les logiciels dédiés à la protéomique, utilise la stratégie PFF combinée au séquençage *de novo* pour identifier les peptides correspondants aux différents spectres MS/MS, et finalement les protéines présentes dans l'échantillon⁶⁸. L'algorithme effectue la recherche selon des critères définis par l'utilisateur – taxonomie, base de données, enzyme de digestion, nombre de coupures partielles maximum, modifications post-traductionnelles possiblement présentes, tolérance sur les masses en MS et en MS/MS, etc. – et donne un score d'identification aux différents résultats de la recherche. Ces scores correspondent à des indices de confiance attribués aux peptides et aux protéines identifiées. Pour les peptides, cela correspond à la probabilité que la correspondance observée entre le peptide expérimental et le peptide théorique soit un évènement aléatoire, un score élevé reflétant une probabilité faible. Pour les protéines, le score est calculé à partir de la somme des scores de chacun des ions attribués à la protéine. L'utilisateur peut ainsi accepter ou refuser l'identification d'un peptide ou d'une protéine en fixant un score seuil en-dessous duquel l'identification n'est pas validée, ainsi qu'un nombre minimum de peptides uniques pour chaque protéine – peptides identifiés seulement pour cette protéine. Enfin, l'algorithme *Mascot* permet de calculer le taux de faux positifs (FDR, *False Discovery Rate*) en effectuant en parallèle de chaque recherche dans les bases de données classiques, une seconde recherche dans la base de données correspondante dite « *decoy* »⁶⁹. Les séquences présentes dans cette base *decoy* correspondent à celles de la base classique dont l'ordre en acides aminés a été inversé ou mélangé. Une recherche dans ce type de base ne doit théoriquement pas donner de correspondances avec les données

MS/MS. Dans le cas contraire, le FDR est calculé en effectuant le ratio du nombre de correspondances dans la base *decoy* sur le nombre de correspondances dans la base classique.

☒ Conservation des protéines et modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles regroupent les modifications subies par les protéines dans l'organisme après leur expression. Celles-ci peuvent être un marqueur du vieillissement ou de la dégradation d'une protéine et influencent parfois sa fonction biologique⁷⁰, constituant de ce fait un objet d'étude important dans le domaine de la biochimie.

Les principales PTMs connues, leur site d'action et la différence de masse qu'elles provoquent sont listées dans le Tableau A.2.

Tableau A. 2– Modifications post-traductionnelles fréquentes, localisation et variations de masse

Modifications post-traductionnelles	Localisation	Variation de masse Δm (Da)
Phosphorylation	Tyr, Ser, Thr, Arg, Cys, Asp, His	+79,966
Carboxyméthylation	Cys	+58,006
Carbamidométhylation	Cys	+57,021
Carbamylation	Acide aminé (a.a.) N-terminal	+43,006
Acétylation	Cys, Ser, Lys, a.a. N-terminal	+42,011
Oxydation	Met, Trp, His, Cys	+ 15,995
Méthylation	Thr, Ser, Glu, Asp, Leu, isoLeu, Arg, Gln, Asn, Lys, His, Cys, a.a. en N-term	+14,016
Déamidation	Arg, Asn, Gln	+ 0,984
Isomérisation	Asp/isoAsp, Leu/isoLeu	0
Formation de ponts disulfures	Cys	-2,016
Cyclisation	Gln en N-term	-17,027

Grâce aux développements récents des spectromètres de masse apportant une grande précision de masse, les analyses MS/MS représentent donc un moyen idéal d'étudier ces PTMs. En effet, la présence d'une modification sur un peptide, induit une différence de masse par rapport au peptide non modifié théorique qui peut être vue sur les spectres MS/MS selon le principe du séquençage *de novo*. Cette caractéristique permet également la localisation d'une modification sur le peptide. Selon ce principe, et comme mentionné plus haut, l'algorithme de recherche *Mascot* peut introduire la présence probable (« variable ») ou certaine (« fixe ») d'une PTM dans ses critères de recherche. Dans la suite de cette thèse, nous aborderons cet aspect plus en détails.

2. Couplage TLC-MS : une technique en évolution perpétuelle

La chromatographie sur couche mince (TLC, *Thin Layer Chromatography*) est une technique séparative pouvant être utilisée en modes préparatif ou analytique, pour purifier un produit ou séparer un mélange complexe en vue d'une analyse^{71,72}. La séparation des analytes s'appuie sur leur affinité relative avec deux phases : i) la phase stationnaire plane de la plaque TLC, composée d'une couche uniforme d'un matériau adsorbant, qui peut être greffé à l'aide de groupements définissant la polarité de la phase, et ii) la phase mobile, ou éluant, constituée d'un solvant ou d'un mélange de solvant, qui migre vers le haut de la phase stationnaire par capillarité en entraînant et séparant les composés d'intérêt. La TLC permet une préparation des échantillons avec un minimum d'étapes, ainsi qu'une séparation en parallèle de plusieurs échantillons, tout en s'affranchissant des « effets mémoire » qui peuvent interférer dans certaines techniques chromatographiques^{73,74}. La TLC est couramment utilisée comme l'une des étapes du protocole de préparation de substances complexes, tels que des substances végétales, des résines, des huiles ou du bitume entre autres⁷⁵⁻⁷⁷, avant l'analyse en spectrométrie de masse.

La technique de détection originellement utilisée en TLC est la révélation par divers agents chimiques ou biologiques, ou par révélation optique^{72,78}. Parmi les plus utilisées, nous pouvons citer l'ajout de substances fluorescentes à la phase stationnaire, afin de mettre en évidence la présence de composés absorbant les rayons UV, ou encore l'utilisation de composés colorant les spots d'intérêt, à l'image de la ninhydrine pour la détection des acides aminés. Ainsi, il est possible de calculer les rapports frontaux R_f des spots révélés – rapport de la hauteur de migration de l'analyte par la hauteur du front de migration, qui sont représentatifs de la migration relative des analytes sur la plaque TLC et peuvent aider à la confirmation d'une identification par comparaison avec une référence. Cependant, ces méthodes de révélation présentent souvent une faible sensibilité et une trop grande spécificité empêchant une caractérisation précise des analytes présents dans l'échantillon. Comme discuté dans la Partie 1, la spectrométrie de masse permet en revanche une détection sensible et précise des analytes et donne accès à des données moléculaires permettant la caractérisation de ceux-ci. Elle paraît donc être une méthode adaptée pour une caractérisation précise des composés séparés sur plaque TLC.

Dans cette partie sera présentée l'évolution du couplage TLC-MS, puis le couplage direct TLC-MALDI-MS, qui a été mis en place au laboratoire dans le cadre de ce projet de recherche, sera exposé plus en détails, ainsi que les enjeux de l'analyse de systèmes complexes et précieux par cette technique.

2.1. Etat de l'art des couplages TLC-MS

L'HPLC ou la GC permettent l'élution des analytes hors de la phase stationnaire par l'action d'un gaz ou d'un solvant *via* un capillaire connecté à la sortie de la colonne. Ceci facilite un couplage direct avec la MS, grâce à la connexion du capillaire de sortie de colonne directement à l'entrée de la source, et explique l'utilisation répandue des différentes techniques d'HPLC-MS et de GC-MS. En TLC cependant, l'adsorption des analytes dans la phase stationnaire plane a longtemps constitué un frein au couplage TLC-MS puisqu'elle ne permet pas, *a priori*, de connexion directe entre une sortie de phase stationnaire des molécules d'intérêt et l'entrée dans le spectromètre de masse.

Depuis une quinzaine d'années, il est possible de coupler la séparation d'un échantillon sur TLC à son analyse en spectrométrie de masse, couplage qui peut être réalisé de façon indirecte ou directe^{79,80}. Ce premier paragraphe s'attache donc à tracer un rapide état de l'art des développements du couplage TLC-MS.

2.1.1. Couplages indirects

A l'origine, le couplage TLC-MS s'effectuait indirectement dans un but souvent préparatif (Figure A.13)⁸¹. Pour ce type de technique, une étape de révélation optique, chimique ou biologique est généralement nécessaire, comme pour la TLC classique, afin de localiser les spots d'intérêt séparés sur la plaque, qui sont alors récupérés par grattage de la phase stationnaire. Les analytes sont ensuite extraits de la phase adsorbante récupérée, à l'aide d'un solvant adapté ou d'un mélange de solvants adaptés, dit éluant. Des étapes supplémentaires de purification, de concentration ou de dérivation des composés d'intérêts sont parfois nécessaires en amont de l'injection en spectrométrie de masse, ainsi que dans certains cas, des séparations supplémentaires par HPLC ou GC⁸².

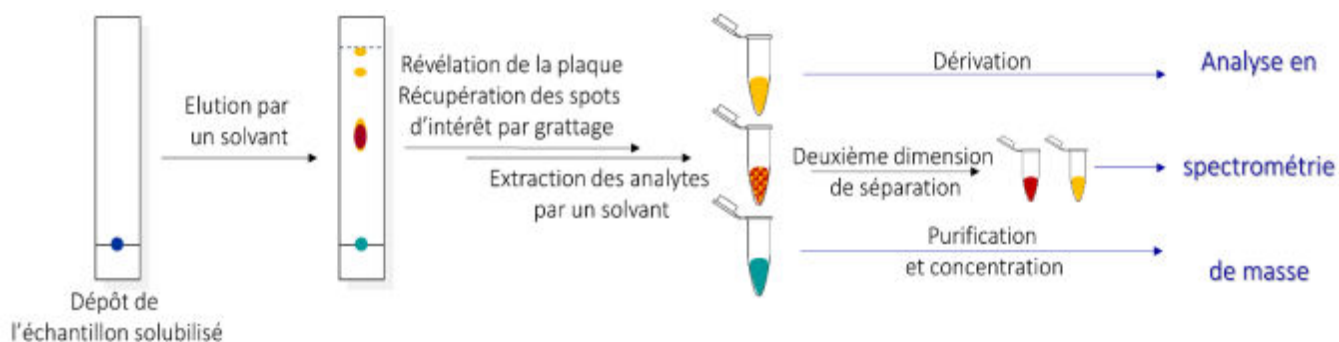


Figure A. 13 Mode opératoire global utilisé dans le cadre du couplage indirect TLC-MS.

Les composés d'intérêt ainsi préparés peuvent ensuite être analysés par diverses techniques de spectrométrie de masse, selon les informations recherchées et le type de molécules concernées. Les fractions obtenues peuvent être injectées directement, sous forme liquide ou cristallisées sur une

cible, dans des appareils équipés de divers types de sources : ESI, impact électronique (IE, *Electronic Impact*), ionisation chimique (CI, *Chemical Ionization*), ou encore désorption/ionisation, telles que les sources MALDI, le bombardement d'atomes rapides (FAB, *Fast Atom Bombardment*) et la désorption/ionisation laser (LDI, *Laser Desorption/Ionization*). Le couplage TLC-MS est également possible avec la spectrométrie de masse d'ions secondaires en phase liquide (LSIMS, *Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*)^{74,83}.

Le principal avantage de ces approches indirectes est d'obtenir des fractions d'intérêt purifiées, nettoyées des particules de phase stationnaire et concentrées, ce qui permet d'obtenir une meilleure sensibilité d'analyse. Cependant, de telles méthodes requièrent un protocole lourd et chronophage, et donnent souvent lieu à des pertes d'information importantes. L'extraction des spots d'intérêt ne permet pas la conservation d'informations quantitatives et chromatographiques précises, pertes auxquelles s'ajoutent les composés de l'échantillon non détectés par les moyens de révélation utilisés. Ainsi, les développements en TLC-MS ont visé la simplification des protocoles de préparation et la réduction de ces pertes d'information, grâce à la mise en place d'approches directes.

2.1.2. Couplages directs

Les approches directes TLC-MS se divisent en deux catégories⁸³ : i) les approches basées sur la désorption des analytes et ii) celles basées sur l'élution des analytes.

☒ Approches TLC-MS par désorption des analytes

Les couplages directs par désorption des analytes ont été les premiers mis en place dès les années 1980, notamment du fait de la forme plane de la plaque TLC qui peut facilement servir de cible pour l'ionisation. Ces approches consistent donc à introduire la plaque TLC directement dans la source d'ionisation, dans certains cas après l'avoir recouverte d'une couche de matrice, puis à la soumettre à un faisceau laser, d'ions, ou d'atomes (Figure A.14.A). Ainsi, les couplages TLC-FAB^{84,85} et TLC-SIMS^{86,87} ont été parmi les premiers mis au point. Les approches les plus développées sont cependant les couplages TLC – désorption/ionisation par un laser. La première d'entre elles, qui représente également la première mention d'un couplage direct TLC-MS dans la littérature, date de 1983 et consistait à utiliser la désorption laser (LD, *Laser Desorption*) dans une source d'ionisation chimique pour extraire et ioniser les analytes de la plaque TLC⁸⁸. L'approche directe par MALDI, qui est actuellement la plus répandue des approches par désorption laser, a suivi les premiers développements du couplage TLC-LD en 1995^{89,90} et continue de se développer encore aujourd'hui. Celle-ci donne accès à une plus grande sensibilité d'analyse et une plus grande polyvalence que l'approche par LD-CI. Ce couplage sera développé dans la suite de cette partie.

Ces dernières années, d'autres types de techniques ont également été couplés à la TLC de façon moins courante, comme les désorptions/ionisations laser assistées par une surface (SALI, *Surface Assisted Laser Desorption Ionization*)⁹¹ ou encore l'ionisation par torche à plasma couplée à l'ablation laser (LA-ICP, *Laser Ablation - Inductively Coupled Plasma*)⁹². L'une des dernières techniques mise en place, l'ionisation électrospray par désorption acoustique induite par un laser (LIAD-ESI, *Laser Induced Acoustic Desorption - Electrospray Ionization*)⁹³, consiste à envoyer un faisceau laser à l'arrière de la plaque TLC. L'onde acoustique ainsi produite entraîne la désorption des analytes qui sont ionisés par électrospray.

Un dernier type de couplage direct TLC-MS s'appuie sur l'utilisation d'un spray de solvant ou d'un flux de gaz pour désorber les analytes de la phase stationnaire. Ainsi, depuis une dizaine d'années, les couplages TLC – désorption/ionisation par électrospray (DESI, *Desorption Electrospray Ionization*)⁹⁴ ou TLC – analyse directe en temps réel (DART, *Direct Analysis in Real Time*)⁹⁵, entre autres, ont vu le jour.

Ces approches par désorption des analytes présentent l'important avantage de permettre une analyse continue en suivant la ligne de migration de l'échantillon et de permettre ainsi la conservation des données chromatographiques qui pourront être combinées aux données MS.

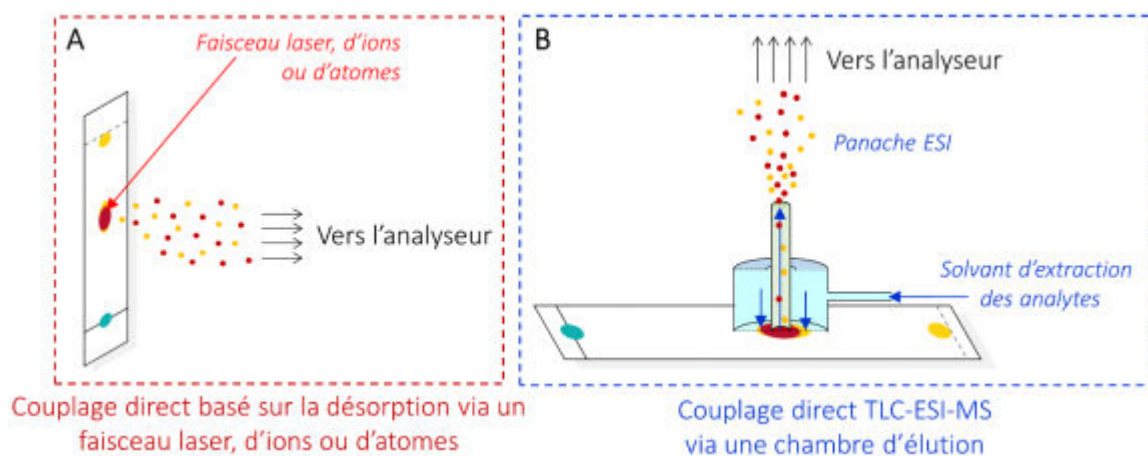


Figure A. 14 – Principaux modes de couplage utilisés dans le cadre de la TLC-MS directe selon les approches basées sur la désorption (A) ou l'élution des analytes (B).

▣ Approches TLC-MS par élution des analytes

Les couplages directs basés sur l'élution des analytes ont été conçus pour les sources d'ionisation ESI, d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) ou de photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI, *Atmospheric Pressure Photo-Ionization*). Les premières interfaces se sont développées vers la fin des années 1990 avec la mise en place de systèmes d'élution continue, telle que la flèche micro-capillaire⁹⁶, les méthodes utilisant des débits forcés⁹⁷ ou encore la TLC réalisée sur une bande étroite⁹⁸, dans une cellule couplée directement aux

sources par vaporisation. Ces différentes interfaces s'appuient sur l'élution des analytes sur la plaque TLC jusqu'à la sortie de plaque où ils sont alors transférés dans la source à l'aide d'un système de capillaires ou par vaporisation directe, dans le cas de plaques TLC modifiées se terminant par une pointe non recouverte de phase stationnaire. Si certaines de ces techniques ont montré de bons résultats pour des applications précises, ces interfaces, dont la mise en place peut se révéler fastidieuse, possèdent souvent de faibles performances, en particulier pour la capacité de détection, le signal ionique et la résolution des spectres⁸³.

Au cours de la dernière décennie, un nouveau système basé sur l'utilisation d'une chambre ou tête d'élution a été développé⁹⁹⁻¹⁰¹ et représente aujourd'hui le système de couplage le plus utilisé pour ce type d'approche. Pour ces interfaces (Figure A.14.B), une chambre d'élution vient se placer sur une zone d'intérêt de la plaque et exerce une pression sur la phase stationnaire jusqu'à ce qu'aucune fuite ne puisse se produire entre l'intérieur de la tête et l'extérieur. Un solvant d'élution est alors pompé à l'intérieur de la chambre *via* un capillaire, afin d'extraire les analytes qui sont ensuite entraînés par le solvant dans un tube de transfert vers le spectromètre de masse. Les particules du matériau adsorbant de la phase stationnaire, qui peuvent être entraînées par le flux de solvant, sont quant à elles arrêtées par un fritté à l'intérieur du tube de transfert. Ces interfaces présentent de nombreux avantages, tels que i) les possibilités d'application pour une large gamme de composés, ii) l'utilisation de faibles quantités de solvant d'extraction afin de limiter la dilution des analytes – inférieures à 100 μ L, iii) de bonnes sensibilités d'analyses similaires à celles obtenues pour les couplages HPLC-MS, iv) la possibilité de quantifier les analytes d'intérêt et v) l'automatisation de la sélection des zones extraites⁸³. Cependant, pour les systèmes commercialisés à l'heure actuelle, une étape de révélation est toujours nécessaire afin de visualiser les zones d'intérêt, pouvant apporter des pertes d'informations comme dans le cas des couplages indirects.

Les différentes techniques évoquées ici ne seront pas toutes développées dans ce manuscrit. Seul le couplage direct TLC-MALDI-MS, qui a représenté une partie importante de ces travaux, est détaillé dans la suite de cette partie.

2.2. Développements du couplage direct TLC-MALDI-MS

Au premier abord, le couplage direct entre une technique séparative et la spectrométrie de masse MALDI ne semble pas évident, notamment compte tenu de la nécessité d'utiliser une matrice co-cristallisée avec les analytes. Cependant, dans le cas de mélanges de composés déposés sans

séparation sur la cible, les composés majoritaires ou les composés répondant mieux à l'ionisation peuvent masquer la présence d'autres constituants¹⁰², provoquant ainsi une perte d'informations importante. Ainsi, l'utilisation d'une technique séparative en amont de l'analyse est parfois nécessaire afin d'obtenir une vision plus complète et plus juste de la composition d'un échantillon. Comme décrit dans la Partie 2.1, si le couplage TLC-MALDI-MS a d'abord été indirect, les développements ont rapidement mené au couplage direct des deux techniques. Ce deuxième paragraphe est donc dédié au principe et aux développements de cette approche.

2.2.1. Principe du couplage TLC-MALDI-MS

Le couplage direct TLC-MALDI-MS permet de combiner les avantages de la TLC – séparation rapide, plusieurs échantillons séparés en parallèle, pas d'effet mémoire – avec ceux de la MALDI-TOF-MS – large gamme de m/z analysables, ionisation douce^{73,74}. Cette approche permet ainsi de simplifier la préparation des échantillons pour l'analyse en MS, notamment grâce à l'introduction directe dans la source du spectromètre de masse de la plaque TLC ou d'une zone de plaque, découpée dans une grande plaque TLC (Figure A.15).

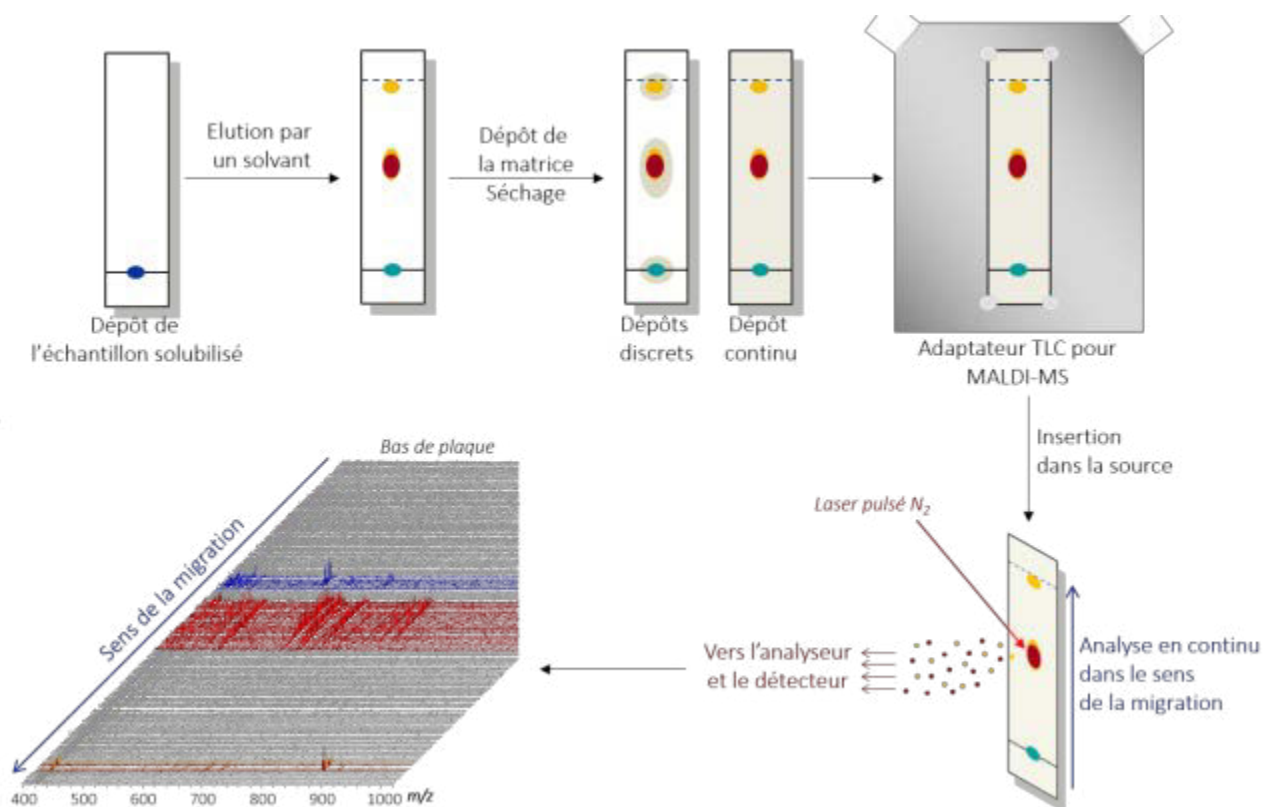


Figure A. 15 – Principe de la préparation de la plaque TLC et du couplage direct avec la MALDI-MS pour la visualisation et l'identification des composants d'un échantillon après élution par un système de solvants.

▣ Préparation de la plaque TLC

Plusieurs types de plaques existent selon les informations recherchées et la nature des composés d'intérêt. Certaines sont constituées d'une phase stationnaire de silice, d'alumine ou de cellulose par exemple, et ces phases stationnaires peuvent être supportées par différents matériaux comme le verre ou l'aluminium. Un volume de l'échantillon d'intérêt, ou d'un extrait de celui-ci, est déposé en bas de la plaque choisie, puis celle-ci est développée par l'action d'un éluant adapté. La plaque est alors séchée puis la matrice est déposée (Figure A.15). Dans les premiers travaux sur le couplage direct TLC-MALDI-TOF, ainsi que dans des travaux plus récents, une étape de révélation est réalisée avant le dépôt de la matrice, plus particulièrement lorsque celle-ci est déposée de manière discrète sur les spots d'intérêt^{89,102-105}. Un autre type de dépôt largement développé à l'heure actuelle consiste à déposer la matrice non pas sur les spots, mais sur la totalité de la plaque selon différentes méthodes comme l'immersion^{106,107}, le transfert de produit d'une surface à une autre^{90,108}, le brossage de la plaque avec la matrice¹⁰⁸ ou encore la vaporisation¹⁰⁸⁻¹¹². Ce mode de dépôt permet en général de s'affranchir de l'étape de révélation qui sera réalisée indirectement par l'analyse MS.

▣ Analyse MALDI-TOF-MS

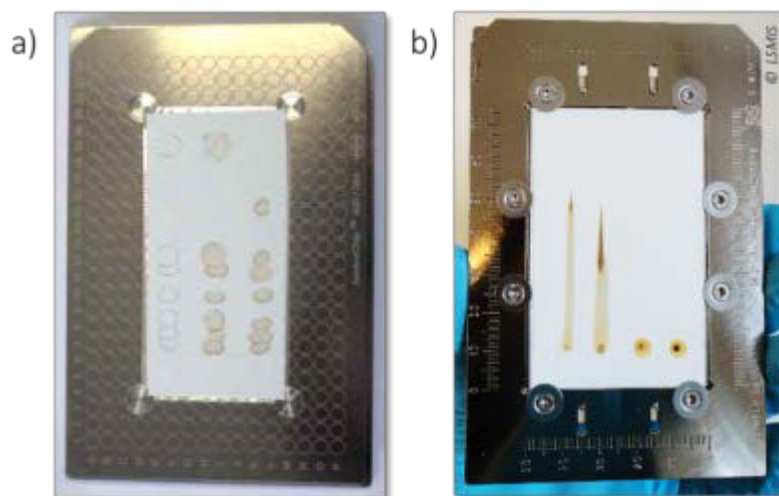


Figure A. 16 – a) Prototype Bruker Daltonics pour un adaptateur TLC-MALDI¹⁰². b) Adaptateur TLC-MALDI commercial Bruker Daltonics.

La plaque TLC préparée, ou une partie de cette plaque, est introduite dans le spectromètre de masse comme une cible MALDI classique. Dans les premières expériences, la plaque TLC était généralement fixée sur la cible. Comme expliqué ci-dessus, plusieurs types de support existent pour déposer le matériau adsorbant, cependant le support en aluminium est le plus adapté au couplage direct TLC-MALDI-MS. En effet, la source MALDI requiert un dépôt réalisé sur une surface conductrice afin de permettre la diffusion des charges électriques. D'autres types de support non conducteur peuvent malgré tout être utilisés comme dans certaines des premières expérimentations, grâce à

l'utilisation d'un adhésif conducteur pour fixer la plaque sur le support^{73,105}. Avec le développement de cette technique et sa commercialisation, des adaptateurs TLC-MALDI ont vu le jour permettant de maintenir la plaque en place dans la source¹¹³ (Figure A.16).

La suite de l'analyse se déroule de manière classique selon le principe de la MALDI-TOF-MS expliqué dans la Partie 1.1.1. Le laser vient irradier la surface de la plaque TLC où sont co-cristallisés la matrice et les analytes, provoquant ainsi leur désorption et leur ionisation en phase gazeuse (Figure A.15). Les ions produits sont séparés en fonction de leurs rapports m/z dans l'analyseur TOF puis détectés. A la différence de l'analyse MALDI classique cependant, l'échantillon n'est pas déposé sur un spot unique, mais séparé sur une ligne de plusieurs centimètres. Dans le spectromètre, la plaque se déplace, afin de désorber et ioniser en continu les analytes séparés, depuis la ligne de dépôt jusqu'au front de migration. En MALDI classique, un spectre correspond à un échantillon. En TLC-MALDI, un échantillon génère plusieurs spectres permettant d'identifier les composants de celui-ci en suivant leur séparation et de leur associer un rapport frontal. La combinaison des différents spectres obtenus pour un échantillon fournit alors une « image » de la ligne de migration, où les différentes zones d'intérêt peuvent non seulement être visualisées sans agent de révélation, mais également identifiées grâce à la mesure de leur rapport m/z (Figure A.15).

▣ Outils informatiques

La mise en œuvre des analyses dans le spectromètre de masse MALDI Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics) est gérée par un logiciel dédié. En MALDI classique, celui-ci permet la visualisation de la cible et des coordonnées des différents spots déposés afin de sélectionner l'échantillon à analyser. Les premières expériences de couplage direct TLC-MALDI utilisaient le même logiciel et les déplacements de la plaque par rapport au laser pour analyser les zones d'intérêt étaient effectués semi-manuellement en sélectionnant des coordonnées discrètes. Ce mode de sélection limitait la résolution spatiale de l'analyse et la capacité de détection des différents composés.

A l'heure actuelle, un logiciel de couplage spécifique¹¹³ – *TLCMALDI Wizard* version 1.1.7.0 – développé par Bruker Daltonics, permet l'automatisation complète de l'analyse. Il est désormais possible de programmer les différents paramètres de l'analyse. (Figure A.17)

- i) Le choix de l'échantillon à analyser (coordonnée y_m).
- ii) La longueur de la ligne d'analyse (coordonnées x_0 à x_{final}), ainsi que la distance entre chaque point pour deux spectres consécutifs. Par exemple, un pas d'analyse de 0,5 mm sur une ligne de 65 mm entre $x_0 = 5$ mm et $x_{final} = 70$ mm générera 131 spectres pour un seul échantillon.
- iii) Le nombre de tirs laser accumulés pour chaque point correspondant aux coordonnées (x_n, y_m) , avec n le numéro du spectre et m la position sur la largeur de la bande analysée.

- iv) Le nombre de points y à sommer pour un x donné (donc pour un spectre), et l'écart entre chacun de ces points y , permettant d'augmenter la capacité de détection des analytes. Par exemple, si le nombre de tirs laser est fixé à 200 tirs accumulés pour 1 y_m donné, sommer 5 y sur 5 mm pour un même x signifie que le spectre final sera obtenu par l'accumulation de 1000 tirs sur une largeur de bande de 5 mm.
- v) Les modes d'ionisation (positif ou négatif) et de détection (réflectron, linéaire ou CovalX).
- vi) La puissance du laser pour le tir.

Avec ce type de logiciel, il est même possible d'automatiser entièrement l'analyse d'une plaque composée de plusieurs échantillons différents, dans la mesure où les méthodes d'ionisation, de détection et la puissance du laser sont les mêmes pour tous les échantillons.

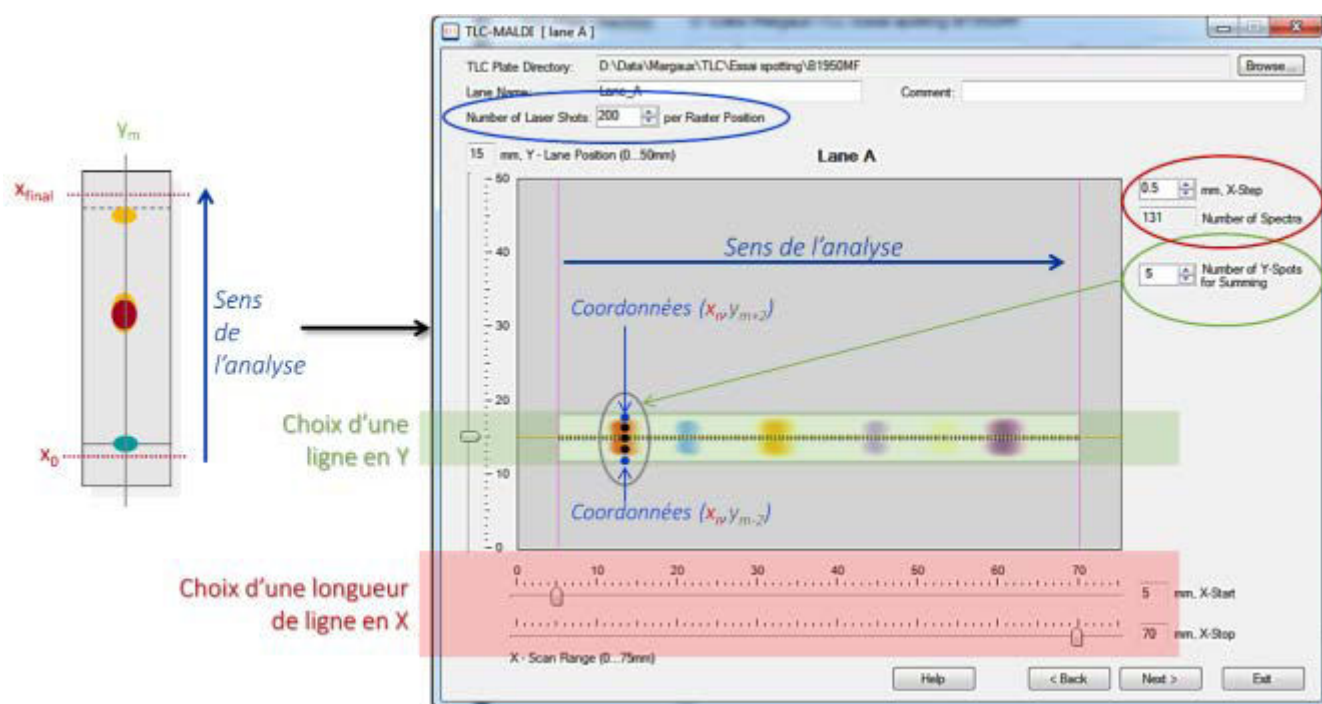


Figure A. 17 – Principe de l'automatisation de l'analyse TLC-MALDI-MS directe *via* l'utilisation du logiciel *TLCMALDI Wizard* (Bruker Daltonics). La mise au point des différents paramètres permet de choisir l'échantillon analysé et les différents paramètres selon l'axe Y (parties vertes), ainsi que le nombre de spectres MS pour cet échantillon par l'intermédiaire des paramètres selon l'axe X (parties rouges).

La mise en place de ces logiciels dédiés a ainsi donné accès à une meilleure précision et reproductibilité dans la sélection des points analysés, à une mise en œuvre technique plus rapide et simplifiée, à une meilleure capacité de détection des analytes, ainsi qu'à une meilleure résolution spatiale de l'analyse.

2.2.2. Performances et optimisations

La combinaison de la technique séparative TLC et de la spectrométrie de masse MALDI donne accès à une large gamme de composés analysables, à une sensibilité d'analyse et une capacité de détection supérieures à celles atteintes par la révélation optique, chimique ou biologique classiquement utilisée en TLC, ainsi qu'à de bonnes performances en termes de résolutions spatiales. Cependant, les sensibilités d'analyses et les limites de détection atteintes sont souvent inférieures à celles typiquement obtenues en MALDI-TOF-MS. Pour pallier à cela, différents paramètres peuvent être modifiés. Certaines voies d'optimisation sont communes aux différents adsorbants utilisés en TLC, mais d'autres sont plus spécifiques à un type de phase stationnaire donné. Dans ce paragraphe ne seront abordés que les moyens d'optimisation adaptés aux plaques TLC en silice, seule phase stationnaire utilisée au cours de ce travail de recherche.

▣ Type de plaques TLC

Le type de plaque TLC utilisée pour cette approche peut influencer de façon importante les performances de l'analyse. Les plaques peuvent être de dimensions variables, avec par exemple des grandes plaques de TLC préparative de 20 cm x 20 cm qui nécessitent un découpage en amont de l'introduction dans la source, ou des plaques de petites dimensions conçues pour s'adapter aux dimensions de la cible MALDI sans aucune modification. L'utilisation de ces dernières constitue un gain de temps de préparation non négligeable et présente l'avantage de donner accès à un *screening* rapide de la composition de l'échantillon.

Egalement, les développements des techniques de fabrication des plaques TLC ont conduit à la mise au point de plaques dites « haute performance » (HPTLC, *High Performance Thin Layer Chromatography*)^{114,115}. Celles-ci se caractérisent par une épaisseur de silice inférieure à celle des plaques TLC classiques – entre 150 et 200 μm contre environ 250 μm – et une taille de particules plus faible – moins de 10 μm contre 5 à 17 μm , ce qui permet l'obtention d'une surface plus plane. De ce fait, la qualité des analyses en MS est améliorée¹¹⁶, avec une sensibilité 5 à 10 fois plus élevée et une reproductibilité supérieure. Face à l'importance grandissante des couplages TLC-MS, des plaques dédiées à l'analyse directe par MS (*MS-grade TLC*), dites MTLC, ont aussi vu le jour, et consistent en une phase d'épaisseur plus homogène sur toute la surface que les plaques HPTLC, permettant une réduction du bruit de fond. Ces caractéristiques apportent une réduction du bruit de fond dû à la phase stationnaire et une amélioration de la sensibilité. De même, des plaques dites ultra haute performance (UTLC, *Ultra Thin Layer Chromatography*) constituées d'une fine couche de polymère monolithique – environ 10 μm – ont été développées¹¹⁷⁻¹¹⁹. Celles-ci favorisent l'obtention de sensibilités 10 à 100 fois supérieures aux plaques HPTLC, des temps de séparation plus rapides et une consommation moindre de phase mobile.

Des plaques hybrides spécialement conçues pour l'étude de peptides et de petites protéines ont été mises au point par certaines équipes. Celles-ci sont divisées en deux parties^{120,121} : i) une zone dédiée à la TLC sur laquelle sont séparés les composés et ii) une zone pour l'analyse MALDI sur laquelle la phase stationnaire a été enlevée pour ne conserver que la surface conductrice du support en aluminium. Les analytes séparés sur la première zone sont transférés orthogonalement vers la seconde par l'action d'un éluant. Ce type de méthodes permettrait la limitation de la diffusion spatiale des analytes dans la phase stationnaire lors du dépôt de la matrice.

▣ Matrice déposée

Comme pour les analyses MALDI sur cible (Partie 1.1.1), le choix et le mode de dépôt de la matrice sont deux paramètres cruciaux pour le couplage TLC-MALDI. La matrice utilisée doit être choisie en fonction de l'application recherchée et sa concentration adaptée, afin de permettre la désorption et l'ionisation en phase gazeuse des analytes.

De plus, le solvant de solubilisation de la matrice ainsi que son mode de dépôt sur la plaque sont déterminants en termes de sensibilité d'analyse et de capacité de détection, et doivent être choisis dans le but de minimiser la diffusion spatiale des composés sur la plaque. Ainsi, Fuchs et ses collaborateurs ont désigné le mélange Eau/ACN en proportions 1:1 (v/v) comme étant le plus adapté pour le dépôt de la matrice, grâce à sa tension de surface limitant la diffusion spatiale des analytes¹⁰². Quant au mode de dépôt, plusieurs sont utilisés encore actuellement :

- i) Le dépôt direct sur les spots d'intérêt. Cette méthode est particulièrement adaptée pour l'analyse d'échantillons déposés en « *spotting* », c'est-à-dire sans séparation avant analyse. Dans le cas d'échantillons séparés sur la plaque, ce type de dépôt nécessite une révélation et conduit ainsi aux mêmes risques de pertes d'informations que dans le cas des couplages indirects (Partie 2.1.1).
- ii) L'immersion de la plaque dans une cuve étroite remplie de solution de matrice saturée. Cette méthode bien qu'efficace pour la détection des analytes, favorise d'une part le risque de dispersion spatiale des analytes et d'autre part la formation d'une couche de matrice cristallisée sur le support en aluminium, réduisant de ce fait les capacités de conduction de celui-ci. De plus, l'épaisseur de la couche de matrice appliquée est difficilement maîtrisée, ce qui peut réduire les performances de détection.
- iii) La pulvérisation de la matrice sur la plaque est la dernière méthode mise en place. Ce type de dépôt permet un contrôle plus aisé de l'épaisseur de matrice déposée et de l'homogénéité du dépôt. Les équipes de recherche ont développé dans certains cas leurs propres appareils de pulvérisation et le développement de l'imagerie MALDI qui requiert une

couche de matrice très fine et très homogène a permis la mise au point d'appareils de pointe permettant de choisir l'épaisseur voulue et donc d'adapter le dépôt selon l'application.

☒ « Extraction » des analytes vers la surface de la phase stationnaire

Dans les premiers travaux sur le couplage direct TLC-MALDI-MS pour l'analyse de peptides et de petites protéines, Gusev et ses collaborateurs^{89,90} utilisaient une étape dite d'« extraction » des analytes. Cette étape consiste à placer la plaque TLC dans une cuve fermée dont l'atmosphère est saturée en solvant d'extraction, puis un film de ce solvant est déposé à la surface de la plaque pour quelques minutes, afin de faire remonter à la surface les analytes adsorbés dans les couches inférieures de la phase stationnaire, et ainsi de favoriser leur co-cristallisation avec la matrice déposée après cette étape d'extraction. Certains travaux plus récents ont également montré l'intérêt de cette extraction^{122,123}, mais la plupart des recherches récentes dédiées à l'application de l'approche à des composés généralement de bas poids moléculaires, à l'image des lipides, n'utilisent pas cette étape supplémentaire dans la préparation de la plaque. Dans les phases de mise au point de la TLC-MALDI-MS directe, la détermination de la nécessité ou non de l'extraction est donc cruciale, et ce dans le but d'atteindre les meilleures performances d'analyse possible dans le contexte d'une application donnée.

En optimisant au mieux ces différents paramètres, ainsi que le volume d'échantillon déposé et la puissance du laser, le couplage direct TLC-MALDI-MS peut ainsi être utilisé pour une grande variété d'applications, comme le montrent les différents travaux de recherches publiés ces dernières années.

2.3. Applications et enjeux

2.3.1. Précédentes applications du couplage direct TLC-MALDI-MS

Depuis son développement en 1995, la TLC-MALDI-MS a fait l'objet d'un grand nombre d'études montrant la possibilité de séparer et d'analyser avec efficacité et sensibilité une large gamme de composés.

☒ Molécules pharmaceutiques et petites molécules organiques de moins de 1 000 Da

En 1996, Nicola *et al.* a décrit l'utilisation du couplage TLC-MALDI-MS dans le cadre d'analyses quantitatives de cocaïne¹²². Dans ce contexte, et grâce à l'utilisation d'une étape d'extraction des composés, similaire à celle décrite dans le paragraphe précédent, il leur a été possible de détecter le composé d'intérêt pour une limite de détection de 60 µg. Par la suite, Mehl et ses collaborateurs ont

optimisé les paramètres d' « extraction » de petites molécules organiques¹²³, telles que la rhodamine B ou la bradikinine, définissant ainsi un temps optimal de 2 min, afin d'extraire un maximum d'analyte tout en minimisant la dispersion spatiale des composés.

Différents travaux de recherche ont également été menés sur des molécules pharmaceutiques. Les travaux de Mowthorpe¹⁰⁸, comparant l'utilisation de différents modes de dépôt de la matrice, ont démontré l'efficacité de la pulvérisation de la matrice à la surface de la plaque TLC en s'appuyant sur l'étude de tétracyclines, pour lesquelles la vaporisation de la matrice avait permis d'atteindre une LOD de 1 ng déposé. Ont ensuite suivi les recherches de Crecelius^{112,124-126} utilisant cette méthode de vaporisation de la matrice, notamment pour l'analyse quantitative du pyroxicam et du tenoxicam par TLC-MALDI-MS donnant accès à des LOD de l'ordre du fmol – au lieu du pmol précédemment. Ces dix dernières années, plusieurs cas d'études de petites molécules organiques se sont également appuyés sur le couplage TLC-MALDI-MS pour l'analyse d'alcaloïdes¹²⁷, de sidérophores¹⁰³, pour le développement d'un dépistage rapide de composants toxiques dans les fluides biologiques¹¹⁰, ou encore pour l'étude de pigments caroténoïdes¹⁰⁴. Enfin, la validation des derniers développements en terme de performances chromatographiques pour les plaques UTLC a été réalisée sur des petites molécules organiques de moins de 500 Da, telles que des triazoles ou des benzodiazépines^{118,119}.

📌 Composés lipidiques entre 300 et 2 000 Da

Bien que n'étant pas l'objet initial du développement du couplage TLC-MALDI-MS, l'analyse des lipides est devenue au fil du temps l'application privilégiée pour cette technique. Ainsi, de nombreux travaux de recherche se sont intéressés à l'étude des lipides, des phospholipides ou des glycolipides de différentes origines, telles que le jaune d'œuf^{113,114}, les cellules souches¹¹¹ et les cellules membranaires¹⁰⁵, les microorganismes¹¹⁵, ou encore les fluides ou les tissus biologiques^{109,128,129}.

Tous ces travaux ont mis en évidence la possibilité d'utiliser le couplage direct TLC-MALDI-MS pour la visualisation de différences de niveau d'expression des lipides dans le cadre de diagnostics médicaux ou pour l'identification des composants lipidiques d'une cellule, d'un tissu ou d'un fluide. Egalement, ces travaux ont montré la possibilité de détecter ces composés lipidiques pour des quantités de l'ordre de la femtomole dans le cas des lipides de cellules souches, autour de 25-50 pmol pour les glycolipides des cellules membranaires, ou encore de l'ordre de 100 pmol dans le cas des phospholipides de jaune d'œuf.

📌 Peptides et petites protéines de moins de 20 000 Da

Le couplage direct TLC-MALDI-MS a été initialement appliqué à l'étude de peptides et de petites protéines entre 1 000 et 20 000 Da^{89,90}, pour lesquelles il a été possible de descendre jusqu'à des limites de détection entre 2 et 4 ng dans le cas d'un dépôt de matrice en spots, et entre 50 et 200 pg

dans le cas d'une matrice appliquée par pression de surface. La détection de ces composés dans le cadre de ces travaux nécessitait la réalisation d'une « extraction » des analytes, afin de les faire revenir à la surface de la plaque pour qu'ils co-cristallisent avec la matrice et soient détectés en MS. Après ces travaux, peu de publications décrivent l'étude de peptides et protéines par TLC-MALDI-MS sans avoir recours à des modifications de la plaque TLC¹⁰⁷. Mehl et ses collaborateurs ont notamment appliqué cette technique à des peptides cycliques, grâce l'utilisation d'une plaque TLC hybride (Partie 2.2.2) en atteignant une LOD entre 10 et 100 fmol¹²⁰. Certains auteurs mentionnent aussi l'utilisation de phases stationnaires monolithiques de faible épaisseur constituée soit d'un polymère¹¹⁷, soit de nanoparticules de silice couvertes de polyacrylamide¹³⁰, pour la séparation de peptides et de protéines de moins de 20 000 Da.

▣ Autres molécules

La TLC-MALDI-MS directe a aussi été appliquée à d'autres types de molécules. Ainsi, certains travaux se sont concentrés sur l'analyse des carbohydrates, à l'image du travail de Dreisewerd sur l'utilisation de glycérol comme matrice pour le couplage direct TLC et MALDI-MS¹³¹. De même, Isbell a mis en évidence la possibilité d'étudier des nucléotides avec une LOD de l'ordre du pg¹³² et des travaux récents ont démontré l'utilité de la technique pour l'analyse de petits polymères, tels que des dendrimères de masse inférieure à 2 000 Da¹⁰⁶.

2.3.2. Enjeux de l'application de la TLC-MALDI-MS directe à l'étude des systèmes biologiques et archéologiques

La TLC-MALDI-MS est donc aujourd'hui largement répandue dans les laboratoires de recherche et est régulièrement appliquée à l'étude de systèmes biologiques. Cependant, les études précédentes s'intéressent à l'étude de systèmes relativement peu complexes puisqu'ils ne comportent que des composés de nature similaire (Partie 2.3.1.) – phospholipides, molécules pharmaceutiques, dendrimères, etc. – et sont soit obtenus à partir d'un mélange de produits purs commerciaux, soit après l'extraction des analytes de la matrice biologique d'origine et leur purification.

L'enjeu de cette partie des travaux de recherche a ainsi été d'appliquer ce couplage à des systèmes complexes présentant des composés de nature différente – structure, polarité, masse moléculaire, etc. Ainsi, il s'agit d'implémenter cette technique au laboratoire pour un type d'échantillons complexes : les archéomatériaux organiques et biologiques.

Le Chapitre D s'attachera donc à décrire la mise en place du couplage direct TLC-MALDI-MS au laboratoire, et son implémentation pour l'étude des systèmes biologiques et archéologiques.

3. Connaissance de la fibre capillaire

Depuis plusieurs décennies, l'intérêt des scientifiques pour l'analyse des cheveux a pris de plus en plus d'ampleur. Ceux-ci représentent en effet un puissant indicateur biologique, dont la composition reflète celle du sang dans une certaine mesure^{17,18}. Au cours de la pousse capillaire, composés acheminés par le sang, comme les métaux lourds et les molécules organiques métabolisés par l'organisme, vont s'accumuler dans la fibre, permettant ainsi un suivi en temps réel de l'exposition d'un individu à un composé donné, de la racine à la pointe du cheveu^{133,134}.

Il n'est donc pas étonnant que la fibre capillaire soit devenue au cours des dernières années une matrice de choix dans le cadre d'études toxicologiques¹³³⁻¹³⁵, environnementales^{136,137} ou encore médico-légales^{25,138}. L'étude des cheveux apporte ainsi un complément non négligeable aux analyses de sang et d'urine, notamment grâce à la possibilité d'effectuer un suivi toxicologique sur une période plus longue que quelques heures ou quelques jours, comme c'est le cas pour ces deux matrices biologiques classiques^{139,140}. De plus, dans l'industrie cosmétique, l'étude de la structure du cheveu et de ses interactions avec les produits développés constitue en enjeu crucial pour le développement de nouveaux produits adaptés aux besoins.

Afin de comprendre toutes les implications de l'intégration des composés de l'environnement ou de traitements cosmétiques, entre autres, ainsi que les processus de dégradation, il est important de connaître la fibre capillaire, sa structure et sa composition. Cette troisième partie s'attache donc à décrire les stratégies analytiques adoptées au cours du siècle dernier pour l'étude des cheveux, de leurs caractéristiques structurales, élémentaires et moléculaires, et nous nous attarderons sur les protéines, composants majoritaires de la fibre capillaire.

3.1. Etat de l'art pour l'étude du protéome de la fibre capillaire

L'étude des cheveux intéresse depuis longtemps les scientifiques, qui depuis le XIX^{ème} siècle ont cherché à comprendre et décrire leur composition et leur structure. Ainsi, avec le développement du microscope, les premières descriptions de la fibre capillaire et de sa structure générale ont été publiées vers 1870, décrivant le follicule pileux, la structure du bulbe, ainsi que la cuticule, le cortex et le canal médullaire de la tige¹⁴¹. A partir de ces descriptions, de nombreuses études ont suivi, utilisant les avancées techniques en matière d'analyse pour en apprendre toujours plus sur la fibre capillaire. Dans ce paragraphe, nous survolerons l'histoire de l'étude des protéines capillaires, depuis la détermination de la composition en acides aminés, jusqu'à l'application des stratégies de protéomique.

3.1.1. Premières recherches sur les acides aminés des cheveux.

Les premiers travaux de recherche dédiés à la compréhension de la fibre capillaire d'un point de vue moléculaire se sont concentrés sur sa composition en acides aminés. Ainsi, dès la fin des années 1920, Vickery et ses collaborateurs préparaient des hydrolysats chimiques de cheveux humains ou de laine, puis estimaient les teneurs en certains acides aminés, tels que l'histidine, la cystéine, l'arginine ou encore la lysine, à l'aide de différents procédés de précipitation des acides aminés basiques¹⁴²⁻¹⁴⁴. Dans des travaux ultérieurs, Beveridge a également mis en évidence la présence de sérine, de proline, de méthionine, d'acide aspartique et de glutamine dans les cheveux¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Dans les années 1950, le développement de nouveaux tests microbiologiques a permis de préciser les précédents résultats et de définir les teneurs exprimées dans la fibre capillaire de 19 des 20 acides aminés principaux¹⁴⁸. Par la suite, Swift a montré l'intérêt de la digestion enzymatique des cheveux pour l'obtention de fractions d'acides aminés plus propres que dans le cas de l'hydrolyse chimique moins spécifique^{149,150}.

3.1.2. Techniques séparatives et étude des cheveux

Avec le développement des techniques séparatives, telles que l'électrophorèse et la chromatographie, les études menées sur les cheveux ou la laine ont aussi évolué, présentant des compléments d'information aux analyses des acides aminés.

Rogers a ainsi publié l'un des premiers travaux de recherche sur l'identification de protéines ou de peptides de la fibre capillaire à l'aide d'une méthode séparative¹⁵¹, en démontrant la séparation et la visualisation de peptides tryptiques riches en citrulline par électrophorèse sur papier. Clarke et Rogers

ont ensuite étudié, grâce à une stratégie électrophorétique, l'efficacité d'extraction des protéines capillaires de plusieurs solutions et la séparation sur gel d'amidon des protéines riches ou pauvres en soufre¹⁵². A la fin des années 1970 et au début des années 1980, Marshall et Gillespie ont également montré l'utilité de l'application de techniques séparatives comme la chromatographie ou l'électrophorèse (1D ou 2D) dans le cadre de l'étude des protéines de poils de mammifères¹⁵³⁻¹⁵⁷.

3.1.3. Apport des avancées en protéomique pour l'étude des cheveux

Avec le développement de la spectrométrie de masse, et des stratégies génomiques et protéomiques, la connaissance de la structure et de la composition de la fibre capillaire s'est considérablement améliorée depuis la fin des années 1990. Cette connaissance s'est cependant construite majoritairement sur l'étude de laine de mouton plutôt que sur celle de cheveux humains. Bon nombre d'analyses génomiques ont mis en évidence l'origine des protéines capillaires et leurs relations phylogénétiques¹⁵⁸⁻¹⁶⁰, apportant des informations complémentaires aux études menées en protéomique des fibres kératinisées. Les travaux de recherche en protéomique se sont ainsi majoritairement tournés vers la laine, dont la composition a été largement décrite, notamment dans le cadre des travaux de Plowman et son équipe¹⁶¹⁻¹⁶⁷. Les recherches centrées sur le cheveu humain à proprement parler datent de ces dernières années et se sont basées sur les traitements des échantillons décrits pour l'étude de protéines de la laine^{167,168}.

Ainsi, les travaux de ces dernières années sur la fibre capillaire humaine se sont attachés à identifier le plus précisément possible les protéines capillaires et les éventuelles modifications post-traductionnelles existant dans le cheveu, d'origine naturelle, dues au vieillissement ou induites par différents stress environnementaux¹⁶⁹⁻¹⁷⁴. De plus, ils ont cherché à comprendre les arrangements protéiques et les interactions entrant en jeu dans la structure et la stabilité de la fibre capillaire^{175-177,63}.

Ces différents travaux depuis la fin du XIX^{ème} siècle ont de ce fait permis, non seulement d'appréhender la structure globale du cheveu et sa composition élémentaire et moléculaire, mais également de mieux comprendre sa structure et les facteurs déterminants de sa robustesse.

3.2. Structure et composition de la fibre capillaire

La fibre capillaire se forme dans le cuir chevelu à l'intérieur des follicules capillaires contenant le bulbe, appelé plus communément « racine », qui est alimenté par le sang *via* la papille (Figure A.18). A

la base du bulbe, les cellules souches, les kératinocytes, sont regroupées dans la zone matricielle où elles prolifèrent jusqu'à atteindre leur niveau maximum de multiplication cellulaire. Les kératinocytes vont alors se différencier en trois types de cellules :

- i) les cellules cuticulaires sur l'extérieur du bulbe,
- ii) les nombreuses cellules corticales à l'intérieur,
- iii) les cellules médullaires au niveau de la papille et qui seront intégrées au centre de la fibre pendant la croissance.

Ces kératinocytes différenciés vont produire les protéines capillaires et prendre la forme spécifique à leur fonction au cours de l'étape de maturation, ou kératinisation. Les mécanismes de multiplication cellulaire qui se poursuivent à la base du bulbe repoussent progressivement les cellules différenciées vers le haut, ce qui provoque la croissance de la tige. A environ 500 μm de la zone matricielle, les kératinocytes atteignent la fin de la zone de kératinisation, marquant ainsi leur mort cellulaire. Dans la suite de sa croissance, la tige traverse finalement différentes étapes de consolidation, déshydratation et cornification permettant la libération du cheveu, qui est alors lubrifié par les glandes sébacées pour faciliter sa sortie du cuir chevelu.

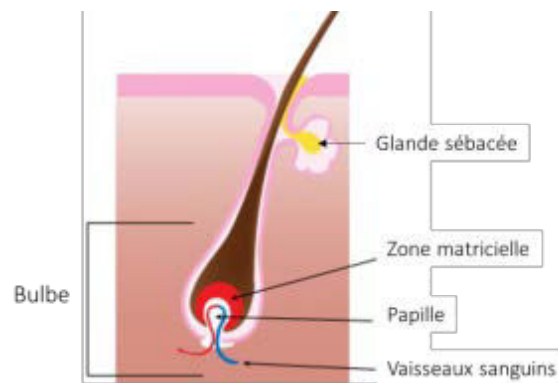


Figure A. 18 – Schéma d'un follicule capillaire contenant un bulbe pileux à l'origine de la naissance du cheveu.

Le cycle de croissance de la fibre capillaire se divise en trois phases. La première, décrite ci-dessus, correspond à la phase de croissance, dite phase « anagène », et peut durer entre 3 et 5 ans à un rythme d'environ 1 cm par mois¹⁷⁸. A l'arrêt de la croissance, le cheveu entre dans les phases dites « catagène » et « télogène », qui durent quelques mois seulement, au cours desquelles la taille du follicule pileux régresse à mesure que le bulbe se détache de la papille et migre vers la surface du cuir chevelu, provoquant la chute du cheveu. Ainsi, à tout moment, dans la chevelure d'un individu, ces trois phases coexistent, avec environ 90 % de la masse capillaire en phase « anagène » et les 10 % restants en phase « catagène » ou « télogène ».

Le cheveu obtenu représente un biomatériau complexe et unique, tant par sa structure que par ses propriétés physiques, chimiques, mécaniques et biologiques, qui lui confèrent une exceptionnelle

résistance. Dans les paragraphes suivants, nous décrivons les différentes composantes de ce matériau participant à cette robustesse, ainsi que la composition globale du cheveu.

3.2.1. Morphologie de la fibre capillaire

Le cheveu formé au cours de la croissance capillaire consiste en une fibre d'un diamètre entre 15 et 150 μm selon l'individu et constituée de trois zones concentriques (Figure A.19)^{178,179}.

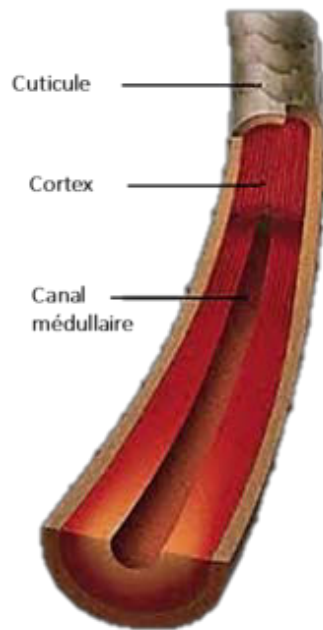


Figure A. 19 – Structure globale de la fibre capillaire.

▣ Le canal médullaire

Le canal médullaire représente la partie centrale du cheveu, qui peut être continue, discontinue ou inexistante, selon le type de cheveu. Elle se compose d'un tube étroit rempli d'air et de cellules libres, mais sa composition est encore peu décrite. Sa présence ou son absence peut jouer sur certaines propriétés physiques, et plus particulièrement sur la réflexion de la lumière, apportant ainsi des nuances dans la coloration du cheveu¹⁸⁰.

▣ Le cortex

Le cortex, qui englobe le canal médullaire, forme le corps de la tige capillaire et constitue 80 à 90 % de la masse du cheveu. Il est composé d'un arrangement de macrofibrilles, cellules allongées formées par les arrangements structurés des protéines capillaires, sur lesquels nous reviendrons par la suite.

▣ La cuticule

Le cortex est enfermé dans une enveloppe externe robuste, la cuticule, composée de plusieurs couches d'écailles protectrices superposées (Figure A.20) – typiquement entre 5 et 10 dans le cheveu humain. Ces écailles carrées, d'environ 50 µm de côté et 0,5 µm d'épaisseur, possèdent une structure stratifiée (Figure A.21) selon différents niveaux composés de protéines, lipides et carbohydrates. Les trois principaux niveaux sont :

- i) l'épicuticule, à la surface de l'écaille,
- ii) l'exocuticule constituant la partie supérieure de la cellule,
- iii) l'endocuticule constituant la partie inférieure.

Ces cellules cuticulaires superposées sont orientées vers la pointe de la tige et sont séparées les unes des autres par le complexe cellulaire membranaire (CMC, *Cell Membrane Complex*), matrice lamellaire lipido-protéique constituant la couche δ et liée aux écailles par l'intermédiaire d'une couche lipidique, la couche β.

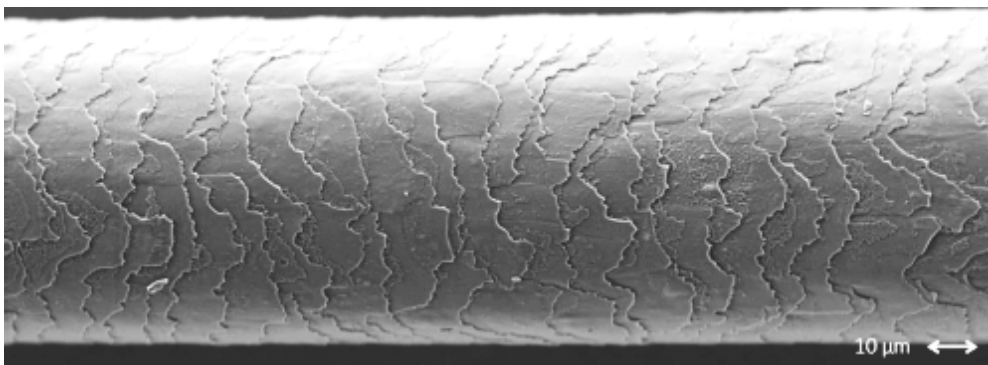


Figure A. 20 - Photographie au microscope électronique à balayage d'un cheveu humain (Grossissement x600) permettant de visualiser l'arrangement des écailles de cuticule à la surface.

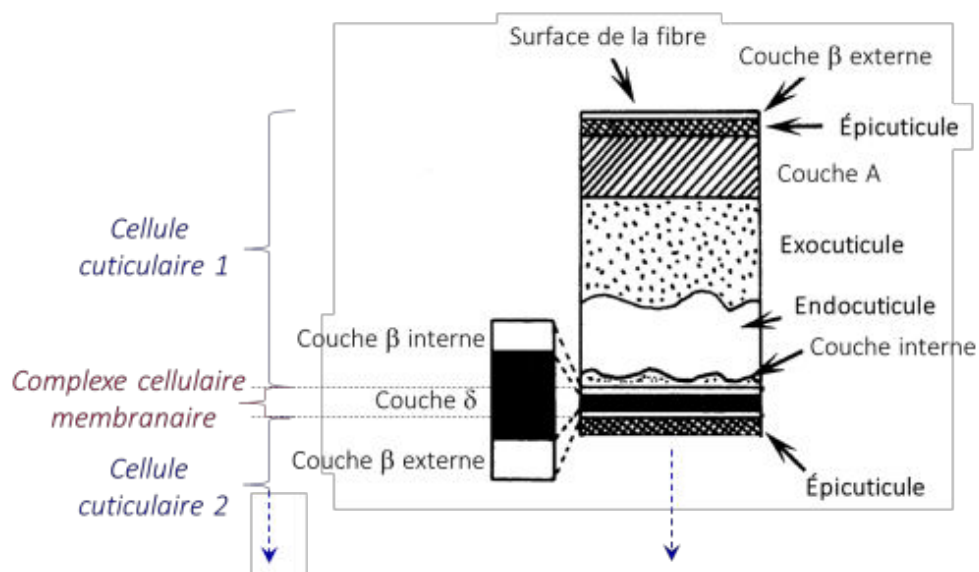


Figure A. 21 – Représentation schématique de la stratification d'une écaille de la cuticule du cheveu¹⁷⁸.

3.2.2. Composition et structure moléculaire

D'un point de vue moléculaire, les cheveux sont composés d'eau, de mélanines, de lipides et de protéines.

☒ L'eau

Comme tout tissu biologique, l'eau est un constituant important du cheveu et peut influencer sur les propriétés physico-chimiques et mécaniques de la fibre, et notamment sur sa résistance. La teneur en eau d'un cheveu varie en fonction de l'humidité du milieu environnant d'un individu, mais elle est généralement inférieure à 30 %.

☒ Les mélanines et la pigmentation capillaire

Ces molécules sont des biopolymères multifonctionnels et polymorphes, qui se retrouvent dans la fibre capillaire à la périphérie du cortex, sous forme de granules de 200 à 800 nm de diamètre assurant la pigmentation du cheveu. Ces pigments sont synthétisés à partir de la L-tyrosine, par action enzymatique de la tyrosinase¹⁸¹. Ainsi, selon la présence ou non de cystéine dans le processus de synthèse, deux types de mélanines peuvent être produites, respectivement l'eumélanine et la phéomélanine (Figure A.22).

- i) Les eumélanines sont des biopolymères lourds azotés de couleur brun-noir, qui sont insolubles dans la plupart des solvants.
- ii) Les phéomélanines présentent quant à elles une plus faible polymérisation et une coloration jaune-roux. Ces polymères sont caractérisés par des teneurs variables en azote et en soufre, et peuvent être solubilisés en milieu basique.

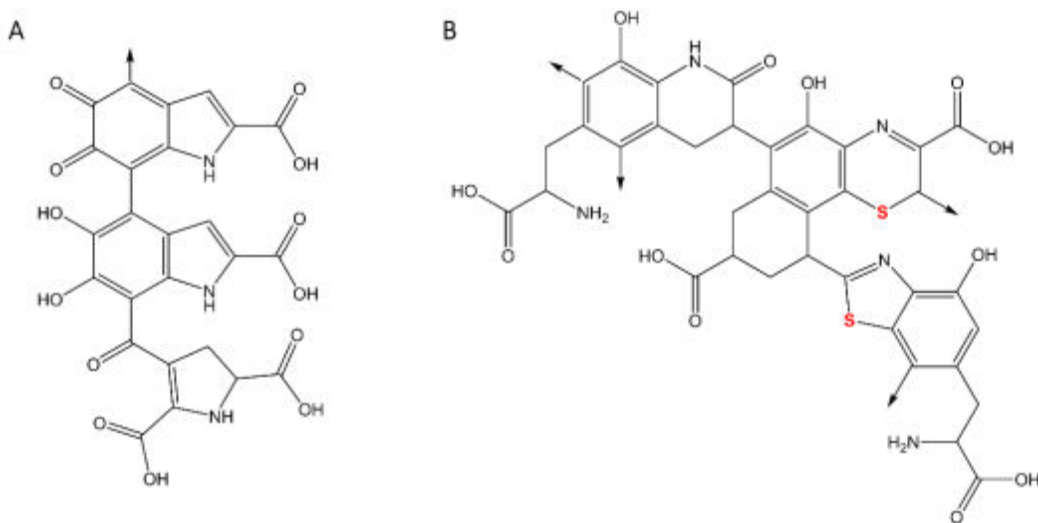


Figure A. 22 – Formules chimiques des deux formes de mélanines: A) l'eumélanine et B) la phéomélanine.

Dans les cheveux humains, ces deux pigments cohabitent. Les différences de couleurs de cheveux observées tiennent alors des teneurs relatives en l'un ou l'autre de ces biopolymères : une variation mineure pouvant entraîner une différence de couleur importante.

Dans leur environnement, ces molécules sont liées aux protéines *via* des liaisons covalentes et les isoler en vue d'une analyse peut donc s'avérer délicat. De plus, elles peuvent parfois jouer un rôle dans la fixation de substances chimiques ou pharmaceutiques dans la fibre capillaire.

▣ Les lipides, une barrière hydrophobe protectrice

Les lipides représentent entre 1 et 9 % de la masse totale du cheveu selon l'âge, le sexe ou l'origine de l'individu. Ils sont répartis dans toute la fibre, entre la partie externe du cortex, la cuticule ou le canal médullaire.

Leur composition n'a pas été complètement élucidée, mais les composants majoritaires sont cependant connus. Ainsi, les lipides des cheveux humains seraient des lipides libres, tels que les acides gras saturés palmitique 16:0 (17 %) et stéarique 18:0 (10 %), et l'acide gras insaturé oléique 18:1 (5 %), ainsi qu'un lipide structural, l'acide 18-méthyléicosanoïque 21:0 (48 %)^{180,182}.

L'acide 18-méthyléicosanoïque est le composant principal des lipides structuraux présents dans le complexe cellulaire membranaire et dans l'épicuticule (Figure A.21). Ces acides gras forment ainsi une enveloppe jouant le rôle de barrière hydrophobe pour la protection de la cuticule, aussi bien en milieu humide, en empêchant un trop grand enrichissement en eau, qu'en milieu sec, en limitant l'évaporation de l'eau.

▣ Les protéines, molécules structurantes de la fibre capillaire

Les protéines constituent les composés majoritaires du cheveu, puisqu'elles représentent 80 à 90 % de la masse totale de la fibre. Les arrangements protéiques dans le cortex et les différentes interactions existant dans ceux-ci sont à l'origine de la forte cohésion de la fibre (Figure A.23)^{177,178}.

- i) Les protéines capillaires majoritaires, les kératines, sur lesquelles nous reviendrons plus en détails dans la suite de cette partie, ont une structure hélicoïdale droite (hélice- α) caractérisée par un nombre moyen de 3,6 acides aminés par tour et par la présence de liaisons hydrogène entre le groupement -NH de l'acide aminé en position n et le groupement -CO de l'acide aminé en position $n+4$, selon le modèle de Pauling et Corey¹⁸³ (Figure A.23).
- ii) Ces hélices- α s'associent deux à deux parallèlement pour former des super-enroulements hélicoïdaux, dont la cohésion est maintenue grâce aux heptades, suite périodique de 7 acides aminés a, b, c, d, e et f dans les brins. Dans cette séquence, a et d sont apolaires et leur proximité inter- et intrahélice produit des effets hydrophobes. De plus, e et g sont

chargés respectivement positivement et négativement, ce qui génère des interactions ioniques entre les deux hélices (Figure A.24).

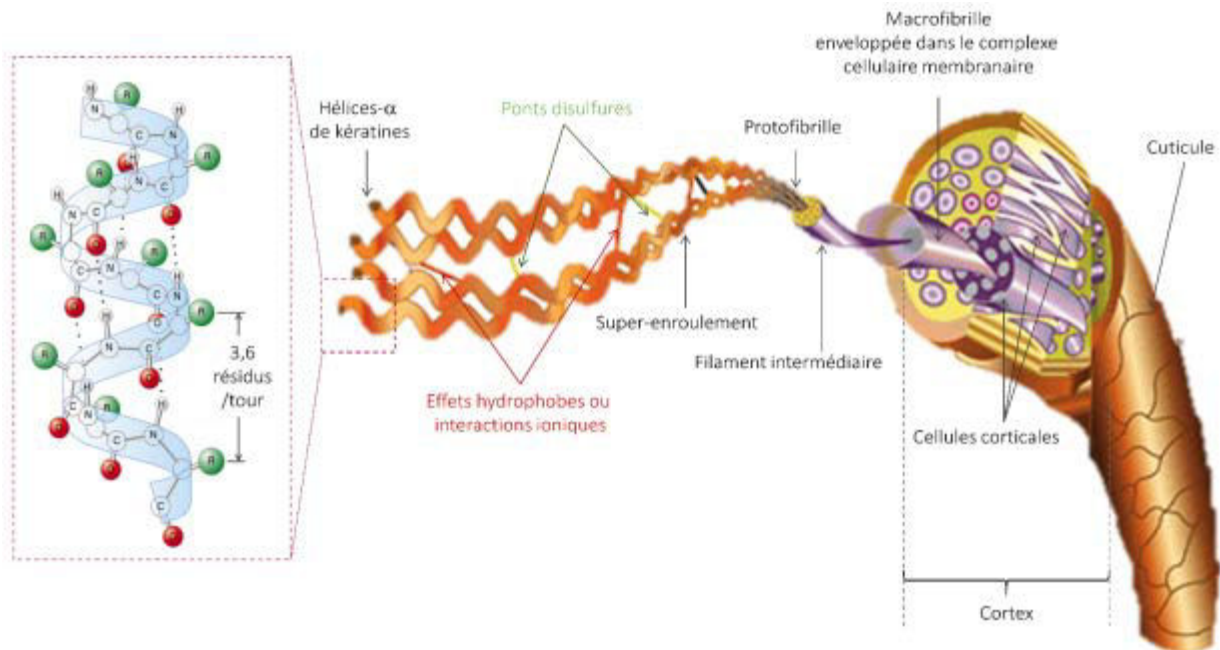


Figure A. 23 - Représentation schématique de la structure supramoléculaire d'une fibre capillaire¹⁷⁷.

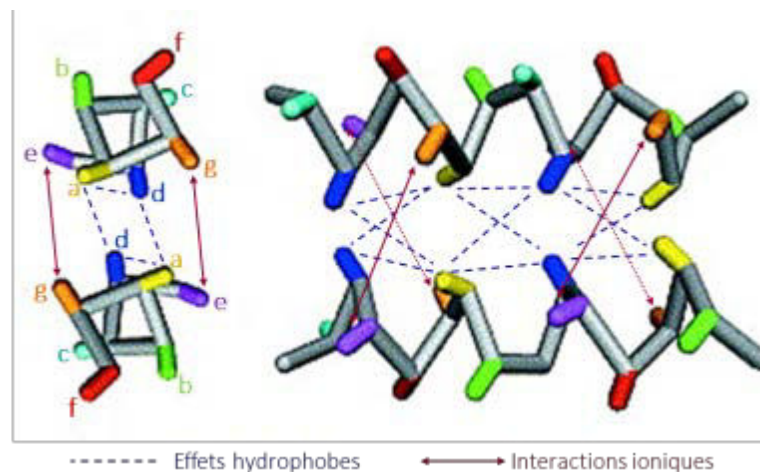


Figure A. 24 – Représentations 2D et 3D des heptades et des interactions stabilisant le super-enroulement hélicoïdal. (Adapté de Burkhard *et al.*¹⁸⁴)

- iii) Les super-enroulements s'arrangent ensuite de façon antiparallèle en filaments cylindriques tétramériques ou protofibrilles.
- iv) 7 ou 8 protofibrilles se regroupent en une hélice inclinée – soit une trentaine de kératines – et forment les kératines des filaments intermédiaires (KIF, *Keratin Intermediate Filament*).
- v) Les KIFs s'allongent, se compactent en filament de 8 à 10 nm de diamètre et se regroupent en macrofibrilles constitutives du cortex, selon un arrangement hexagonal dans le plan perpendiculaire à la fibre et maintenu par l'action d'une matrice intermicrofibrillaire riche en soufre.

vi) Deux types d'arrangements macrofibrillaires peuvent être observés dans le cortex du cheveu humain. Dans le premier cas, les macrofibrilles sont très proches les unes des autres et se regroupent dans des zones appelées « paracortex ». Dans le second cas, elles sont entremêlées dans une matrice intermacrofibrillaire et dans le complexe cellulaire membranaire formant ainsi l'orthocortex¹⁸⁰.

Tableau A. 3 – Teneurs en acides aminés typiques d'un cheveu et comparaison avec les teneurs observées dans les protéines¹⁸².

	Masse moléculaire (g/mol)	% molaire	% molaire moyen typique des protéines
Cystéine	103,009	17,7	1,7
Acide cystéique	169,156		
Serine	87,032	12,0	6,9
Glutamine	128,059	11,6	6,2
Proline	97,053	7,7	5,1
Thréonine	101,048	7,5	5,8
Arginine	156,101	6,0	5,7
Leucine	113,084	5,9	9,0
Valine	99,068	5,6	6,6
Glycine	57,021	5,6	7,2
Asparagine	114,043	5,1	5,3
Alanine	71,037	4,3	8,3
Isoleucine	113,084	2,9	5,2
Lysine	128,095	2,4	5,7
Tyrosine	163,063	2,1	3,2
Phénylalanine	147,068	1,6	3,9
Histidine	137,059	0,9	2,2
Méthionine	131,040	0,6	2,4
Tryptophane	186,079	0,5	1,3
Citrulline	175,186	0,1	-

D'un point de vue global, la composition moléculaire type d'un cheveu en fonction des principaux acides aminés existants est donnée dans le Tableau A.3. Par rapport aux teneurs moyennes observées dans les autres protéines, certains acides aminés sont sous-exprimés quand d'autres sont plutôt surexprimés, à l'image des glutamines et des sérines. La différence majeure dans la composition du cheveu provient cependant de la quantité importante de cystéines ou dérivés des cystéines dans le

cheveu, puisque ces résidus représentent une teneur 10 fois plus importante que dans les autres protéines. Cette surexpression est majoritairement due à la contribution des ½ cystines engagées à 95 % dans des ponts disulfures et assurant la cohésion de la fibre.

3.2.3. Composition élémentaire

▣ Eléments majoritaires

Comme tout biomatériau à base de protéines, les cheveux sont composés principalement de carbone, d'hydrogène et d'oxygène, ainsi que d'azote et de soufre, dont les teneurs sont données dans le Tableau A.4.

Tableau A. 4– Teneurs des composants élémentaires majoritaires d'un cheveu type¹⁸².

	C	N	O	H	S
Composition d'un cheveu hydraté					
% molaire	26,3	6,9	14,3	51,4	1,0
% massique	43,3	13,3	31,4	7,1	4,5
Composition d'un cheveu sec					
% molaire	31,3	8,2	10,7	48,5	1,2
% massique	49,9	15,3	22,8	6,5	5,1

▣ Eléments traces

Tableau A. 5 – Eléments traces dont la teneur est supérieure à 1 ppm dans la fibre capillaire¹⁸².

Teneurs min-max (ppm)		Teneurs min-max (ppm)	
Ca	250-5000	Si	0-90
Cl	100-4000	Br	3-50
K	100-2000	Mn	0.2-50
Na	25-1000	I	0,1-25
Mg	25-400	Sr	6-20
Zn	50-250	Pb	1-20
Cu	50-250	Al	1-10
P	100-200	Ni	1-5
Fe	5-120	Cr	0,4-2

La fibre capillaire est également caractérisée par la présence d'éléments traces (Tableau A.5), tels que le calcium, le chlore, le sodium, le potassium, le magnésium, ainsi que le zinc pour les éléments majoritaires.

Egalement, d'autres éléments constituent typiquement le cheveu à des teneurs supérieures à 1 ppm, comme des halogènes, ou encore des métaux lourds et de transition (Tableau A.5).

3.2.4. Différenciation ethnique de la fibre capillaire

A première vue, les cheveux humains présentent une grande diversité selon les ethnies, tant au niveau de la couleur, que de la texture, de la taille ou de la forme (Figure A.25). Ainsi, ils sont communément répartis en trois groupes : i) caucasiens, ii) asiatiques et iii) africains, selon différents paramètres, tels que le diamètre de la fibre, la forme de la section transversale, la forme générale, i.e. raide ou frisé, la teneur en eau, etc. Par exemple, un cheveu européen sera plus clair et plus rond qu'un cheveu africain, avec une cuticule plus fine et un canal médullaire moins présent.

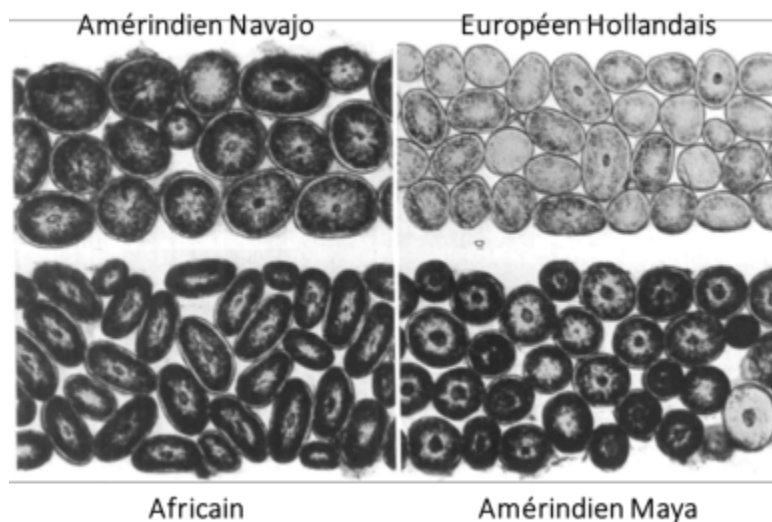


Figure A. 25 – Photographies de sections transversales de cheveux de quatre individus de différentes origines montrant les différences de formes, de structure et de coloration des différentes ethnies¹⁸⁵.

En opposition à ces différences ethniques externes, la composition moléculaire et structurelle des fibres capillaires des cheveux humains est très similaire pour les individus de toutes ethnies. Ainsi, Tobin mentionne la réalisation d'expériences de diffraction des rayons X ayant mis en évidence une structure similaire pour des cheveux asiatiques, européens et africains¹⁸⁰. De plus, la composition moléculaire des cheveux humains de manière générale, notamment concernant les protéines capillaires, semble être la même quelle que soit l'origine de l'individu, et ce malgré des conditions environnementales, un régime alimentaire et un mode de vie différents.

Les cheveux sont donc un biomatériau unique et complexe dans lequel coexistent différentes familles de composés qui interagissent les uns avec les autres. Dans le cadre de ce travail de thèse, il s'agira principalement d'étudier les protéines capillaires, leurs altérations, ainsi que leurs interactions avec des éléments exogènes, à l'image des métaux lourds. Dans la suite de cette partie, nous nous intéresserons donc plus en profondeur à ces constituants majeurs de la fibre capillaire, les protéines.

3.3. Protéome de la fibre capillaire

Comme mentionné dans la partie 3.2.2., les protéines représentent en général 80 à 90 % de la masse capillaire. Leur expression dans les kératinocytes au cours de la phase de kératinisation conduit à la production de différents types de protéines : les kératines, les protéines associées aux kératines (KAPs, *Keratin Associated Proteins*), et les autres protéines présentes dans la fibre capillaire.

3.3.1. Les kératines capillaires

Les kératines, ou KIFs, constituent une large famille de protéines fibreuses constituant une grande partie des matériaux biologiques servant à isoler et protéger le corps de l'environnement extérieur. Elles sont ainsi présentes principalement dans les phanères des animaux, c'est-à-dire la peau, les ongles, les cornes, les plumes, le bec, ou les poils.

▮ Classification

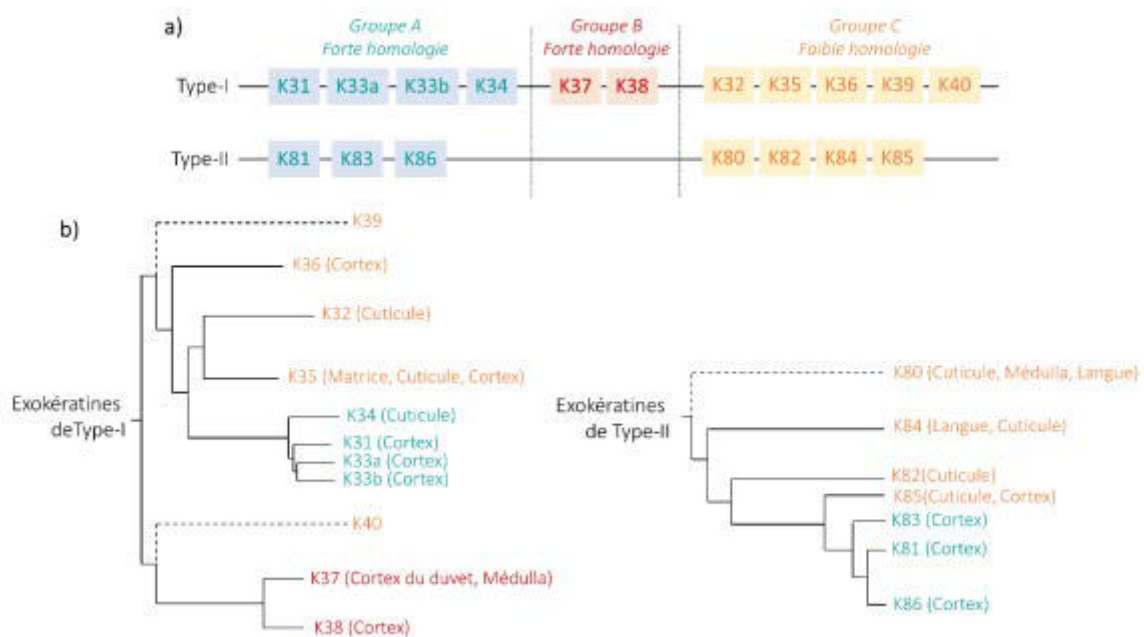
Le terme « kératine » à proprement parler désigne la totalité des protéines de cette vaste famille protéique multigénique. Celle-ci se divise en deux sous-familles, les kératines- α présentes chez les mammifères, et la kératine- β , plus rigide que la précédente, qui se retrouve principalement au niveau de la peau des oiseaux et des reptiles. Les kératines- α se différencient quant à elles en deux groupes¹⁶⁸ :

- i) Les cytokératines, ou kératines « molles », constituant principalement les tissus épithéliaux, qui regroupent deux types de KIFs : les cytokératines de type-I, protéines acides, et celles de type-II, protéines neutres ou basiques. Ce groupe est formé par les protéines désignées KRT1 à KRT21.
- ii) Les exokératines, ou kératines « dures », protéines des ongles, des poils et des cheveux, qui, comme les cytokératines, peuvent être acides – protéines de type-I, ou neutres et basiques –

protéines de type-II. Ce sont ces protéines qui nous intéressent plus particulièrement dans le cadre de ces recherches.

Au début des années 1990, seules huit exokératines étaient connues : 4 protéines acides (pKi = 4-6) désignées Ha1 à Ha4 et 4 protéines basiques (pKi = 6-8), Hb1 à Hb4 – ‘H’ pour *hair*, ‘a’ pour acide et ‘b’ pour basique¹⁸⁶. Depuis, de nouvelles protéines ont été caractérisées, portant ainsi le nombre d’exokératines à 18^{169,187-189}, et une nouvelle nomenclature a été mise en place¹⁹⁰. Les deux types de kératines capillaires sont donc définis de la manière suivante, selon le catalogue des kératines capillaires humaines de Langbein et la base de données des filaments intermédiaires humains de Szeverenyi ¹⁹¹ :

- i) 11 membres de type-I de masse moléculaire comprise entre 40 et 48 kDa et désignés par les identifiants K31 à K40 : K31, K32, K33a, K33b, K34, K35, K36, K37, K38, K39 et K40.
- ii) 7 membres de type-II de masse moléculaire comprise entre 55 et 60 kDa et désignés par les identifiants K80 à K86 : K80, K81, K82, K83, K84, K85 et K86.



Chacun de ces types peut également être divisé en trois sous-groupes : A, B et C. Au sein des sous-groupes A et B, les exokératines présentent de fortes homologies de séquence, mettant ainsi en évidence un groupe génétique commun, ce qui n’est pas le cas pour les membres du sous-groupe C^{169,187} (Figure A.26). La classification initiale n’inclut pas les dernières kératines séquencées – K39, K40 et K80, mais il est cependant possible de les classer dans le groupe C présentant de faibles homologies de séquence¹⁸⁸.

Il est important de noter également la localisation spécifique de certaines exokératines. Les kératines K32, K34, K80 et K82 ne sont pas exprimées dans le cortex et sont caractéristiques de la cuticule. De même, K37 et K84 n'ont été que peu décrites dans la fibre capillaire, K37 étant principalement observée dans les poils constituant le duvet et K84, au niveau de la langue.

Ce travail de thèse s'attache plus particulièrement à l'étude des exokératines. Pour plus de simplicité, l'utilisation du terme « kératines capillaires » dans la suite du manuscrit désignera donc les exokératines de type-I et de type-II exprimées dans les cheveux humains. S'il y a lieu, les cytokératines seront désignées comme telles.

▣ Structure

Les molécules de kératines consistent en une partie centrale de structure hélicoïdale- α et divisée en 4 sections – 1A, 1B, 2A et 2B (Figure A.27.a.). A l'intérieur de celles-ci, la séquence en acides aminés reproduit un motif de 7 résidus (a, b, c, d, e, f, g) appelé heptade (partie 3.2.2. Figure A.24), à l'exception d'une zone dite de bégaiement – *stutter* – dans la partie 2B, où une interruption de ce motif est observée. Ces 4 segments sont séparés les uns des autres par 3 liens non hélicoïdaux – L1, L12 et L2 – ne suivant pas le motif des heptades¹⁹². Aux parties N- et C-terminales se trouvent deux ou trois sous-domaines : H1 (KIFs de type-I et -II) et H2 (KIFs de type-II seulement) sont directement reliés aux sections 1A et 2B, puis viennent les sous-domaines V1 et V2, et enfin E1 et E2. H1 et H2 jouent un rôle primordial dans la formation des super-enroulements de kératines puisqu'ils permettent l'ajustement moléculaire précis des deux brins. Le rôle des autres sous-domaines est en revanche moins clair. Ces sections terminales présentent une séquence répétitive du type $(x, y)_n$, où x est une longue chaîne aliphatique ou un résidu aromatique, y est en général une glycine, ou parfois un résidu hydrophile comme une sérine, et n peut varier de 3 à 32. Ces sous-domaines s'arrangent selon une conformation globulaire, dite « *glycine-loop* », dans laquelle l'association des résidus hydrophobes entraîne la formation d'une boucle contenant les résidus Gly. La présence de cette extrémité globulaire flexible et insoluble peut fortement influencer la flexibilité, mais aussi la solubilité des KIFs. Par exemple, les cytokératines de la peau K1 et K10 comportant une boucle de glycine importante représentent les KIFs les plus insolubles connus, et contribuent à la souplesse et à la résistance de la couche supérieure de l'épiderme.

Comme expliqué précédemment, ces molécules de kératines s'associent parallèlement deux à deux en super-enroulements hélicoïdaux, constituant la base des KIFs. Ces dimères sont formés non pas de deux brins du même type, comme pour les autres protéines des filaments intermédiaires (IFP, *Intermediate Filament Protein*), mais d'un brin de type-I et d'un brin de type-II, ce qui constitue le caractère unique des KIFs vis-à-vis des autres IFPs. Les KIFs résultent de l'association de protofibrilles,

tétramères produits par l'association de deux dimères de kératine selon trois modes antiparallèles et un mode parallèle¹⁹² (Figure A.27.b.).

- i) Le mode A_{12} consiste en l'association antiparallèle de deux super-enroulements selon un alignement axial des deux dimères.
- ii) Le mode antiparallèle A_{11} s'appuie sur l'alignement de la section 1B de chaque dimère.
- iii) Le mode A_{22} , dernier mode antiparallèle, consiste en l'alignement des segments 2B.
- iv) Le mode A_{CN} est le seul mode d'association parallèle pour la formation des protofibrilles.

Dans ce cas, les dimères de kératine se superposent au niveau de la partie C-terminale du premier et de la partie N-terminale du second, de sorte que les 10 derniers acides aminés de la section 2B du premier dimère recourent les 10 premiers acides aminés du segment 1A du second dimère.

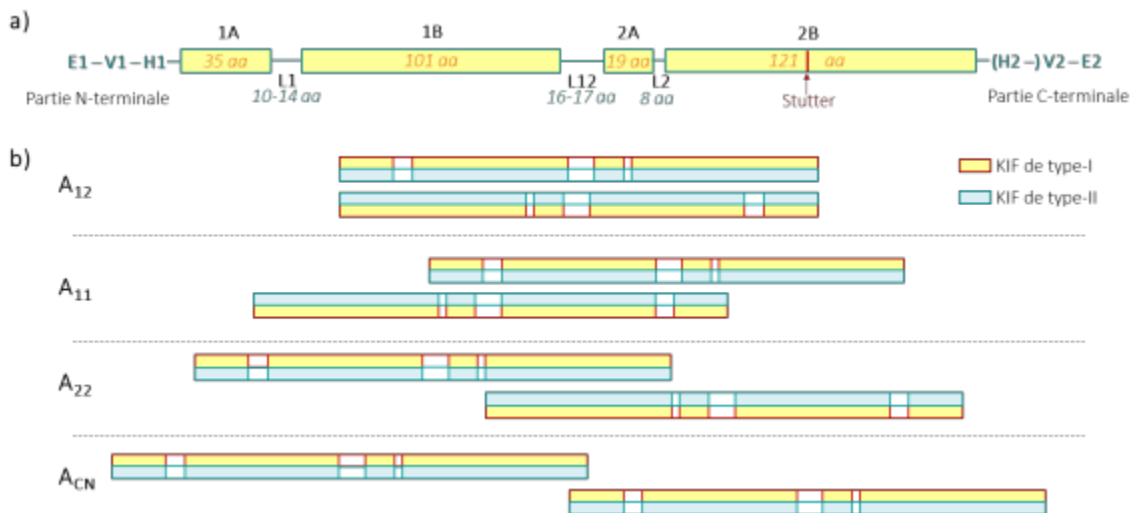


Figure A. 27 – a) Structure schématique d'une molécule de kératine. Les rectangles jaunes symbolisent les segments en hélice- α séparés par les liens non-hélicoïdaux. Les longueurs de chaque partie sont proportionnelles au nombre d'acides aminés. b) Représentation des quatre modes d'association antiparallèle ou parallèle des super-enroulements lors de la formation des protofibrilles tétramériques. Adapté de la revue de Steinert sur les KIFs¹⁹².

3.3.2. Autres protéines capillaires

Les kératines capillaires ne sont pas les seules protéines constituant le cheveu. D'autres protéines, décrites dans ce paragraphe, participent également à la structure et à la cohésion de la fibre ou à différentes fonctions secondaires.

▣ Les protéines associées aux kératines

La matrice inter-filamentaire, qui assure le maintien des KIFs à l'intérieur des macrofibrilles, renforçant ainsi la cohésion de la fibre capillaire, est composée de KAPs, second groupe de protéines majoritaires du cheveu. Leur structure tertiaire reste à l'heure actuelle méconnue, mais les avancées

de la recherche sur le cheveu humain ont d'ores et déjà permis de décrire ces petites protéines hydrophobes dont la masse moléculaire est comprise entre 5 et 54 kDa. Ainsi, une centaine de KAPs, issues d'une vingtaine de familles principalement multigéniques, ont été mises au jour depuis le début des années 90¹⁶⁰. Initialement réparties en trois groupes selon leur teneur en certains acides aminés, la classification des KAPs a été affinée par Powell et Rodgers, en définissant des sous-groupes regroupant les protéines d'une même famille multigénique et donc possédant une forte homologie de séquence¹⁷¹. Dans la suite de ce paragraphe, nous détaillerons ces trois groupes de KAPs. La nomenclature utilisée se présente sous la forme KAPx.y, avec x, le numéro identifiant la famille multigénique d'origine, et y, le numéro identifiant la protéine en question¹⁹³ (Figure A.28).

- i) Le premier groupe réunit les familles de protéines dont la teneur en cystéine est supérieure à 30 % molaire, ce sont les KAPs très riches en soufre (UHS KAPs, *Ultra-High Sulfur content KAPs*), de poids moléculaire entre 10 et 20 kDa et réparties en 5 familles.
- ii) Le groupe des KAPs riches en soufre (HS KAPs, *High Sulfur content KAPs*), se caractérise par des protéines dont la teneur en cystéine est inférieure à 30 % molaire. Les HS KAPs ont un poids moléculaire compris entre 10 et 54 kDa et se divisent en 15 familles différentes.
- iii) Les KAPs riches en glycine et tyrosine (HGT KAPs, *High Glycine and Tyrosine content KAPs*), ont une teneur en glycine et tyrosine élevée, comprise entre 35 et 60 %. Ce sont les plus petites protéines de la matrice interfilaire avec un poids moléculaire compris entre 5 et 9 kDa. Elles sont quant à elles réparties en 7 familles.

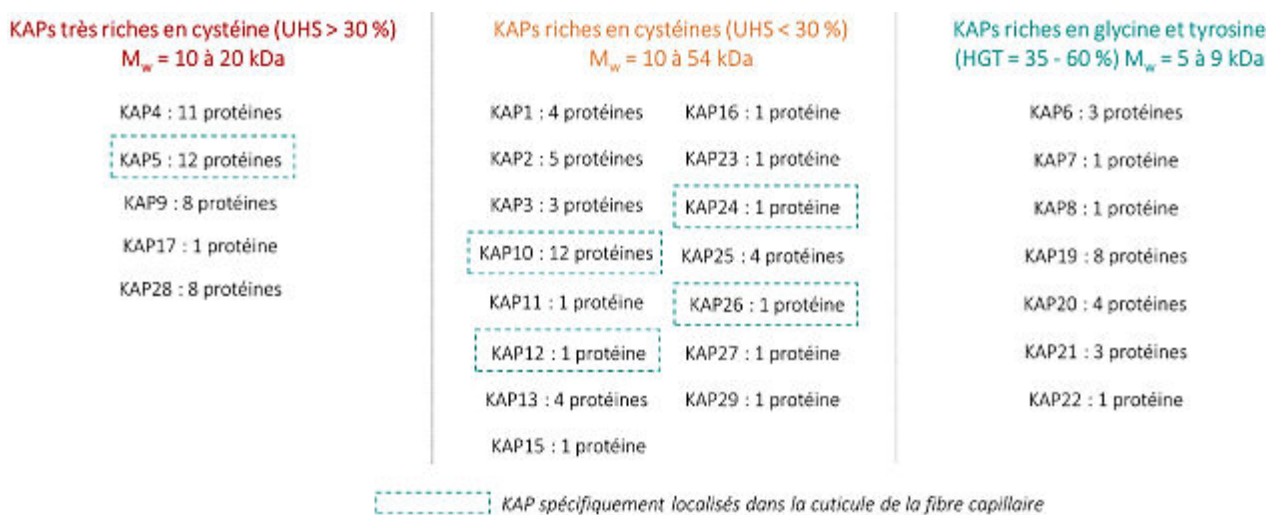


Figure A. 28 – Classification globale et affinée des protéines associées aux kératines (KAPs)¹⁷⁷.

▣ Les protéines mineures

En plus, des KIFs et des KAPs, un certain nombre de protéines minoritaires ont pu être identifiées dans la fibre capillaire. Notamment, dans son travail de thèse, Bednarczyk décrit l'identification de 24 protéines réparties dans différentes catégories¹⁷². Il lui a été possible de mettre en évidence la

présence de protéines desmosomales jouant un rôle important dans la fixation des kératinocytes aux cellules environnantes, de protéines structurales à l'image des histones, de protéines fixatrices de calcium – S100-A3 – ou de sélénium, de protéines de stabilisation et de signalisation, d'enzymes protéolytiques, etc. De plus, de précédentes recherches suggéraient l'existence d'environ 300 protéines capillaires¹⁹⁴, soit presque 200 protéines minoritaires hors KIFs et KAPs.

Ceci montre la grande diversité des protéines capillaires mineures, apportant une complexification supplémentaire au protéome de la fibre capillaire.

3.3.3. Résistance de la fibre capillaire

L'organisation des protéines au sein de la fibre capillaire lui confère une résistance mécanique, physique et chimique exceptionnelle. Dans ce paragraphe, nous explorerons plus précisément les interactions inter- ou intraprotéines favorisant cette robustesse, ainsi que les éventuelles dégradations qui peuvent malgré tout impacter le cheveu.

☒ Interactions moléculaires dans la fibre capillaire

A l'intérieur de la fibre, un certain nombre d'interactions entrent en jeu, aussi bien des interactions non-covalentes que covalentes.

Les interactions non-covalentes et les interactions de solvation regroupent les types d'interactions relativement faibles, à l'image des liaisons hydrogène ou des effets hydrophobes. Comme mentionné dans les Parties 3.2.2 et 3.3.1, la structure en hélice- α des molécules de kératine capillaire est stabilisée par l'existence de liaisons hydrogène selon le modèle de Pauling et Corey, et le maintien des super-enroulements de kératines est assuré par des effets hydrophobes entre les résidus apolaires des heptades et par des interactions ioniques entre les résidus chargés.

Selon la teneur en eau de la fibre, la force de ces différentes interactions non-covalentes peut fortement varier. Ainsi, dans le cas d'une fibre mouillée, l'effet hydrophobe prime devant les interactions ioniques et les liaisons hydrogène, alors que dans le cas d'une fibre sèche, les effets hydrophobes sont moins puissants que les liaisons hydrogène, et les interactions ioniques sont nettement plus fortes, s'approchant de la force des liaisons covalentes¹⁷⁷.

La contribution la plus importante à la cohésion de la fibre est cependant due aux interactions covalentes au sein du cortex, et notamment aux ponts disulfures. Les protéines capillaires, KIFs comme KAPs, étant caractérisées par un niveau élevé de résidus cystéiques (Partie 3.2.2 – Tableau A.3), les possibilités de formation de ponts disulfures peuvent être nombreuses. Trois types de

crosslink par pont disulfure coexistent dans la fibre : i) les ponts inter-filament/matrice, ii) les ponts intra-filaments et iii) les ponts intra-matrices.

Les liaisons intermoléculaires i) et ii) sont désignées en tant que SS_1 ou SS_2 . Le premier type, SS_1 , relie soit les parties N- et C-terminales globulaires des kératines capillaires (Partie 3.3.1 – Figure A.27.a), soit un KAP à une section hélicoïdale ou à une partie terminale globulaire d'une molécule de kératine. Il représente 35 % des ponts disulfures du cheveu. Il peut ainsi s'agir de ponts intra-protofibrille, inter-protofibrille, intra-dimère ou encore inter-filament/matrice. Le second type, SS_2 , qui relie deux protofibrilles tétramériques, est localisé au niveau des sections hélicoïdales des kératines et constitue 18 % des ponts disulfures existants¹⁷⁵.

Les ponts SS_3 sont caractéristiques des *crosslinks* intra-matrice entre les différents KAPs. La matrice interfilaire occupant près de 50 % du volume des macrofibrilles et étant riche en cystéines, ce dernier type de ponts disulfure est le plus abondant dans le cheveu et représente 47 % des ponts¹⁷⁵.

L'abondance des cystéines au niveau des protéines structurant le cheveu favorise ainsi la création d'un réseau important de ponts disulfures, qui stabilise et consolide, *via* des liaisons covalentes, les associations longitudinales et le regroupement des dimères et tétramères du cortex.

Concernant la cuticule, les interactions covalentes sont aujourd'hui encore peu étudiées, mais il est communément accepté que le réseau de ponts disulfures y est plus important que dans le cortex, expliquant ainsi l'insolubilité de la cuticule, et plus particulièrement de l'exocuticule (Figure A.21), niveau cuticulaire le plus riche en cystéines.

▣ Modifications moléculaires des molécules capillaires

La fibre capillaire, grâce à son réseau de ponts disulfures inter- et intramoléculaires, est donc extrêmement résistante, mais elle n'est pas pour autant à l'abri de modifications moléculaires. En effet, le cheveu est fortement soumis aux conditions environnementales, d'autant plus que la tige émergeant du cuir chevelu est composée de cellules mortes qui ne possèdent donc plus de mécanisme de réparation cellulaire. Ainsi, la chevelure est soumise à divers stress¹⁹⁵, tels que l'humidité ou la sécheresse¹⁹⁶ fragilisant la résistance mécanique du cheveu, les rayonnements UV favorisant les processus de photo-oxydation des mélanines notamment, ce qui conduit au jaunissement de la fibre¹⁹⁷⁻¹⁹⁹, l'oxydation naturelle due au vieillissement²⁰⁰, et les différentes modifications qui peuvent être induites par les traitements cosmétiques – décoloration et permanente par exemple^{201,202}.

Il faut noter également que, si les protéines capillaires peuvent être modifiées dans leur environnement, l'action des produits chimiques pour le traitement des échantillons en amont d'une analyse peut également générer des modifications moléculaires, nécessaires au traitement ou non

désirées. Par exemple, l'extraction des protéines capillaires nécessite une étape de réduction permettant la rupture des ponts disulfures et l'augmentation de la solubilité des protéines, mais elle requiert également la présence d'un agent chaotropique qui peut induire des modifications non désirées, à l'image de l'urée qui génère des carbamylations des acides aminés en position N-terminale²⁰³.

Lors de la mise en place des protocoles de préparation des échantillons, il convient donc d'être extrêmement attentif aux possibles effets des réactifs utilisés dans les conditions du traitement, et ce afin d'éviter toute interprétation erronée des résultats lors de l'étude des PTMs.

Dans cette partie, nous avons démontré, grâce aux travaux réalisés au cours des dernières décennies, la complexité structurelle et chimique de la fibre capillaire. La mise au point d'un protocole de préparation de l'échantillon – *i.e.* extraction des protéines, protection, isolement et analyse – adapté à notre domaine d'étude et à nos problématiques constituera une partie importante du projet de recherche qui sera développée dans la suite de ce manuscrit, au Chapitre C.

4. Connaissance des civilisations anciennes du désert d'Atacama

Dans le cadre de ces travaux, il s'agira d'appliquer les approches développées à l'étude de cheveux de momies préhispaniques de la côte andine, dernières représentantes des premières civilisations antiques qui ont peuplé la côte andine il y a plusieurs milliers d'années.

En archéométrie, la compréhension des contextes historiques et environnementaux est primordiale, d'une part, afin de comprendre l'influence des différents paramètres sur la composition moléculaire des échantillons d'intérêt et de pouvoir interpréter au mieux les données physico-chimiques obtenues, et d'autre part, afin de répondre aux questionnements des archéologues.

Les premières civilisations de la côte andine se sont installées dans le nord du désert d'Atacama, dans la région d'Arica et Parinacota, à l'extrême nord du Chili (Figure A.29), il y a 11 000 à 10 000 ans²⁰⁴. Les Chinchorros, qui tirent leur nom de la plage où Max Uhle a pour la première fois découvert leur existence, furent le premier peuple de pêcheur-chasseur-cueilleur à s'installer sur la côte dans cette région, mais leur origine reste aujourd'hui encore incertaine. Certaines hypothèses²⁰⁵ voudraient que les Chinchorros soient issus d'une civilisation côtière péruvienne plus au nord, de populations du bassin amazonien²⁰⁶, ou de peuples des hautes terres de la région, l'altiplano. Ces hypothèses sont encore débattues, à l'image de l'existence non démontrée d'un lien entre les populations de l'altiplano et les peuples de la côte. Une dernière hypothèse reste à développer et consiste à relier les premiers habitants de la région d'Arica aux peuples ayant traversé l'océan Pacifique entre la Sibérie et l'Alaska il y a environ 12 000 ans à la fin du Pléistocène et qui se seraient alors déplacés rapidement vers le sud, laissant derrière eux une partie de leur groupe pour coloniser les différentes régions de l'Amérique du Nord à l'Amérique du Sud.²⁰⁷

Tout comme son origine, beaucoup reste à découvrir pour mieux comprendre la civilisation Chinchorro et les civilisations qui l'ont suivie. Les découvertes archéologiques de ces dernières décennies ont d'ores et déjà apporté beaucoup de réponses, mais ont également soulevé de nouvelles questions, et aujourd'hui encore, de nouvelles découvertes remettent en question certaines connaissances établies.

Cette partie s'attache à présenter ces civilisations préhispaniques des Andes dans leur environnement, leurs pratiques funéraires, l'influence du monde moderne sur les vestiges qu'ils nous ont laissés, ainsi que l'enjeu d'une étude moléculaire de leurs momies.

4.1. Situation géographique, environnementale et économique durant les périodes préhispaniques

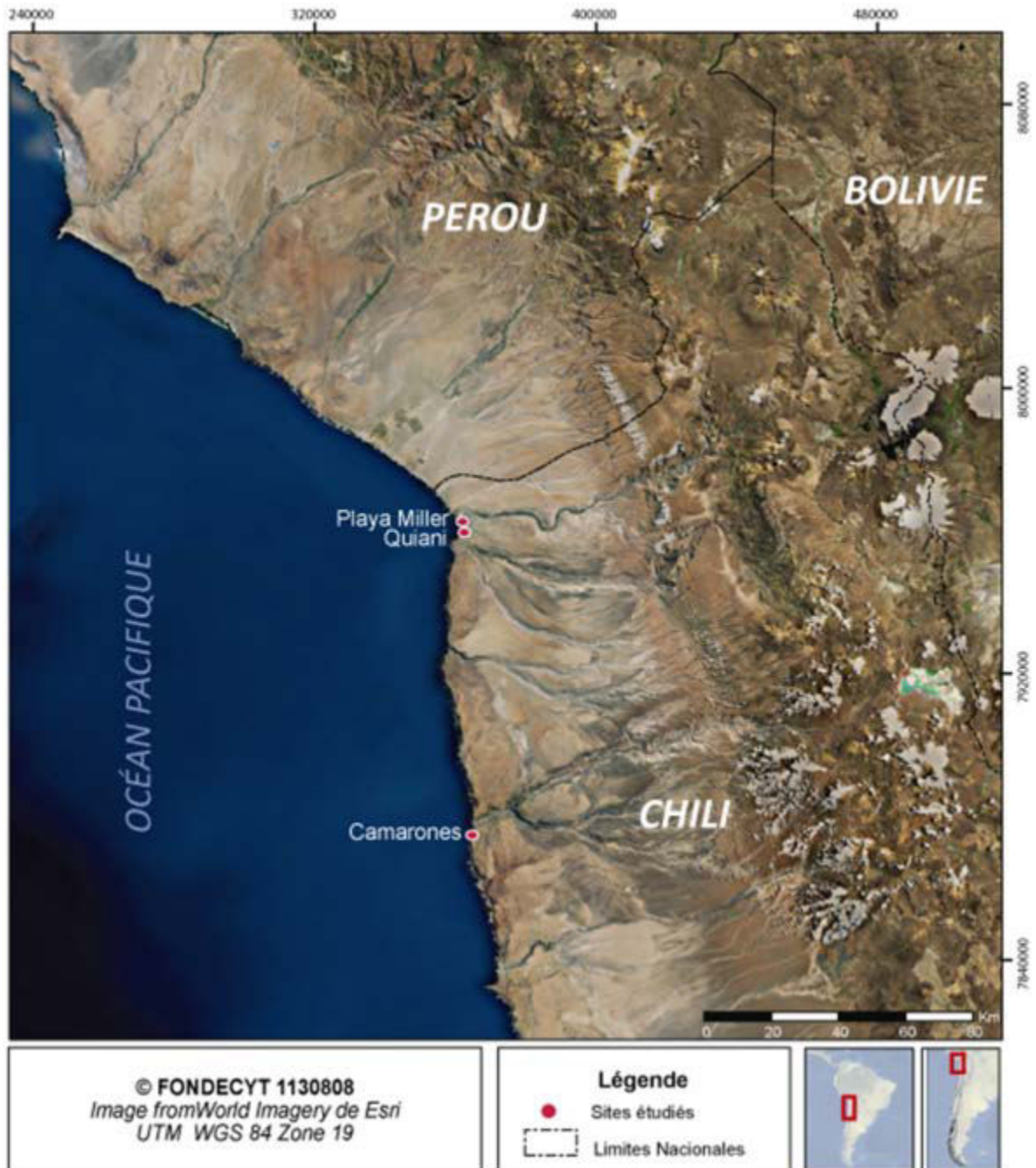


Figure A. 29 – Localisation géographique des sites archéologiques étudiés : Playa Miller 7, Quiani 7 et Camarones 15.

4.1.1. Climat aride et disponibilité des sources d'eau

Les Chinchorros de la période Archaïque (7 000 – 1 100 av. J.-C.) et les civilisations qui les ont suivis entre les périodes Formative et Inca (1 500 av. J.-C. – 1 500 ap. J.-C.) (Figure A.30) ont occupé les régions côtières et les hautes terres andines de l'extrême nord du désert d'Atacama, au nord du Chili

(Figure A.29). Cette région, qui est la plus aride au monde, paraît aujourd’hui être une terre plus qu’hostile pour qu’un peuple archaïque décide d’y vivre.

Les reconstructions du paléo-environnement ont montré qu’il y a 10 000 ans, le désert offrait plus de sources d’eau qu’aujourd’hui, permettant ainsi de vivre sur la côte Pacifique malgré l’aridité^{208,209}. Notamment, les hautes terres présentaient un climat très humide qui, selon la saison, favorisait la création de rivières qui pouvaient s’écouler jusqu’à l’océan en créant des vallées – *quebradas* – ou s’arrêtaient avant d’avoir atteint la côte en formant des lagunes, autant d’oasis dans lesquelles pouvaient se développer certaines formes de végétation ainsi que de vie animale – rongeurs, camélidés, oiseaux marins et poissons de rivière. La région d’Arica-Parinacota, bien que très aride, comportait plusieurs de ces vallées creusées par les rivières – les rivières *Lluta*, *San José* et *Camarones* notamment – favorisant ainsi l’installation de villages aux abords de ces oasis, sur les flancs des vallées^{207,208}. Vivre sur la côte ou à l’embouchure des rivières permettait également à ces premiers habitants d’exploiter une ressource très abondante dans la région : les produits de la mer.

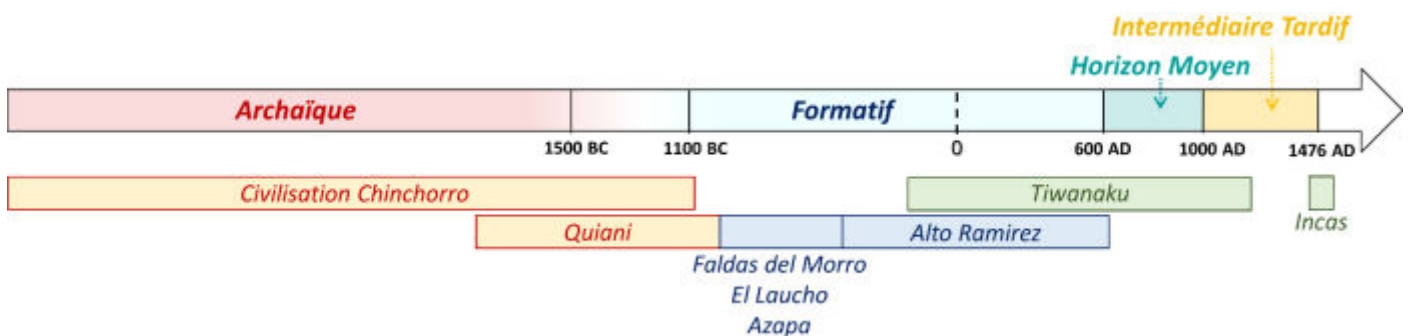


Figure A. 30 – Chronologie préhispanique andine dans la région d’Arica-Parinacota.

4.1.2. Utilisation extensive des ressources marines

La proximité de l’océan offrait une importante ressource que les civilisations anciennes ont su rapidement exploiter dès le début de l’occupation côtière. Notamment, de nombreux outils relatifs à la pêche, tels que des harpons, des hameçons et parfois des filets, ont été retrouvés sur les différents sites occupés durant les périodes préhispaniques^{205,207,210}, ainsi que des coquillages, des ossements d’oiseaux côtiers et de mammifères marins, comme les lions de mer^{205,207}. Les chercheurs ont également pu aller plus loin dans l’analyse des momies mises au jour et apporter de précieux indices.

📖 Etat de santé et paléo-alimentation

L’étude des restes humains provenant des sites côtiers montrent les signes d’une alimentation marine importante, telle qu’une bonne santé dentaire^{11,205,211} ou la présence de parasites intestinaux propres à la consommation de ressources maritimes²¹². L’analyse isotopique des ossements et des

cheveux a également mis en évidence une forte contribution en azote 15 (valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ entre 15 et 30 ‰ pour les individus étudiés^{15,22,211,213})^a, ainsi qu'en soufre 34 ($\delta^{34}\text{S}$ globalement supérieur à 20 ‰²²)^b, soulignant ainsi l'importance des ressources maritimes dans l'alimentation des civilisations préhispaniques de la côte andine.

▣ Agriculture et ressources marines

L'alimentation marine seule ($\delta^{15}\text{N} \approx +22$ ‰¹⁵) n'explique cependant pas les valeurs extrêmement élevées de la contribution isotopique de l'azote dans les cheveux ou les ossements chez les civilisations post-Chinchorro ($\delta^{15}\text{N}$ proche de 30 ‰). Cette contribution pourrait avoir été enrichie par certaines pratiques agricoles développées à partir de la période Archaique tardive et de la période Formative. Il y a environ 3 000 ans, les peuples formatifs développent leur agriculture en complément de la pêche et auraient utilisé comme fertilisant une autre ressource maritime : le guano. Ces excréments d'oiseaux marins, très riches en azote, constituent un très bon engrais, ainsi qu'une source importante pour l'augmentation de la contribution isotopique de l'azote des plantes cultivées ($\delta^{15}\text{N} \approx +35$ ‰).¹⁵

Les civilisations préhispaniques de la côte andine ont donc pu s'installer et vivre dans le nord du désert d'Atacama en grande partie grâce à l'utilisation extensive des ressources maritimes, surmontant ainsi l'une des contraintes naturelles de la région. Cependant, l'aridité du désert d'Atacama ne constituait pas le seul danger environnemental pour ces premiers colons.

4.1.3. Un enjeu écologique majeur : la pollution en métaux lourds

Depuis une dizaine d'années, les chercheurs se sont intéressés à l'impact de l'environnement sur les premières civilisations de la côte andine. Le principal danger vient de l'importante toxicité des eaux de surface et eaux souterraines du nord du Chili due à la présence de métaux lourds.

▣ Exposition des civilisations préhispaniques de la région d'Arica-Parinacota aux métaux lourds

La présence d'arsenic dans la nourriture et les plantes qui servaient aux objets de la vie quotidienne a été rapportée par Figueroa et mentionnée dans les travaux de Arriaza et ses collaborateurs⁹. De plus, différentes études réalisées sur les momies des sites archéologiques côtiers de la région d'Arica ont montré une exposition chronique à l'arsenic et à différents métaux lourds

^a Typiquement, $\delta^{15}\text{N} = 17$ à 20 ‰ pour une alimentation principalement marine²¹⁴ avec un enrichissement de 2 à 3 ‰ dans le cas d'analyse de cheveux²¹⁵

^b $\delta^{34}\text{S} = 20$ ‰ : valeur seuil marquant une forte contribution de nourriture marine dans le régime alimentaire²².

comme le plomb pour un grand nombre d'individus. Cette exposition est marquée par l'existence de lésions cutanées importantes quasi-systématiques, de type kératoses, et de taux anormalement élevés de mortalité infantile – environ 25 % – chez les civilisations de la période Inca (1 500 ap. J.-C.) du site Camarones⁹. Également, des concentrations en As et en Pb – *a priori* endogènes – plus élevées que la normale^a ont été détectées dans les cheveux de momies de la région d'Arica, sur une période allant de l'époque Archaïque à l'époque Inca^{5,23,216,217}.

▣ Sources actuelles et anciennes de métaux lourds dans le désert d'Atacama

Le nord du Chili est une zone à forte activité volcanique²¹⁸ et possède plusieurs sources d'eau thermale, deux importantes sources de métaux lourds, et plus particulièrement d'arsenic inorganique²¹⁹. Également, l'exploitation des mines de cuivre favorise la diffusion de l'arsenic et autres métaux lourds dans l'environnement. L'eau de pluie et la diffusion de l'eau dans le sol permet alors la diffusion des métaux lourds par lixiviation jusqu'aux nappes phréatiques et aux différents cours d'eau. Ainsi, dans le nord du Chili, les concentrations en arsenic dans certaines rivières peuvent être considérablement supérieures à la norme fixée par l'Organisation Mondiale de la Santé de 10 µg/L²²⁰, à l'image de la rivière *Camarones* ou de la nappe phréatique d'Antofagasta, présentant respectivement des concentrations en As d'environ 1 000 µg/L et 800 µg/L.⁵

Selon les spécialistes, les niveaux d'As^{III} observés aujourd'hui dans les différentes sources d'eau du nord du désert d'Atacama doivent être très similaires à ceux observés durant les périodes préhispaniques. De plus, les civilisations anciennes de la région exploitaient également des mines de cuivre pour la production de pigments destinés aux peintures rupestres et à l'ornement des défunts au cours des rites funéraires²²¹, ajoutant ainsi une source de pollution importante aux sources géologiques. Il est donc raisonnable de penser que ces peuples étaient eux aussi fortement exposés à ces éléments toxiques selon leur zone d'occupation.

▣ Arsenic, élimination et enjeux sanitaires

L'arsenic existe dans l'environnement sous différentes formes réparties en deux grandes catégories : l'arsenic organique et l'arsenic inorganique. La forme organique, principalement l'arsenobétaïne et l'arsenocholine, est la plus commune à laquelle l'homme est exposé *via* l'ingestion de fruits de mer et de poissons. Elle ne représente aucun danger sanitaire pour l'organisme car sa forme organique permet son élimination rapide. L'arsenic inorganique, quant à lui, représenté par l'arsenic trivalent As^{III} et l'arsenic pentavalent As^V, comme mentionné dans le paragraphe précédent, provient de l'industrie minière ou de la combustion du charbon, mais également de sources

^a Concentrations normales dans les cheveux : As < 1 ppm et Pb < 5ppm.

géologiques, et peut ainsi être présent dans les sédiments et les eaux souterraines ou de surface.¹³⁵ Cette forme représente un important risque sanitaire dans le cadre d’empoisonnements aigus ou chroniques, *via* l’interaction de l’arsenic avec les thiols de certaines protéines (Figure A.31.A), telles que les enzymes glutathion réductase ou thiorédoxine réductase, en inhibant la fonction de celles-ci.²²²

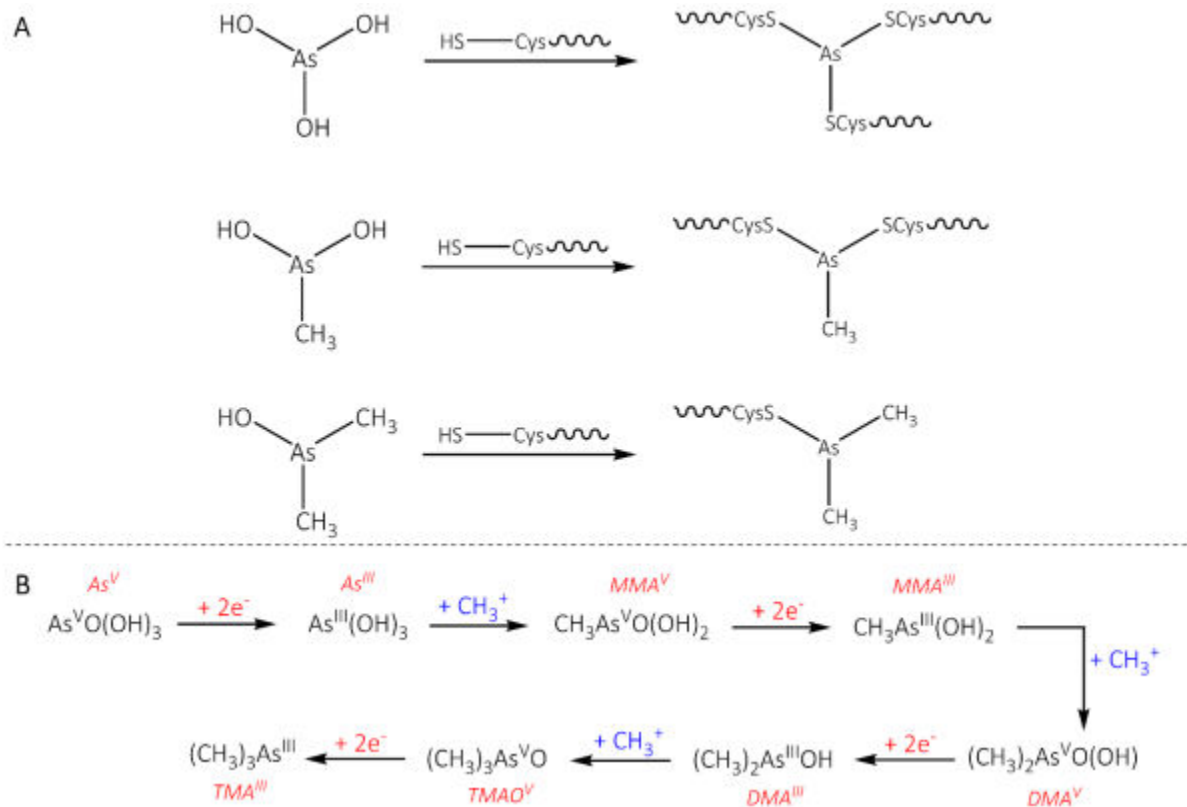


Figure A. 31 – Modes de liaison des molécules arséniées avec les résidus cystéiques (A) et mécanisme de métabolisation de l’arsenic dans l’organisme, par biométhylation (B) ²²².

En règle générale, la biométhylation (Figure A.31.B) est connue comme un processus important de métabolisation de l’arsenic inorganique et de désintoxication de l’organisme, grâce à la formation de dérivés organiques, l’acide monométhylarsonique (MMA, *Monomethylarsonic Acid*) et l’acide diméthylarsinique (DMA, *Dimethylarsinic Acid*), notamment pour dans sa forme pentavalente.²²² D’autres voies de désintoxication sont à l’étude, à l’image de la production de métallothionéine, protéine riche en cystéine induite par l’organisme face à une intoxication à certains métaux lourds notamment. Les espèces trivalentes toxiques – As^{III}, MMA^{III} et DMA^{III} – non éliminées peuvent alors s’y lier, les empêchant ainsi d’interagir avec les protéines fonctionnelles.

D’un point de vue sanitaire, il faut noter que l’accumulation d’arsenic dans les tissus riches en thiols comme la peau, les cheveux ou les ongles, est favorisée par sa forme inorganique, ce qui permet leur détection longtemps après l’exposition. Ceci favorise alors l’émergence de pathologies cutanées, de

hauts risques de cancers d’organes internes ou cutanés, ainsi que de complications au cours de la grossesse – avortements spontanés ou enfants mort-nés notamment.^{135,222–224}

La compréhension des conséquences de cette exposition chronique sur les civilisations anciennes comporte un enjeu crucial aujourd’hui encore, puisque cela nous permet de prendre du recul sur l’impact de ces composés toxiques sur les populations actuelles.

4.1.4. Evolutions de la civilisation Chinchorro aux peuples des périodes pré-Inca et Inca

La compréhension des origines et des us et coutumes du peuple Chinchorro, ainsi que des évolutions techniques, sociales, politiques et culturelles ayant mené aux civilisations post-Chinchorro, est un point important dans ce projet. En effet, ces aspects peuvent impacter notre étude de différentes manières. La transition entre les périodes Archaique et Formative (1 500 - 1 100 av. J.-C. – Figure A.30) notamment est relativement floue et il n’est pas toujours évident de déterminer l’appartenance d’un site archéologique à l’une ou l’autre période, d’autant plus que la plupart des cimetières ont été utilisés sur plusieurs siècles et peuvent donc renfermer des momies de plusieurs civilisations. Egalement, les possibles échanges entre les peuples de la région ont pu apporter des outils et influences culturelles différentes des techniques locales. Ainsi, comprendre ces évolutions peut aider à l’interprétation des données en donnant une vision plus globale des civilisations préhispaniques de la région.

☞ Vers une sédentarisation totale

Longtemps décrits comme une civilisation nomade, les Chinchorros étaient cependant semi-sédentaires et installaient leurs villages dans les collines de sable côtières en formant des abris de branchages et de feuilles, dont il reste peu de traces aujourd’hui. Les peuples côtiers post-Chinchorro de la période Formative se sont complètement sédentarisés avec la création des premiers habitats permanents regroupés en villages. Egalement, comme mentionné dans ce chapitre, Partie 4.1.2, la période Formative a vu la mise en place d’un système agro-pastoral visant à compléter les ressources marines et marquant une sédentarisation totale de la société^{206,225}.

☞ Echanges commerciaux avec les peuples de la vallée et des hautes terres

Les peuples formatifs étaient cependant amenés à se déplacer de manière temporaire dans le cadre d’échanges continus avec les peuples à l’intérieur des vallées et dans les hautes terres.^{205,226} En effet, dans leur étude sur la répartition de pathologies de l’oreille liée à l’immersion fréquente dans des eaux froides²²⁶, Standen et ses collaborateurs ont montré que les peuples des vallées et ceux de l’altiplano ne se procuraient pas eux-mêmes leurs ressources directement dans l’océan, mais avaient

bien recours au commerce avec les peuples côtiers. Ces derniers, malgré le développement de l'agriculture, auraient ainsi augmenté leur exploitation des ressources marines afin de répondre aux besoins de ce commerce qui leur permettait très probablement de se procurer les matériaux lithiques pour leurs armes et outils entre autres. Au fil des siècles, ces échanges se sont perpétués et renforcés amenant divers développements dans les populations.

▣ **Développements technologiques, sociaux et politiques**

La transition entre les périodes Archaïque et Formative n'est pas clairement marquée. En effet, les changements technologiques et sociaux marquant la période Formative, tels que les développements d'une nouvelle différenciation sociale et d'innovations technologiques, souvent amenés par les échanges avec les hautes terres des Andes et des régions voisines – céramique, travail du cuivre et d'alliages du cuivre, fabrication de tissus et paniers tissés – ont débuté pendant la période Archaïque pour se diffuser largement au cours de la période Formative.^{22,227}

A la fin de la période Formative, vers 500 ap. J.-C., l'arrivée de l'influence de Tiwanaku – civilisation pré-Inca installée sur les bords du lac Titicaca – marque le début de l'Horizon Moyen et apporte de nouveaux changements dans l'organisation sociale des peuples Formatifs, ainsi que dans les formes et les décorations de leurs objets qui deviennent plus travaillées. La disparition de Tiwanaku à l'Horizon Intermédiaire Tardif, laisse place à la création de royaumes et domaines seigneuriaux côtiers produisant des objets extrêmement travaillés, possédant un système agricole bien développé et un réseau solide d'échanges commerciaux avec les peuples de la vallée et de l'altiplano. Plus tard, à l'Horizon Tardif, l'Empire Inca semble n'avoir eu que peu d'influence sur ces royaumes et domaines seigneuriaux côtiers déjà très organisés.

Les transitions entre ces différentes périodes sont également marquées par des changements culturels, et notamment par l'évolution des pratiques funéraires chez les différents peuples Chinchorro et post-Chinchorro.

4.2. Rites funéraires et momies du désert d'Atacama

Le terme « momie » tire son origine du Perse ancien « *mumeia* » désignant le bitume ou la poix, substances noires que l'on pensait être utilisées par les Egyptiens pour les rituels funéraires²²⁸. Le terme a donc initialement été adopté pour désigner les corps embaumés, souvent de couleur foncée voire noire, et finalement pour désigner tout corps dont une partie ou la totalité des tissus mous, tels

que la peau, les cheveux ou les muscles, est préservée. Cette préservation peut être naturelle, lorsque les conditions environnementales sont favorables (aridité, température constante ou encore anoxie par exemple), ou artificielle grâce à des traitements *post-mortem*, l'important étant que les conditions de conservation du corps du défunt empêchent la dégradation des tissus par les bactéries et les insectes notamment²²⁸.

Parmi les momies naturelles, différents types de préservation ont été mis au jour dans diverses régions du monde, les plus connus sont détaillés ici.

- i) La déshydratation du corps dans les régions chaudes et arides comme le désert d'Atacama, où a été retrouvée la momie naturelle la plus vieille du monde âgée de 9 000 ans²¹¹, ou dans des environnements secs à la température constante créés par l'homme, telles que certaines cryptes souterraines²²⁹,
- ii) La congélation du corps dans les régions au climat froid et sec comme les régions arctiques au nord du Canada et en Sibérie, ou les zones en haute altitude, à l'image d'Ötzy, l'homme de glace tyrolien de l'Age du Cuivre²³⁰,
- iii) L'environnement acide et anoxique des tourbières qui permet une conservation exceptionnelle des corps, dits « *bog bodies* », principalement mis au jour dans les tourbières du nord de l'Europe^{231,232},
- iv) Les environnements riches en sels, à l'image des mines de sel du nord de l'Iran dans lesquelles ont été retrouvées plusieurs momies surnommées « *The Chehr Abad Salt men* »¹⁴.

La préservation artificielle des corps, qui consiste à préparer le corps du défunt afin d'empêcher sa décomposition, notamment en enlevant les organes internes et en recouvrant le corps de substances protectrices – matériaux d'embaumement ou argile entre autres, se retrouve également dans plusieurs régions du monde et à différentes époques. Les momies égyptiennes ont longtemps bénéficié de l'attrait des chercheurs et du grand public pour l'Égypte et ses dynasties de Pharaons²³³, et sont donc les plus connues et les plus étudiées. Les peuples d'Amazonie et leurs traditions de réduction des têtes²³⁴ sont également très célèbres et ces pratiques ont perduré jusqu'au siècle dernier. Ils ne constituent cependant pas les seuls « peuples momificateurs » d'Amérique du Sud. En effet, les civilisations antiques du Chili et du Pérou ont également préservé leurs morts pendant des milliers d'années. Plus particulièrement, les Chinchorros ont été les premiers à développer des rites funéraires complexes, non seulement en Amérique du Sud mais également dans le monde entier, il y a plus de 7 000 ans²³⁵, devant de plusieurs milliers d'années les Égyptiens.

4.2.1. Momies andines des périodes Archaïque à Inca

Comme l'a mis en avant Arriaza^{205,208}, le peuple Chinchorro était un peuple de pêcheurs-chasseurs-cueilleurs qui utilisait des outils et une technologie rudimentaires et ne semblait pas avoir de système social et politique complexe. Ils ont cependant été les premiers à développer une technique extrêmement complexe et avancée pour préserver leurs morts, qui nécessitait beaucoup d'énergie, probablement plusieurs semaines de préparation et témoigne d'une très bonne connaissance de l'anatomie humaine. Si ces procédés de momification artificielle ont disparus avec les Chinchorros, les peuples de la côte, de la vallée et de l'altiplano qui les ont suivis, ont perpétué cette tradition de rites funéraires.

▣ Origine des rites funéraires dans le désert d'Atacama

Pour toutes les sociétés pratiquant la momification, les chercheurs se sont intéressés à l'origine de celle-ci, à la raison de son développement. L'origine des rites funéraires de la culture Chinchorro reste cependant encore mystérieuse.

La première hypothèse consiste à penser que ces pratiques se sont développées dans un but religieux. Dans les cultures préhispaniques, les momies semblent en effet constituer des icônes, représentations des défunts parmi les vivants supposées assurer une vie après la mort – impossible si le corps se décompose – mais aussi donner une nouvelle place dans la société et renforcer la cohésion du groupe en maintenant les morts comme membres « actifs » de la société.^{205,207} La présence d'une telle représentation, à la limite entre le monde des vivants et celui des morts aurait ainsi pu leur permettre de communiquer avec les forces surnaturelles régissant la nature. Cette notion de communication avec les forces surnaturelles peut également provenir de la forte activité sismique de la région d'Arica, régulièrement exposée aux séismes et raz-de-marée, dans le but de trouver un moyen de communiquer *via* ces icônes, avec les forces responsables de ces catastrophes ou, dans une idée plus terre-à-terre, de trouver un moyen de préserver les morts de ces catastrophes naturelles.

De manière plus évidente, une hypothèse répandue s'attache à dire que les Chinchorro auraient fini par développer des rites de momification artificielle afin de mimer et d'améliorer la préservation naturelle des corps due à l'extrême aridité du désert d'Atacama²⁰⁵. La momie Chinchorro la plus ancienne ayant été découverte est naturelle et date d'il y a 9 000 ans, ce qui pourrait venir appuyer cette hypothèse.

Dans les cimetières côtiers Chinchorro, les momies retrouvées sont de différents types – naturelles, noires, rouges, avec bandages ou recouvertes d'argile. Les spécialistes se sont donc demandé si cela indique une différenciation sociale des Chinchorros par ces rituels. Les chercheurs ont tout d'abord défini les Chinchorros comme une société plutôt égalitaire, dans laquelle les rites complexes de

momification ne semblaient pas initialement être réservés à l'élite²⁰⁵, ces observations sont cependant de plus en plus remises en question par les spécialistes.

Malgré tout, comme mentionné dans ce chapitre, Partie 4.1.4, les différences de traitement observées dans les cimetières seraient majoritairement dues à l'utilisation de ces lieux sur plusieurs siècles, créant une superposition des différents types de momies²³⁶. Également, peu de sépultures présentaient des objets funéraires et lorsque c'était le cas, ceux-ci, de simples outils ou armes du quotidien, ne semblaient pas mettre en avant une appartenance à une élite sociale.

Il faut noter également qu'il n'existe pas de différenciation en fonction du sexe du défunt, ni *a priori* en fonction de l'âge dans les périodes de momification complexe. Malgré tout, les datations réalisées sur les momies des différents sites côtiers montrent que les momies les plus anciennes sont en réalité des momies d'enfants.^{205,208}

Selon l'hypothèse qui semble la plus probable pour les spécialistes, la volonté de transformer les défunts en icônes se serait développée pour faire face à une forte mortalité infantile, vraisemblablement due à un empoisonnement à l'arsenic^{5,223,9,237} (Partie 4.1.3). En outre, les plus anciennes momies naturelles et artificielles retrouvées sont toutes des momies d'enfants ou des momies-statuettes – représentant des fœtus ou nouveaux-nés sous la forme de petites statuettes anthropomorphiques^{205,208,235} – marquant une volonté de préserver le corps des jeunes défunts, même lorsque ceux-ci n'ont pas pris une part active à la société. Le développement des procédés de momification auraient ainsi constitué un moyen de faire face au chagrin de la perte de tous ces enfants.

L'origine des rites funéraires Chinchorro reste aujourd'hui une question sans réponse mais pourrait être liée à la combinaison des différentes hypothèses développées ici⁹.

▣ Rites funéraires dans la civilisation Chinchorro (7 000 à 1 100 av. J.-C).

Les momies Chinchorro peuvent être séparées en quatre types, selon la classification de Uhle complétée par Arriaza^{205,208,235} :

- i) Type I : les momies dites simples ou momies naturelles,
- ii) Type II : les momies complexes, qui ont été éviscérées, écharnées, dissociées, puis reconstruites, recouvertes d'argile et peintes.
- iii) Type III : les momies recouvertes d'argiles, qui sont rarement éviscérées et simplement recouvertes d'une carapace en argile,
- iv) Type IV : les momies remplies d'argile qui sont simplement éviscérées. Ce type ne sera pas développé par la suite.

Les Chinchorros avaient bien entendu recours au type I, la momification naturelle, en laissant sécher les corps des défunts grâce à la chaleur et l'aridité du désert.

Le type II, le plus répandu dans la civilisation Chinchorro, est divisé en différentes sous-catégories qui se sont succédé au fil des siècles. Les procédés pour chacune de ces techniques décrites ci-dessous ont été détaillés par Arriaza et ses collaborateurs dans différentes publications^{205,207,208}. De manière globale, comme mentionné précédemment, ces rites funéraires consistaient à éviscérer, écharner, sécher le squelette et la peau, puis combler les cavités avec divers matériaux – des plumes, des cendres, des sédiments, des herbes ou encore des poils de camélidés – réarticuler, et renforcer le squelette avec des bâtons en roseau et des cordes. Le corps du défunt était remodelé à l'aide d'argile grise et la peau remise en place si nécessaire, avant de peindre le corps par divers procédés selon le type de momification. Le visage était finalement remodelé et une perruque de cheveux humains ajoutée.

- i) Les momies noires (5 000-2 500 av. J.-C. – Figure A.32) : Pour ce type de momification, le corps était peint avec une pâte de manganèse bleu-noir épaisse et la perruque ajoutée était constituée de cheveux courts et noirs, probablement ceux du défunt.

Une fois terminées, ces momies étaient rigides et facilement transportables. Selon Arriaza²⁰⁵, certaines montrent même des traces de renouvellement de la pâte de manganèse, ce qui pourrait indiquer le maintien des momies parmi la communauté comme des icônes, et le soin que les vivants leur accordaient.



Figure A. 32 – Momie noire Chinchorro exposée au Musée San Miguel de Azapa (Université de Tarapacá, Chili). ©Museo San Miguel de Azapa.

- ii) Les momies rouges (2 500-1 500 av. J.-C.) : Le visage du défunt était recouvert de pâte de manganèse noire et la tête ornée d'une perruque de cheveux humains longs d'environ 60 cm fixée par une épaisse couche de pâte de manganèse formant un casque noir autour du crâne. Le corps, à l'exception de la tête et des cheveux, était peint avec de l'ocre rouge vif.
- iii) Les momies avec bandages ou cordes : les momies avec bandages (vers 2 000 av. J.-C.) combinent les techniques utilisées pour les momies noires et rouges. Dans ce cas, la peau du

défunt ou de la peau animale était cependant découpée en bandelettes qui recouvraient ensuite le corps comme des bandages avant de le peindre. Ces momies sont plutôt associées aux momies rouges, compte tenu de leur corps de couleur rouge, de leur visage recouvert de pâte de manganèse noire et de leur longue chevelure. Les momies avec cordes (1 000 av. J.-C.), étaient simplement enveloppées dans des cordes de roseau.

Le type III, les momies recouvertes de boue, concerne peu de momies Chinchorro retrouvées dans la région d'Arica et sa chronologie reste assez méconnue. L'une des premières daterait cependant de 1 700 av. J.-C. Le processus consistait à faire sécher naturellement ou fumer les corps, avant de les recouvrir entièrement d'une boue réalisée à partir de terre, d'eau et d'une substance protéique adhésive inconnue. Les corps ne subissaient généralement pas d'éviscération et il semblerait que la boue ait été répartie sur le corps directement dans la tombe.

Les momies naturelles (type I) étaient simplement enveloppées dans des fourrures de camélidés ou dans des nattes de roseaux, parfois coiffées de plumes, et enterrées en position allongée ou parfois avec les jambes semi-fléchies, et accompagnées pour certaines d'outils ou de coquillages (Figure A.33). Les momies des types II et III étaient allongées sur le dos, parfois enveloppées de nattes tissées, de couverture en peau d'oiseaux ou sans aucun vêtement. Les objets funéraires n'étaient pas très nombreux et semblent être plus systématiquement ajoutés à la sépulture à partir de 2 000 av. J.-C. Ceux-ci étaient principalement des outils de pêche et de chasse – harpons, pointes lithiques ou hameçon – des bijoux, des coquillages, des sacs en cuir contenant des pigments, ou encore des pinceaux, tels que ceux utilisés pour peindre les corps des vivants et des défunts. A partir de 2 000 av. J.-C. apparaît l'ajout fréquent à la coiffure des momies d'un bandeau fait en roseaux colorés ou en cordes de camélidé de couleur naturelle.



Figure A. 33 – Momie naturelle en position allongée, enveloppée dans une natte de roseaux et coiffée de plumes, exposée au musée du site archéologique Colon-10 (Arica, Chili). ©Museo de Sitio Colon 10.

De manière générale, les momies Chinchorro étaient enterrées de façon superficielle dans des cimetières placés sur des collines de sable au bord de l'océan Pacifique, souvent en sépulture secondaire^a, et regroupées par petits groupes de type similaire – principalement pour les momies noires et rouges. Ces groupes sont souvent assimilés à des familles bien que cela soit loin d'être certain. L'arrangement des corps était fait de manière horizontale en les alignant face à l'océan et l'existence de plusieurs couches horizontales de momies de types parfois différents semble mettre en avant l'utilisation des cimetières sur plusieurs siècles, à l'image du site Colon-10 au cœur de la ville d'Arica.

▣ Rites funéraires au cours des périodes Formative, Pré-Inca et Inca (1 500 av. J.-C. à 1 500 ap. J.-C.)

S'il n'est plus question de la civilisation Chinchorro par la suite, ce n'est pas du fait de leur disparition totale mais plutôt à cause de changements technologiques, idéologiques et politiques (Partie 4.1.4). De manière générale, les archéologues s'accordent à dire que la civilisation Chinchorro désigne les premiers habitants du désert d'Atacama qui exploitaient les ressources maritimes à l'aide d'outils simples, momifiaient leurs défunts de façon naturelle et artificielle, et les enterraient en position allongée. La momification par enveloppement de boue apparue chez la civilisation Chinchorro tardive (Partie 4.2.1), processus plus simple et moins long, semble indiquer un changement idéologique dans leur rapport à la mort – momies moins représentatives du vivant qui ne pouvait pas être déplacées hors de la tombe – et marque un déclin dans la complexité des rites de momification, qui s'est poursuivi jusqu'à la disparition de la momification artificielle au profit du retour de la momification naturelle chez les peuples de la période Formative.

Les momies des sites d'habitation côtiers Quiani (Figure A.30), à l'interface entre les périodes Archaique et Formative, sont des momies naturelles, allongées sur le côté les jambes repliées, portant des coiffes ou turbans teints ou de couleur naturelle en fibres de laine ou de coton, et parfois enveloppées de nattes végétales et accompagnées d'offrandes funéraires^{205,208}. Plus tard à l'époque des sites d'habitation d'Alto Ramirez (Figure A.30), les corps étaient allongés et regroupés dans des *tumili* formés de plusieurs niveaux de terre, de branchages, de nattes végétales et de corps²⁰⁵. La suite de période Formative est marquée par l'émergence des fardeaux funéraires correspondant à l'enveloppement du défunt en position accroupie, ou d'une représentation du défunt – cheveux notamment – dans diverses couches de tissus avec des objets et outils funéraires issus de la vie quotidienne. On parle dans ce cas de momies naturelles améliorées, le tissu permettant d'absorber l'humidité et de préserver le corps sans préparation particulière. Certains fardeaux sont très simples et d'autres sont enveloppés dans des tissus colorés et décorés pour marquer le rang social du défunt.

^a Les corps auraient été inhumés une première fois pour aider au séchage des tissus, puis exhumés pour terminer les rites de momification et placer la momie dans son lieu de sépulture final.

Ces fardeaux funéraires sont ensuite placés dans un puits, ou chambre funéraire, creusé dans le sol et recouvert de branchage.²² Comme ce qui avait été observé pour les momies noires Chinchorro, il semblerait que des rituels annuels permettaient de réparer les fardeaux abimés par le temps et de remplacer les vêtements des ancêtres.²³⁸ Peu d'évolution est ensuite observée dans les pratiques funéraires entre les périodes Formative, pré-Inca et Inca, cependant certaines modifications du fardeau sont visibles. Dans le cas des premiers fardeaux, la tête de la momie est apparente et parfois décorée par un masque ou une coiffe, tandis que les fardeaux plus tardifs, englobant totalement la momie, sont parfois surmontés d'une tête factice figurant le visage du défunt et ornée de cheveux, d'une coiffe et d'un masque coloré (Figure A.34) ^{227,238}.



Figure A. 34 – Fardeau funéraire Inca (1 400-1 500 ap. J.-C.) exposé au Musée San Miguel de Azapa (Université de Tarapacá, Chili) et issu de l'embouchure du fleuve *Camarones*. ©Museo San Miguel de Azapa.

4.2.2. Impact environnemental et anthropique sur la conservation des momies de la côte andine

▣ Dégradations des fibres capillaires

Pouvoir retrouver des cheveux anciens dans un état de conservation acceptable est déjà exceptionnel en soi. En effet, les fibres capillaires sont soumises tout au long de la vie d'un individu et après sa mort, à différentes sources de dégradations naturelles et anthropiques.

Ainsi, les rayonnements UV du soleil ou l'humidité de l'air peuvent apporter des modifications des molécules composant les cheveux, comme par exemple des oxydations des ponts disulfures ou une dégradation des mélanines et donc un éclaircissement de la fibre^{199,200}. Dans le sol, les cheveux peuvent aussi être soumis à diverses attaques microbiennes qui vont petit à petit décomposer le

cheveu, depuis le centre de la fibre jusqu'à son enveloppe externe, ainsi le cheveu peut paraître bien conservé à l'extérieur mais avoir un état de dégradation interne avancé^{25,239}.

Egalement, les traitements cosmétiques divers appliqués sur les cheveux sont une source de dégradations importante. Si les produits développés à notre époque n'existaient pas au temps des civilisations préhispaniques, il n'en reste pas moins que celles-ci utilisaient parfois des pigments inorganiques pour colorer leurs cheveux et ceux de leurs défunts²⁰. Ces colorants, souvent constitués de métaux lourds – fer, cuivre, plomb ou manganèse notamment – ont donc pu avoir une incidence sur la préservation des cheveux²⁴⁰.

▣ Premières fouilles archéologiques

Les premières fouilles archéologiques au début du XX^{ème} siècle, menées par Uhle²⁰⁵, ont permis de mettre au jour plusieurs momies et objets funéraires. D'autres campagnes de fouilles ont suivies, notamment dans les années 1960 et 1970^{210,241}. A cette époque, l'intérêt des chercheurs était axé sur les artefacts archéologiques et les ossements, et il semblait y avoir peu d'intérêt de conserver une momie dans son état d'origine. Ainsi, les momies excavées étaient souvent désassemblées, les têtes séparées des corps, les cheveux, coiffes et textiles souvent considérés comme inutiles et mis de côté, voire parfois brûlés. Les fardeaux funéraires également étaient généralement entièrement démontés, afin d'étudier les différentes couches qui les composent et d'atteindre la momie en elle-même. Les différents restes et artefacts retrouvés n'étaient pas toujours correctement inventoriés, et les informations relatives rarement complétées.

Les pratiques ont depuis beaucoup changé et les momies retrouvées sont désormais conservées dans leur état d'origine, et précisément inventoriées. Pour les autres, il faut regrouper les différentes parties de la momie lorsqu'il est possible de les retrouver, réassembler les cheveux, coiffes, textiles et dents associés, et rassembler les informations relatives à la momie. Tout cela constitue un travail important, qui malheureusement ne pourra pas combler les vides laissés par les artefacts mal répertoriés, perdus ou détruits, ce qui pose aujourd'hui des problèmes pour l'interprétation des analyses.

▣ Pillages et proximité de l'activité humaine

La ville actuelle d'Arica s'est bâtie sur les plages et collines sableuses où s'étaient installées des millénaires plus tôt les premières civilisations de la côte andine chilienne, collines renfermant les cimetières préhispaniques densément occupés. Si les habitations ont d'abord été construites loin des cimetières antiques, l'expansion de la ville a vite atteint leurs limites. Les fouilles archéologiques de Focacci, au cours de l'aménagement du littoral dans les années 1960, ont mis au jour un certain

nombre de tombes antiques, mais les constructions des nouveaux quartiers d'habitation en bord d'océan se sont malgré tout effectuées sur d'anciens cimetières (Figure A.35).



Figure A. 35 – Site archéologique Playa Miller 7 dans son environnement actuel.

Ces derniers s'étendent encore aujourd'hui le long de la côte et des vallées des rivières *Lluta*, *San José* et *Camarones*, et sont pour beaucoup accessibles facilement par les promeneurs. Ainsi, ces sites antiques non fouillés sont régulièrement soumis aux pillages, laissant des trous bien visibles, ou aux passages parfois marquant des promeneurs, joggeurs et noctambules.

Ces cimetières, souvent à flanc de montagne ou de colline, sont également victimes des aléas du climat, du temps ou de la nature, et il arrive fréquemment que des momies et objets archéologiques sortent du sol – après un séisme par exemple – ou tombent des flancs de montagne.

De nouvelles fouilles extensives, visant l'excavation d'un maximum de momies et autres artefacts archéologiques, semblerait être une solution efficace afin de conserver ces vestiges menacés, mais se pose alors le problème du manque de place et de moyens pour les conserver. Les réserves des musées archéologiques régionaux sont déjà remplies d'artefacts non classés et commencer à fouiller même une petite parcelle de site pourrait mettre au jour un nombre très important de momies. A titre d'exemple, lors de la construction de la nouvelle salle dédiée à la civilisation Chinchorro du musée San Miguel de Azapa (Université de Tarapacá, Arica), des fouilles ont été réalisées sur environ 30 m² et ont mis au jour une centaine de corps : la colline surplombant le musée est en effet un grand cimetière.

▣ Dégradations des momies dans l'environnement moderne

Le problème majeur de l'excavation de ces momies millénaires, parfaitement conservées dans leur environnement funéraire, reste les conditions de conservation à l'intérieur des musées et de leurs réserves. Ainsi, privées de leurs conditions optimales de préservation – taux d'humidité très faible, température constante – et soumises aux insectes ou aux pesticides censés les protéger, bon nombre de momies voient leur dégradation reprendre. A l'heure actuelle, des moyens sont mis en place pour équiper les musées et réserves d'infrastructures adaptées – pièces à atmosphère et température contrôlées, humidité réduite et contrôlée, limitation de l'usage des pesticides, matériaux de stockage optimisés – mais cela demande bien sûr beaucoup de temps, de main d'œuvre et de financement pour mettre en place ces dispositifs partout.

De plus, malgré ces dispositifs dans les musées, une dégradation particulière est observée chez certaines momies, leur peau jusque-là bien conservée se transforme en une pâte noire luisante. Cette dégradation, qui ne touche pas toutes les momies d'un même lieu, est également observée directement sur les sites archéologiques. Est-elle due à un changement de climat ? à un nouveau microbe ou à un microbe antique entrant en action ? Pourquoi cette dégradation n'est-elle pas observée pour toutes les momies d'un même lieu ? Certaines ont-elles été protégées artificiellement durant les rites funéraires malgré leur classement comme momies naturelles ? Certaines momies sont-elles plus dégradées qu'on ne le pense ? Autant de questions auxquelles les scientifiques cherchent aujourd'hui des réponses²⁴².

4.3. Enjeux de l'étude physico-chimique des cheveux de momies

Les fouilles archéologiques pratiquées depuis des décennies dans les régions d'Arica et Parinacota ont permis de découvrir plusieurs sites antiques, certains étant probablement le berceau de la civilisation andine : les sites Camarones, Quiani, Playa Miller, Azapa et bien d'autres encore. Sur ces sites, des traces d'occupation sont retrouvées, tels que des outils ou des armes, des ossements animaux, des vestiges d'habitat parfois et également des cimetières renfermant un nombre important de momies de différentes périodes.²³⁵ Ces momies aux chevelures souvent abondantes constituent pour les chercheurs une source extraordinaire d'informations sur les civilisations préhispaniques de la côte andine. Depuis les premières fouilles en 1917, les spécialistes ont étudié les ossements, répertorié le nombre d'individus masculins ou féminins, leur âge probable au moment du décès,^{205,235} détecté des pathologies^{12,208,212,223,226,243,244} ou des signes de violence^{10,208}. Ils ont pu décrypter les techniques utilisées pour la pêche, la chasse, la fabrication des outils, des textiles, ou encore la préparation des momies,^{205,208} et ce parfois au détriment de la conservation et préservation des artefacts archéologiques, comme expliqué précédemment dans ce chapitre, partie 4.2.2. Les techniques d'analyses actuelles permettent d'aller encore plus loin dans l'étude de ces restes humains et archéologiques²²⁸ tout en les préservant un maximum, grâce aux analyses élémentaires^{5,20,23}, structurales^{20,245,28}, isotopiques^{15,22,213,246} et moléculaires^{8,247-249}.

4.3.1. Intérêt de l'analyse des cheveux par rapport à d'autres matrices biologiques

En archéométrie, les travaux de recherche dédiés aux restes humains se sont longtemps focalisés sur les matériaux à base de collagène, tels que la peau ou les os, ou sur les dents. En effet,

l'analyse de ces différents biomatériaux permet entre autres la reconstruction des régimes alimentaires^{11,15,214}, des mouvements de populations²¹⁴ ou de l'émergence de pathologies^{224,244}. Même s'ils permettent d'obtenir des informations précieuses, ces matériaux ont cependant leurs limites. Par exemple, la vitesse de régénération des os implique que les valeurs isotopiques pour la reconstruction de la paléo-alimentation représenteront une moyenne sur les 5 ou 10 dernières années de la vie d'un individu²¹⁴. Également, le taux de collagène conservé dans les os dépasse rarement les 20 % contre 40 % initialement présents^{19,214}, ce qui nécessite un échantillonnage très invasif qui peut considérablement détériorer les restes étudiés. Les cheveux présentent de nombreux avantages et constituent une matrice de choix renfermant une mine d'informations. En effet, grâce à sa structure et son grand nombre de ponts disulfures (voir précédemment dans ce chapitre, partie 3.2), ce biomatériau est extrêmement robuste et peut être conservé pendant des millénaires, lorsque placé dans des conditions appropriées^{27,28}.

Comme expliqué précédemment, les rites funéraires complexes des civilisations préhispaniques des Andes incluaient l'ajout d'une perruque de cheveux humains à la préparation du corps, cheveux qui pouvaient être ceux du défunt ou parfois d'un autre individu de la société. Les momies retrouvées sur les sites archéologiques de la côte Pacifique du nord du Chili ont ainsi la particularité d'avoir d'abondantes chevelures, qui semblent très bien conservées. À mesure que l'on a pris conscience de l'intérêt des analyses des cheveux de momies, les chercheurs se sont de plus en plus intéressés à ce biomatériau, ce qui a donné lieu à une quantité importante de travaux de recherche centrés sur l'étude des cheveux archéologiques. Les principaux objectifs de ces travaux sont détaillés ici.

▣ **Kératines capillaires et analyses isotopiques**

Comme mentionné précédemment dans ce chapitre (Partie 3.2.), les protéines capillaires – les kératines et protéines associées aux kératines – représentent 80 à 90 % en masse du cheveu. Extraire une quantité suffisante de kératines pour les analyses nécessite donc un échantillonnage beaucoup moins invasif que pour les os ou les dents, qui, lorsqu'il est réalisé avec soin, n'est pas visible sur la chevelure étudiée. Ainsi, utiliser les kératines capillaires pour la datation par le carbone 14 d'une momie permet d'obtenir des résultats fiables tout en minimisant l'impact de l'échantillonnage.^{19,250}

De plus, la fibre capillaire est un puissant indicateur biologique et environnemental, qui intègre au fur et à mesure de sa pousse les molécules présentes dans le sang. Ainsi, le cheveu s'accorde très bien avec l'expression « *You are what you eat* » comme démontré par O'Connell et ses collaborateurs sur des cheveux modernes^{215,251}, et peut refléter le régime alimentaire d'un individu dans les 6 derniers mois de sa vie, ou plus selon sa longueur.²²

▣ Etude de l'impact environnemental et toxicologie

Dans la même logique, les cheveux sont une matrice de choix en toxicologie analytique¹⁷. Parmi les composés assimilés par le cheveu *via* l'apport en sang, des polluants environnementaux^{5,20,23,252} ou bien des drogues ingérées par l'individu étudié^{136,253,254} peuvent être détectées.

▣ Traitements capillaires

Enfin, les cheveux ne délivrent pas uniquement des informations sur leur composition mais peuvent aussi fournir des informations précises concernant les traitements capillaires au cours de la vie d'un individu ou après sa mort, pendant les rites funéraires par exemple. Les civilisations préhispaniques des Andes utilisaient en effet des pigments pour colorer leurs cheveux de leur vivant ou bien ceux des momies²⁰.

Les cheveux de momies peuvent ainsi représenter une source d'information incroyable sur le mode de vie et l'environnement des civilisations antiques, représentant une bonne alternative ou un bon complément à l'analyse des os et des dents. Il faut cependant rester prudent lors de la préparation des échantillons et de l'interprétation des résultats d'analyse.

▣ Modèle de dégradation capillaire

L'analyse de cheveux anciens n'est pas seulement importante d'un point de vue historique, mais également biologique. En effet, étudier l'état de préservation de cheveux archéologiques peut fournir des informations primordiales sur les voies de dégradation de ce matériau biologique, ainsi que sur la répercussion de certains contaminants environnementaux sur nos cheveux. Ces travaux peuvent ainsi permettre de prendre du recul vis-à-vis de la préservation des cheveux modernes et de leurs interactions avec notre environnement actuel.

4.3.2. Représentativité et fiabilité des résultats d'analyse

▣ Contaminations des échantillons

Au fil des millénaires, une momie est exposée à divers contaminants : composés issus du sol ou de l'environnement dans lequel elle est conservée, contaminants dus à son excavation, son transport et sa manipulation par l'homme, ou encore contaminations au laboratoire pendant la préparation de l'échantillon. Il faut donc prendre en compte ces différents risques et faire en sorte de les maintenir au minimum afin de s'assurer de la fiabilité des résultats d'analyse. Une bonne connaissance de l'environnement de la sépulture de la momie est ainsi primordiale – données géologiques, analyses des sols et sédiments environnants, etc. Il en est de même pour les différents traitements appliqués à

la momie après son excavation – matériaux utilisés pour le stockage, manipulations à mains nues ou avec des gants, traitements aux pesticides pour la conservation dans les réserves, *etc.* Egalement, les cheveux étant composés majoritairement de kératines, les contaminations par les kératines modernes peuvent être très importantes, avec notamment la laine des vêtements ou encore les contaminations provenant directement des cheveux des chercheurs. Pour s'affranchir un maximum de ces contaminations, il est donc important de s'équiper de protections individuelles adaptées et de systématiquement préparer des contrôles, afin de pouvoir vérifier l'absence de contamination ou dans le cas contraire, de facilement les détecter.

▣ Etat de préservation des cheveux au niveau moléculaire

La question de l'état de préservation des matériaux d'intérêt est primordiale en archéométrie. En effet, ceux-ci sont généralement d'origine naturelle et possèdent de ce fait une composition moléculaire complexe. Ils ont également subi différents processus de dégradation biologique, anthropique ou due au temps et à l'environnement, au cours de leur période de vie mais aussi après leur mort, ce qui a rendu leur composition moléculaire considérablement hétérogène⁸. Ainsi, caractériser la composition de ces matériaux le plus précisément et le plus exhaustivement possible constitue un véritable challenge analytique. Comme tout matériau organique, les cheveux subissent également l'influence du temps et du climat, dont certaines modifications sont bien visibles au cours de la vie d'un individu²⁰⁰. Il est alors facile de s'imaginer qu'une conservation dans le sol ou à l'air libre sur une période de plusieurs milliers d'années ne resterait pas sans effet sur la fibre capillaire^{25,239,28,255}.

Analyser les cheveux d'un point de vue moléculaire ou élémentaire sous-entend que la préservation du matériau doit être suffisante pour refléter sa composition originelle et ne risquer aucune perte d'information majeure ou, dans le cas contraire, que les mécanismes de dégradation soient connus afin de pouvoir remonter à la molécule précurseur à partir des produits de dégradation détectés. De plus, savoir si les molécules d'intérêt sont suffisamment bien préservées ou non permet d'adapter l'approche analytique utilisée – adaptation de la quantité d'échantillon prélevé et des protocoles de traitement, choix des techniques d'analyse, fiabilité de l'interprétation des résultats, etc.

Bien entendu, selon l'environnement dans lequel les cheveux sont préservés, ces modifications seront plus ou moins marquées. Mais faut-il pour autant s'imaginer que grâce aux conditions chaudes et arides du désert d'Atacama, les cheveux des momies de la côte andine ont été parfaitement préservés ? Nous reviendrons sur cette question dans la suite du manuscrit.

Chapitre B

-

Mise en œuvre expérimentale

Ce deuxième chapitre est dédié à la description des différents protocoles mis en œuvre pour la préparation des échantillons, dans le cadre des analyses réalisées au laboratoire, à la plateforme de protéomique de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC, Strasbourg) et au Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France (C2RMF, Paris), ainsi que les paramètres d'analyses et de traitements des données expérimentales.

Ce chapitre est divisé en 4 parties :

1. Le matériel et les précautions spécifiques à la mise en œuvre expérimentale de ces travaux
2. Les analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF sur cible en acier inoxydable et sur plaque de chromatographie sur couche mince,
3. Les analyses protéomiques par nanoLC-ESI-QTOF-MS/MS et nanoLC-ESI-TripleTOF-MS/MS,
4. Les analyses structurales par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR – *Fourier Transformed Infra-Red spectroscopy*), ainsi que les analyses élémentaires par microscopie électronique à balayage couplée à la microanalyse élémentaire (SEM-EDS – *Scanning Electron Microscopy - Energy Dissociative X-ray Spectroscopy*), par spectroscopie de fluorescence des rayons X (XRF – *X-Ray Fluorescence*) et par émission X induite par particules chargées (PIXE – *Particule Induced X-ray Emission*).

1. Matériels et précautions spécifiques

1.1. Produits chimiques

Le bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3), le dodécylsulfate de sodium (SDS), ainsi que les matrices MALDI SA, CA, SuperDHB et HCCA, ont été fournis par Fluka (Buchs, Switzerland). L'iodoacétamide (IAM), le DL-dithiothréitol (DTT), l'hydrochlorure Trizma® (Tris-HCl, solution tampon en protéomique), la thiourée, le désoxycholate de sodium (DCO), la trypine de qualité « protéomique », les acides trichloroacétique (TCA), trifluoroacétique (TFA) et formique (FA), le dichlorométhane (DCM), l'acétonitrile (ACN) et l'acétone ont été commandés chez Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), de même que les matrices MALDI 2,5-DHB, NPOE et DIT. L'urée a été achetée chez Acros Organic (Geel, Belgium). Le méthanol (MeOH) et le propan-2-ol (*i*PrOH) ont été fournis par Hipersolv CHROMANORM® (VWR Chemical Prolabo, Radnor, PA, USA) et l'éthanol (EtOH) par AnalaR Normapur (VWR Chemical Prolabo, Radnor, PA, USA). L'eau ultrapure (Eau UP) a été obtenue grâce au système de purification Purelab UHQ (ELGA LabWater VEOLIA Water, Anthony, France). Les calibrants pour les analyses MALDI-MS, Pepmix II et Protein Standard I ont été fournis par Bruker Daltonics (MA, USA).

Les solvants organiques utilisés sont de qualité HPLC, purs à plus de 99,9 %, et les matrices MALDI ont une pureté supérieure à 99 %.

1.2. Matériels

1.2.1. Couplage chromatographie sur couche mince - spectrométrie de masse MALDI

Les plaques TLC utilisées pour le couplage TLC-MALDI-MS direct (Merck, Darmstadt, Allemagne) mesurent 5 cm sur 7,5 cm et sont constituées d'une couche mince de gel de silice déposée sur un support en aluminium et imprégnée d'un agent fluorescent sous lumière UV à 254 nm pour la révélation optique. La phase stationnaire est non greffée pour la TLC en phase normale ou greffée de groupements alkyles C18 pour la TLC en phase inverse, et possède une taille de pores moyenne de 60 Å. Plusieurs qualités de plaques ont été comparées au cours de ces recherches. Les plaques TLC en phase directe et en phase inverse « classiques » ont une épaisseur de phase stationnaire supérieure ou égale à 200 µm et une taille de particules entre 5 et 17 µm. Les plaques chromatographiques à haute performance (HPTLC) en phase normale disposent quant à elles d'une épaisseur de silice de 150 à 200 µm, avec une taille de particules plus régulière, de moins de 10 µm, et les plaques TLC de qualité

MS (MTLC) ont une épaisseur de phase de 150 μm et une taille de particules similaire aux HPTLC. Pour une partie des essais de dépôts de matrice par pulvérisation sur les plaques TLC, un aérographe Badger 150™ a été utilisé (Badger Air-Brush Co., IL, USA).

1.2.2. Approche protéomique

Dans le cadre de la préparation des échantillons de cheveux pour les analyses protéomiques, les cartouches de dialyse, Slide-A-Lyzer, disposant d'un *cut-off* de 3.5 kDa et d'une capacité de 3 à 12 mL, ont été commandées chez Thermo Scientific Pierce (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Les cartouches SeP-Pak de SPE (Waters, MA, USA) sont constituées de 100 mg de phase stationnaire hydrophobe (greffage par des groupements alkyles C18), avec une taille de particules entre 55 et 105 μm , et une taille de pores de 125 Å. Ces cartouches permettent le dessalage d'1 mL d'échantillon.

1.3. Précautions contre les contaminations

La réalisation des différentes expérimentations a nécessité de prendre diverses précautions. Outre leur intérêt en tant que protections individuelles, ces-dernières ont principalement été mises en place, afin d'éviter toute contamination des échantillons archéologiques par des kératines (laine, cheveux modernes, etc.) ou autres composés exogènes. Les manipulations ont donc été réalisées sous la hotte ou dans une boîte à gants, avec une blouse en coton, des gants en nitrile et une charlotte recouvrant les cheveux. Les réactifs et solvants ont également été choisis avec une pureté élevée.

De plus, afin d'éviter toute contamination inter-échantillons ou au cours du stockage, la verrerie et les ustensiles ont été systématiquement nettoyés avant et après utilisation, par lavages successifs à l'eau UP, à l'*i*PrOH, à l'acétone et au DCM, puis enveloppés dans une feuille de papier aluminium en attendant la prochaine utilisation. De même, les différents plans de travail ont été recouverts d'une double feuille de papier aluminium pour s'assurer de la propreté des surfaces.

2. Analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse MALDI-TOF a été utilisée tout au long de ces travaux avec deux objectifs. Dans le cadre de l'analyse protéomique de cheveux archéologiques, elle a tout d'abord permis l'obtention des empreintes protéiques et peptidiques massiques des cheveux archéologiques étudiés, préparés selon différents protocoles détaillés dans le Chapitre C (Partie 2.2.2). La spectrométrie de masse MALDI-TOF a cependant été principalement mise en œuvre pour l'analyse et la caractérisation de systèmes archéologiques et biologiques, dans le cadre de la mise en place du couplage direct TLC-MALDI-MS dont fait l'objet le chapitre D. Deux types de préparation ont ainsi été nécessaires : la préparation des dépôts sur cible et celle des plaques TLC pour leur insertion directe dans le spectromètre de masse MALDI Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics).

2.1. Préparation des échantillons pour les analyses par spectrométrie de masse MALDI

2.1.1. Solubilisation des échantillons

Les échantillons étant parfois disponibles sous forme lyophilisée ou séchée, une étape de solubilisation peut s'avérer nécessaire en amont du dépôt sur la cible ou la plaque TLC.

☞ L'albumine de sérum bovin comme référence sur TLC pour les protéines entières

L'albumine de sérum bovin (BSA – 66 430 kDa, Sigma Aldrich), utilisée pour la mise en place des conditions de préparation des plaques TLC (Chapitre D), est fournie sous forme lyophilisée à conserver à 4°C. Les solutions de BSA de différentes concentrations nécessaires aux expérimentations sur TLC sont obtenues par solubilisation d'une masse donnée de produit (pesée à 0,1 mg près) dans un mélange Eau UP/ACN (1:1, v/v). La solution de BSA est ensuite déposée sans préparation supplémentaire sur la cible ou les plaques TLC.

☞ Le digest de cytochrome C comme référence sur TLC pour les peptides

Le digest tryptique de cytochrome C (800-2 000 Da – Thermo Scientific), stocké à -18°C sous forme lyophilisée, est initialement conditionné dans des tubes contenant 1,6 nmol de produit. 200 µL d'un mélange Eau UP/ACN 95:5 0,05 % de TFA sont ajoutés dans chaque tube, afin de solubiliser le digest, puis des aliquots de 5 µL à 8 µM sont réalisés et stockés à -18°C. Pour le dépôt sur cible ou plaque TLC, aucune étape de préparation supplémentaire n'est nécessaire.

▣ Les phospholipides, composés de référence sur TLC pour les petites molécules organiques

Les phospholipides (PL – gamme de masse 700-900 Da, Sigma Aldrich) de référence utilisés pour le développement du couplage direct TLC-MALDI-MS (phosphatidylcholine PC, phosphatidyléthanolamine PE et sphingomyéline SM) sont fournis sous forme lyophilisée à conserver à -18°C. Pour le dépôt sur cible ou sur plaque TLC, des solutions de PL à environ 8 mg/mL, soit 1 000 µM, sont préparées dans un mélange (MeOH/DCM 6:4, v/v). Les solutions préparées sont renouvelées au bout d'une semaine de conservation à 4°C.

▣ Le jaune d'œuf, un système modèle pour l'étude d'échantillons complexes par TLC-MALDI

Le jaune d'œuf utilisé dans le cadre du développement du couplage direct TLC-MALDI-MS a été obtenu à partir d'un œuf de poule du commerce. Des extraits organiques de jaune d'œuf ont été réalisés sur des aliquots de 20 mg à l'aide de 200 µL d'un mélange DCM/MeOH (1:1, v/v) avec un passage de 20 min dans un bain d'ultrasons. Le milieu est ensuite centrifugé (10 min, 4 000 tours/minute). Le surnageant est transféré dans un tube Eppendorf® taré, puis séché sous un flux d'azote. L'extrait organique sec obtenu est conservé à -18°C jusqu'à son analyse. Préalablement à celle-ci, l'extrait organique est de nouveau solubilisé à l'aide d'un mélange MeOH/DCM (6:4, v/v), afin d'obtenir une concentration finale de 10 mg/mL.

▣ Digests peptidiques pour l'étude des cheveux

Les extraits protéiques capillaires obtenus à partir de 500 µg et 1 mg de cheveux (Chapitre C – Partie 2.2.2) étant analysés en MALDI-MS immédiatement après l'étape d'extraction, ou de dessalage s'il y a lieu, ils sont déjà en solution et peuvent être déposés directement sur la cible pour l'analyse.

Les digests peptidiques ont été séchés par centrifugation sous vide à la suite du dessalage sur cartouche SPE (Chapitre C – Partie 2.2.2) et doivent donc être repris dans 50 µL ou 100 µL d'un mélange Eau UP/ACN (1:1, v/v) 0,1 % FA, selon la quantité de cheveux initialement engagée (500 µg ou 1 mg respectivement).

▣ Matériaux organiques solubles extraits des échantillons archéologiques

L'extraction organique réalisée sur les échantillons archéologiques pour les analyses sur TLC a été réalisée grâce à l'utilisation de DCM ou d'un mélange MeOH/DCM 6:4 (v/v). Un volume de solvant le plus faible possible est ajouté progressivement jusqu'à la solubilisation la plus complète possible des matériaux organiques extractibles. L'extrait organique solubilisé obtenu est ensuite déposé sur cible ou sur plaque TLC sans préparation supplémentaire.

2.1.2. Analyses sur cible

Les analyses classiques en MALDI-MS nécessitent l'utilisation d'une cible en acier inoxydable sur laquelle est déposé l'échantillon solubilisé. Dans le cadre de ces travaux, les dépôts ont été systématiquement réalisés selon le mode "goutte séchée" (Chapitre A – Partie 1.1.1), dépôt consistant en une goutte de 0,5 à 1 μL d'un mélange échantillon en solution/matrice, en proportions 1:1 (v/v). Dans le cadre des chapitres C et D, différentes matrices et différents mélanges de solvants ont été utilisés selon l'application recherchée, comme détaillé dans le Tableau B.1.

Tableau B. 1 – Récapitulatif des matrices MALDI et solvants utilisés pour les analyses sur cible, et de leurs applications

Matrice	Concentration	Solvant	Application
2,5-DHB	10 mg/mL	Eau UP/ACN 1:1 0,1 % TFA ou MeOH/DCM 6:4	Peptides et protéines Petites molécules organiques
SA	10 mg/mL	Eau UP/ACN 1:1 0,1 % TFA	Peptides et protéines
HCCA	10 mg/mL	Eau UP/ACN 1:1 0,1 % TFA	Petites molécules organiques, peptides et protéines
DIT	10 mg/mL	MeOH ou Acétone	Petites molécules organiques et peptides
SDHB ^a	30 mg/mL	Eau UP/ACN 1:1 0,1 % TFA	Petites molécules organiques, peptides et protéines

2.1.3. Analyses sur plaque TLC

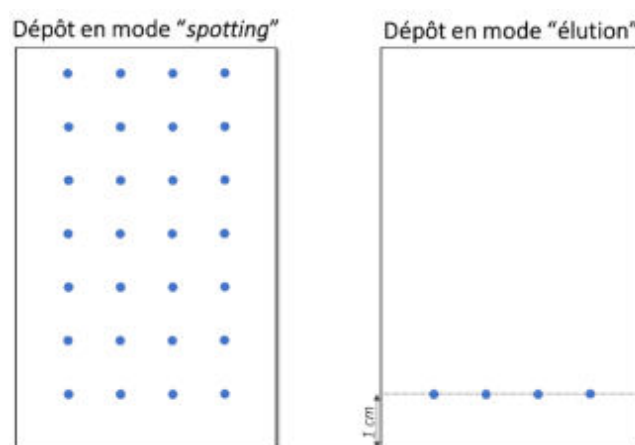


Figure B. 1 – Schéma représentatif des deux modes de dépôt des échantillons utilisés en chromatographie sur couche mince.

^a SDHB : Super DHB, mélange en proportions 9:1 de DHB et d'acide 2-hydroxy-5-methoxybenzoïque

La préparation des plaques TLC en vue de l'analyse directe MALDI-TOF-MS est plus complexe et a nécessité l'optimisation d'un certain nombre de paramètres, comme le volume d'échantillon déposé, le choix du solvant de migration ou encore les conditions de dépôt de la matrice, autant de points qui seront détaillés dans la suite de ce manuscrit au Chapitre D.

De manière générale, un volume optimisé d'échantillon solubilisé est déposé sur la plaque TLC, soit sur des points précisément localisés et régulièrement espacés sur toute la surface, dans le cadre de l'optimisation de la préparation de la plaque – mode « *spotting* », soit en bas de plaque sur une ligne de dépôt horizontale placée à 1 cm du bord de la plaque, dans le cas de l'utilisation classique de la TLC pour la séparation des composés – mode « élution » (Figure B.1). Dans ce second cas, les différents composés de l'échantillon déposé sont séparés à l'aide d'un éluant adapté, en fonction de leur polarité et de leur affinité avec les phases mobiles et stationnaires. Afin de pouvoir effectuer l'analyse par MALDI directement sur la plaque TLC, la matrice est finalement appliquée sur la totalité de celle-ci (Chapitre A – Partie 2.2.1). Dans le cadre de la mise en place du couplage TLC-MALDI-MS au laboratoire, différentes méthodes de dépôts ont été testées et comparées, telles que l'immersion de la plaque dans la solution saturée de matrice ou la pulvérisation de la matrice. Les détails de cette optimisation du dépôt et du séchage de la matrice font l'objet d'une partie du développement détaillée dans le Chapitre D. Le Tableau B.2 rapporte les différentes matrices et solvants qui ont été testés pour la mise en œuvre du couplage direct TLC-MALDI.

Tableau B. 2 – Récapitulatif des matrices MALDI et solvants utilisés pour les analyses sur TLC.

Matrice	Concentration	Solvant
2,5-DHB	25-50 mg/mL	Eau UP/ACN 1:1 avec ou sans 0,1 % TFA
SDHB	50 mg/mL	Eau UP/ACN 1:1 0,1 % TFA
SA	10-20 mg/mL	Eau UP/ACN 1:1 avec ou sans 0,1 % TFA
HCCA	10-20 mg/mL	Eau UP/ACN 1:1 avec ou sans 0,1 % TFA
DIT	10-20 mg/mL	Eau UP/ACN 1:1 avec ou sans 0,1 % TFA
CA	30 mg/mL	Eau UP/iPrOH 1:1 0,1 % TFA
NPOE		Matrice liquide

2.2. Paramètres d'analyse en MS

Les analyses MALDI-TOF-MS ont été effectuées sur un Autoflex II TOF/TOF équipé d'un laser à azote pulsé, émettant à 337 nm et fonctionnant à un voltage de 20 kV. Afin de s'affranchir des phénomènes de saturation du détecteur par la matrice, une fenêtre de suppression a été appliquée

aux analyses en mode linéaire, permettant de s'affranchir des composés de masse inférieure à 1 000 Da, pour les analyses utilisant le détecteur linéaire propre au spectromètre, ou inférieure à 7 000 Da pour les analyses utilisant le détecteur CovalX (Chapitre A – Partie 1.4.2), et ce grâce à l'allumage différé des tensions de l'appareil. De la même manière, dans le cas des analyses sur le détecteur réflectron, il a été nécessaire, dans certains cas, d'appliquer une déflexion permettant d'éliminer les ions de la matrice en dessous d'une masse fixée (Tableau B.3). Chaque spectre de masse enregistré est le résultat de la somme de 1 000 à 1 500 tirs laser sur l'échantillon, dont la puissance est optimisée pour chaque série d'échantillons et maintenue constante. De manière générale, la puissance des tirs laser peut varier entre 65 et 75 % de la puissance totale du laser. Enfin, la calibration des spectres de masse a été réalisée par l'intermédiaire du mélange de peptides commercial Pepmix II (PII – 700-3 500 Da) pour les analyses en réflectron, et à l'aide d'une mélange commercial de petites protéines Protein Standard I (P1 – 4 000-20 000 Da) pour les analyses en mode linéaire.

Tableau B. 3 – Tableau récapitulatif des méthodes MALDI mises en œuvre.

Nom	Détecteur	Ionisation	Gamme de m/z	Suppressions de signal	Calibrant
RP	Réflectron	Positive	60 - 3 000	Déflexion si nécessaire < 300, 400 ou 500 Da	Pepmix II (PII)
LP12	Linéaire	Positive	1 280 - 20 000	Fenêtre de suppression des ions de m/z < 1 000	Protein Standard I (P1)
CVX	CovalX	Positive	10 000 - 300 000	Fenêtre de suppression des ions de m/z < 7 000	P1

2.2.1. Analyses sur cible en acier inoxydable

Pour l'analyse sur cible MALDI, le réglage des différents paramètres d'acquisition est réalisé *via* le logiciel *FlexControl 3.4* (Bruker Daltonics), permettant la visualisation du spot analysé en temps réel, grâce à une caméra placée à l'intérieur de la source – ce qui facilite le choix de la zone d'intérêt – la calibration en amont des analyses, ainsi que la prévisualisation des spectres obtenus et l'enregistrement des spectres obtenus.

2.2.2. Analyses sur plaque TLC

Dans le cas du couplage direct TLC-MALDI-MS, le logiciel *FlexControl 3.4* est également utilisé pour les réglages de la méthode d'acquisition (paramètres du laser, détecteur sélectionné, mode d'ionisation). Pour le choix de la zone analysée, le logiciel dédié *TLCMALDI Wizard* (v. 1.1.7.0), connecté à *FlexControl*, a été utilisé. Celui permet notamment de sélectionner les coordonnées initiales et finales (X_i, Y) et (X_f, Y) définissant la localisation de la zone d'intérêt. De plus, comme décrit dans le Chapitre A, Partie 2.2.1., ce logiciel permet la sélection de la résolution spatiale en X ainsi que la largeur de la bande analysée en Y et le nombre de tirs à sommer pour un spectre.

2.3. Traitement des données

Les spectres MALDI obtenus sont ensuite traités à l'aide du logiciel *FlexAnalysis 3.4* (Bruker Daltonics) permettant d'attribuer les ratios m/z aux différents pics observés, et fournissant les différentes valeurs caractéristiques de l'analyse (liste des m/z , intensités, rapport signal/bruit, résolution de pic, etc.). Si nécessaire, il est possible d'effectuer une recalibration externe à partir des spectres enregistrés de calibrant, ou bien une calibration interne à partir d'ions connus sur le spectre étudié. C'est notamment ce type de calibration qui est utilisé pour la calibration des spectres TLC-MALDI obtenus en mode réflectron, à l'aide des valeurs de m/z connues de la matrice utilisée.

Les analyses d'une plaque TLC peuvent générer plus d'une centaine de spectres pour un seul échantillon. Un outil informatique (*via FlexAnalysis*) a donc été utilisé pour le traitement simultané d'un grand nombre de spectres, enregistrés avec la même méthode MS (calibration interne plus particulièrement).

3. Analyses protéomiques

Pour l'analyse protéomique des cheveux de momie, deux méthodes analytiques ont été mises en œuvre. La première (nanoLC-ESI-QTOF-MS/MS) a permis la mise en place du protocole final pour cette approche, la seconde (nanoLC-ESI-TripleTOF-MS/MS) a été mise en œuvre pour l'analyse de la totalité du corpus et des contrôles modernes. Pour ces deux méthodes, chaque échantillon de cheveux a été préparé en deux répliques, et un blanc de contrôle est préparé avec chaque série d'échantillons selon le même protocole que les cheveux.

3.1. nanoLC-ESI-QTOF-MS/MS

Les analyses pour la mise en place du protocole final sur les cheveux modernes et un échantillon de cheveux de momies ont été effectuées sur un appareil de chromatographie liquide nano-débit Ultimate 3000 (Dionex –Thermo Scientific) couplé à un spectromètre de masse microTOF-Q II (Bruker Daltonics).

3.1.1. Préparation de la séquence d'analyse

Chaque séquence d'analyse réalisée par cette approche a été préparée de la même manière. Afin d'équilibrer le système, un premier blanc débute la séquence, programmé avec les mêmes paramètres de séparation chromatographique et d'analyse en MS et MS/MS que les échantillons. Ensuite, un digest de BSA est séparé et analysé afin de s'assurer des performances du couplage. Deux nouveaux blancs sont programmés, afin d'éliminer d'éventuels résidus de digest de BSA, puis un digest de cheveux suivi de 3 blancs, ce qui permet de s'affranchir de toute contamination d'un échantillon par celui qui le précède. L'enchaînement "1 échantillon suivi de 3 blancs" est répété autant de fois que nécessaire. La séquence se termine par le passage d'un digest de BSA, afin de vérifier qu'il n'y a eu aucune perte de performance à la suite de la séquence d'analyses, puis un blanc est programmé et le système est finalement équilibré avec un solvant neutre – Eau UP/ACN/MeOH 1:1:1 (v/v/v) – pour sa mise en repos.

▣ Digests de BSA

Le digest de BSA utilisé pour ces analyses (Bruker Daltonics) est reçu sous forme lyophilisée à conserver à -18°C dans des tubes de 500 pmol de digest. 250 µL d'Eau UP 0,05 % FA sont ajoutés dans les tubes afin de solubiliser le produit, puis des aliquots de 5 µL à 2 pmol/µL sont réalisés et stockés à -18°C. Après ajout de 78 µL d'un mélange Eau UP/ACN 98:2 (v/v) 0,1 % FA, des échantillons de digest de BSA à 120 fmol/µL sont obtenus pour l'analyse par nanoLC-MS/MS.

▣ Blancs

Pour la séquence d'analyses, les blancs réalisés sont constitués d'un mélange Eau UP/ACN 1:1 (v/v) 0,1 % FA, identique au mélange de resuspension des digests dessalés de cheveux.

En fin d'analyse, pour le rinçage et la mise au repos du système chromatographique, un blanc simplement composé d'eau UP est utilisé.

▣ Digests de cheveux modernes et archéologiques et contrôle du traitement

Comme pour la préparation avant l'analyse MALDI-MS, les digests peptidiques de cheveux, séchés par centrifugation sous vide à la suite du dessalage sur SPE (Chapitre C – Partie 2.2.2), ont été resuspendus dans 50 ou 100 µL d'un mélange Eau UP/ACN (1:1, v/v) 0,1 % FA, selon la quantité initiale engagée (500 µg ou 1 mg). De plus, pour chaque série d'échantillons, un blanc de traitement est réalisé avec de l'eau UP. Ce contrôle permet de s'assurer de la non-contamination de la série d'échantillons par des kératines modernes (vêtements, cheveux, etc.) et, s'il y a contamination, de pouvoir l'identifier rapidement.

3.1.2. Paramètres de séparation chromatographique pour le couplage nanoLC-MS/MS

Les différents paramètres nécessaires à la séparation par nanoLC en amont du couplage avec la MS sont fixés à l'aide du logiciel *HyStar* (Bruker Daltonics), permettant d'une part de programmer la séquence d'analyse, la méthode nanoLC (injection, solvants, gradient, etc.), la méthode d'analyse en MS et d'autre part de suivre l'évolution des pressions sur l'appareil chromatographique.

▣ Injection

L'appareil de nanoLC Ultimate 3000 est équipé d'un module d'échantillonnage automatique pour l'injection dans le circuit chromatographique, fixé à une température de 10°C pendant toute la séquence. Le circuit d'injection est rincé avant et après l'injection à l'aide d'un mélange Eau UP/ACN 95:5 (v/v). Les différents échantillons sont injectés en mode « *full loop* », ce qui consiste en un

prélèvement de 6 μL d'échantillon, 5 μL étant destinés au rinçage du circuit d'injection et 1 μL à l'injection finale dans le système.

▣ Chargement de l'échantillon et séparation

Le système de solvant utilisé pour la séparation des échantillons d'intérêt est constitué d'Eau UP acidifiée par 0,2 % de FA (solvant A) et d'ACN acidifié par 0,2 % de FA (solvant B).

Après l'injection, l'échantillon est chargé sur la pré-colonne (PepMAp100, phase inverse C18, 300 μm de diamètre interne (ID), particules de 5 μm , pores de 100 Å) par 2 % de B à un débit de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, puis le digest est transféré dans la μ -colonne analytique (Acclaim PepMap100 NanoViper, phase inverse C18, 75 μm ID x 15 cm, particules de 3 μm et pores de 100 Å).

La séparation des peptides est réalisée par l'application d'un gradient de 90 min de 2 % à 55 % de B, à un débit de 300 nL/min (Figure B.2). Parmi les différents gradients testés, celui-ci permet d'obtenir un compromis entre une séparation optimale des peptides et un temps d'analyse qui ne soit pas trop long. Plus précisément, le pourcentage de B est initialement fixé à 2 % pour un palier de 5 min, puis la proportion de B est augmentée jusqu'à 55 % sur une rampe de 50 min, le système est maintenu à 55 % de B pendant 15 min, avant de revenir à 2 % de B en 5 min pour terminer le gradient par un palier de 15 min à ce pourcentage. En sortie de colonne, les peptides séparés sont acheminés vers le spectromètre de masse au débit de 300 nL/min, *via* un capillaire en gaine de silice connecté à la source d'ionisation grâce à une aiguille de nébulisation nano-débit (cf. Chapitre A – Partie 1.1.2).

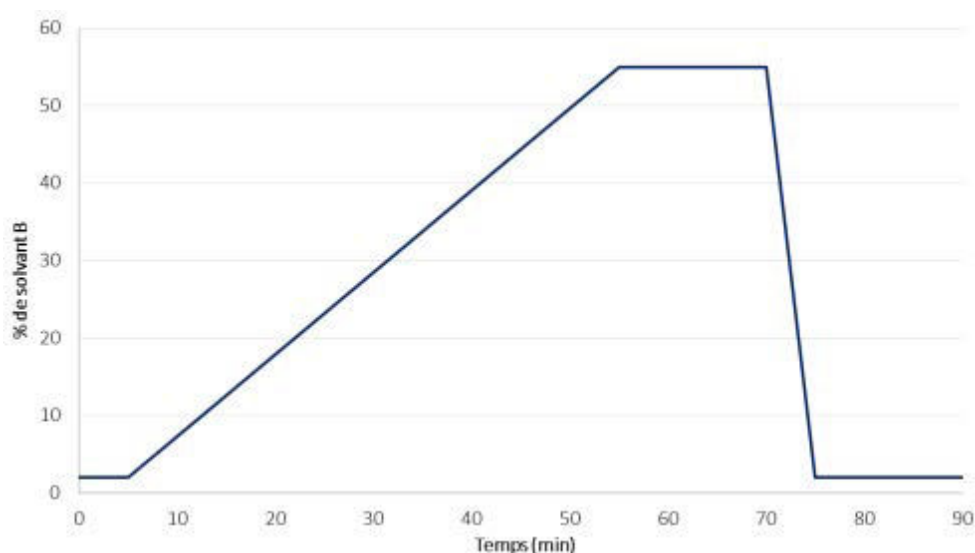


Figure B. 2 – Gradient en pourcentage de solvant B appliqué pour les analyses par nanoLC-ESI-QTOF-MS/MS.

3.1.3. Paramètres d'analyse en MS/MS

L'ionisation des composés d'intérêt est effectuée en mode positif. Pour les 90 minutes d'analyse, la tension de cône appliquée est de -4,5 kV, les débits du gaz nébuliseur et du gaz de désolvatation sont respectivement fixés à 0,4 bar et 4,0 L/min, et la température de la source à 180°C. Pour chaque scan MS sur une gamme de masse comprise entre m/z 100 et 3000, les 3 ions précurseurs les plus intenses sont sélectionnés pour la fragmentation CID, selon un temps de cycle total de 2 secondes. Les données sont ensuite compilées *via* les logiciels *Biotools 3.2* et *ProteinScape 3.1* (Bruker Daltonics) selon les paramètres décrits dans ce chapitre, Partie 3.3.

3.2. nanoLC-ESI-tripleTOF-MS/MS

Les analyses de la totalité des échantillons de cheveux archéologiques et modernes, après validation du protocole final, ont été réalisées à la plateforme de protéomique de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC, Strasbourg). L'appareillage utilisé pour les analyses nanoLC-MS/MS est basé sur un système NanoLC-2DPlus (module nanoFlexChiP, Sciex Separations) couplé à un spectromètre de masse TripleTOF 5600 (Sciex).

3.2.1. Préparation des échantillons

Les digests peptidiques dessalés de cheveux ont été préparés comme décrit précédemment dans ce chapitre, partie 3.1.1, par resuspension dans 100 ou 50 μ L d'un mélange Eau UP/ACN 1:1 (v/v) 0,1 % FA, selon la quantité initiale de cheveux engagée – respectivement 1 mg ou 500 μ g. 10 μ L de l'échantillon ainsi solubilisé ont été prélevés et dilués 50 fois à l'aide d'eau UP acidifiée par 0,1 % de FA (solvant A).

3.2.2. Paramètres de séparation chromatographique pour le couplage nanoLC-MS/MS

Pour l'analyse par nanoLC-MS/MS, 5 μ L de l'échantillon d'intérêt sont injectés dans le module chromatographique. Le système de solvant utilisé est constitué d'un mélange Eau UP 0,1 % FA (solvant A) et d'un mélange ACN 0,1 % FA (solvant B). Les peptides sont ensuite chargés sur une pré-colonne C18 (ChIP C-18, 300 μ m ID x 5 mm, pores de 120 Å, ChromXP ; Sciex Separations), transférés à la colonne analytique C18 (ChIP C-18, 75 μ m ID x 15 cm, pores de 120 Å, ChromXP ; Sciex Separations), puis élués à l'aide d'un gradient de 5 à 40 % de solvant B pendant 60 min (Figure B.3), à un débit de

300 nL/min. En sortie de colonne, les peptides séparés sont transférés *on-line* à la source ESI du TripleTOF.

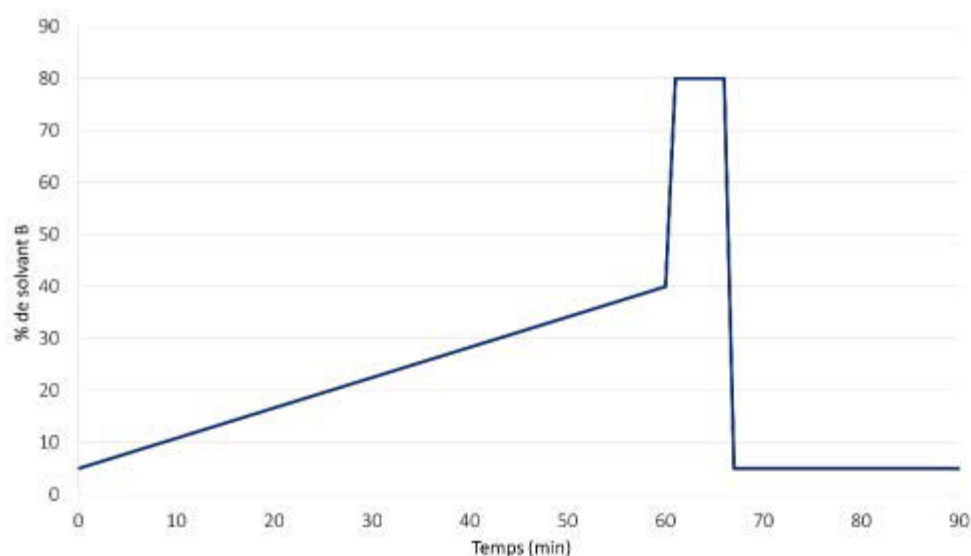


Figure B.3 – Gradient en pourcentage de solvant B appliqué pour les analyses par nanoLC-ESI-TripleTOF-MS/MS.

3.2.3. Paramètres d'analyses en MS/MS

Les analyses en MS sont réalisées en mode d'ionisation positif et l'acquisition des données à haute sensibilité est réalisée sur la gamme m/z 350 et m/z 1250, selon un mode « données-dépendant » à l'aide du logiciel *Analyst 1.6* (Sciex). Le cycle d'analyse de 3,3 secondes s'appuie sur la méthode *Discovery "Top20"*, qui sélectionne jusqu'à 20 ions précurseurs pour la fragmentation CID, parmi les ions multichargés (de 2 à 5 charges) les plus intenses. Les données MS/MS sont ensuite compilées via les logiciels *Biotoools 3.2*, *ProteinScape 3.1* (Bruker Daltonics) et *ProteinPilot 4.0* (Sciex) selon les paramètres décrits dans ce chapitre, Partie 3.3.

3.3. Recherches dans les bases de données protéomiques

3.3.1. Traitement des données MS/MS des analyses nanoLC-ESI-QTOF-MS/MS

Les données MS/MS obtenues au laboratoire ont tout d'abord été traitées en utilisant l'algorithme de recherche *Mascot 2.2.06* (Matrix Science), via les bases de données protéomiques *SwissProt* (Sp_20130109) et *Human_Up11-6*, à l'aide des logiciels dédiés *Biotoools 3.2* et *ProteinScape 3.1*. Les recherches ont été lancées via les bases de données *decoy*, qui contiennent les séquences inversées des peptides de la base, et ce afin de calculer le taux de faux positifs (FDR) pour les peptides.

Dans le cas des deux logiciels, le choix des paramètres a permis la focalisation des recherches sur la taxonomie « *Homo Sapiens* », et sur les peptides suivant les règles de coupure de la trypsine (coupures après les lysines et les arginines et possibilités de coupure après les prolines) et ne présentant pas plus de 3 coupures manquées. La tolérance en masse a été fixée à ± 30 ppm pour les ions précurseurs et à $\pm 0,5$ Da pour les fragments, et la *p-value* (seuil significatif) a été définie comme devant être inférieure à 0,05. Enfin, un certain nombre de modifications variables ont été recherchées.

Dans un premier temps, la recherche s'est concentrée sur les acétylations en N-terminal (+42,011 Da), les carbamidométhylations des cystéines (+57,021 Da), les carbamylations en N-terminal (+43,006 Da), les cyclisations des glutamines en N-terminal (-17,027 Da), les déamidations des asparagines et glutamines (+0,984 Da), les méthylations des acides aspartiques et glutamiques (+14,016 Da) et les mono-oxydations des cystéines et méthionines (+15,995 Da). Dans un second temps, les di-oxydations et tri-oxydations des cystéines (+31,990 Da et +47,985 Da) ont également été recherchées.

Le logiciel *ProteinScape 3.1* offre la possibilité de fixer un certain nombre de paramètres supplémentaires permettant de vérifier la validité des peptides et protéines identifiés. Notamment, il a été possible de fixer la longueur minimale d'un peptide à 3 résidus, et les scores *Mascot* d'identification minimaux acceptés à 80 pour les protéines et 20 pour les peptides.

Le logiciel *Biotoools 3.2* ne permettant pas de fixer ces critères de validation, celle-ci a été effectuée manuellement sur les listes de protéines et peptides identifiés.

De plus, dans les deux cas, un critère supplémentaire a été ajouté manuellement, fixant le nombre de peptides caractéristiques minimum requis pour accepter l'identification d'une protéine à 2 (peptides présents pour une seule protéine identifiée).

3.3.2. Traitement des données MS/MS des analyses nanoLC-ESI-TripleTOF-MS/MS

▣ Recherche des peptides tryptiques

La totalité des données MS/MS obtenues ont tout d'abord été converties en format « mgf » (*Mascot Generic File*) à l'aide du script *MS-Data Converter* de *PeakView*. Les mgf obtenus sont compilés en utilisant l'algorithme de recherche *Mascot 2.2.06* (Matrix Science) via la base de données *decoy Swissprot* (Sp_20130109), à l'aide des logiciels *Biotoools 3.2* et *ProteinScape 3.1*.

Comme décrit précédemment Partie 3.3.1., pour les deux logiciels, le choix des paramètres a été le suivant : taxonomie « *Homo Sapiens* », et recherche des peptides suivant les règles de coupure de la trypsine et ne présentant pas plus de 3 coupures manquées. La tolérance en masse a été fixée à ± 30 ppm pour les ions précurseurs et à $\pm 0,5$ Da pour les fragments, et la *p-value* (seuil significatif) a été

définie comme devant être inférieure à 0,05. Les modifications variables recherchées dans un premier temps sont les carbamidométhylations des cystéines (+57,021 Da), les carbamylations en N-terminal (+43,006 Da), les déamidations des asparagines et glutamines (+0,984 Da), les méthylations des acides aspartiques et glutamiques (+14,016 Da) et les mono-oxydations des cystéines et méthionines (+15,995 Da). Dans un second temps, les di-oxydations et tri-oxydations des cystéines (+31,990 Da et +47,985 Da) ont également été recherchées.

Les critères de validation définis dans *ProteinScape 3.1* ont permis de fixer la longueur minimale d'un peptide à 3 résidus, la valeur-seuil du score des peptides à 15 et le FDR maximum pour les protéines à 1 %. Le logiciel *Biotoools 3.2* ne permet pas de définir de FDR maximum, que ce soit pour l'identification des peptides ou des protéines. Il a été nécessaire dans ce cas, d'effectuer cette étape de validation manuellement. Pour cela, un certain nombre de protéines identifiées pour chaque analyse n'ont pas été acceptées, afin de limiter systématiquement le nombre de protéines identifiées *via* la base *decoy* et donc d'atteindre un FDR inférieur à 1 % pour les protéines.

▣ Recherche des peptides non-tryptiques

Pour un échantillon donné, les peptides non-identifiés par les recherches décrites dans le paragraphe précédent ont été regroupés dans un nouveau fichier de données MS/MS du type « mgf », afin de lancer une nouvelle recherche à l'aide du logiciel *ProteinPilot 4.0* (Sciex). Ce logiciel permet d'effectuer une recherche sans *a priori* sur les modifications pouvant être présentes dans l'échantillon et sur des fichiers de taille importante.

La recherche a été effectuée *via* la base de données *decoy SwissProt* (SwissProt_201410) selon les paramètres suivants :

- i) la recherche est effectuée pour une identification des protéines sans objectif de quantification,
- ii) l'agent d'alkylation utilisé pour le traitement était l'iodoacétamide,
- iii) aucune enzyme de digestion n'est fixée, afin de pouvoir identifier les éventuels peptides issus de l'hydrolyse des protéines due à l'âge des échantillons,
- iv) la taxonomie est, comme pour les précédentes recherches, « *Homo Sapiens* »,
- v) la valeur-seuil de la *p-value* pour les protéines détectées est fixée à 0,05.

La recherche n'est focalisée sur aucune PTM précise possiblement présente, mais sur une recherche globale, parmi 300 modifications biologiques répertoriées dans *Unimod*, de toute modification biologique ou substitution d'acides aminés qui peut être présente sur les protéines détectées.

3.3.3. Interprétation des données MS/MS

Pour l'interprétation des données de protéomique, les pourcentages de recouvrement de séquence des différentes protéines acceptées pour un échantillon donné ont été calculés, en combinant les recouvrements obtenus pour chaque réplica de traitement. Dans le cadre de la mise en place de notre approche protéomique, la comparaison des résultats obtenus pour les trois protocoles étudiés s'est effectuée de manière globale sur l'ensemble des 6 kératines ciblées. Pour un échantillon donné, le pourcentage total de peptides modifiés représente une moyenne calculée à partir des données obtenues pour les 6 kératines d'intérêt, identifiées dans chaque réplica. Le pourcentage global d'acides aminés modifiés par une PTM cible pour chaque échantillon a été obtenu de la même manière. Les écart-types sur ces moyennes ont été calculés avec l'Equation (1).

$$\sigma = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2}{2}} \quad (1)$$

σ : l'écart-type

x_i : le pourcentage total de peptides modifiés ou le pourcentage de résidus modifiés pour chaque PTM, avec $i=1$ pour le premier réplica et $i=2$ pour le second réplica

\bar{x} : le pourcentage moyen de peptides modifiés

Concernant l'application du protocole de protéomique final au corpus de cheveux archéologiques (cf. Chapitre C – Partie 3), l'interprétation des résultats s'est effectuée en regardant séparément les données obtenues pour les 6 kératines majoritaires. Les pourcentages de résidus modifiés, pour chaque PTM recherchée et par kératine d'intérêt, ont ainsi été calculés en combinant les recouvrements de séquence et l'identification des résidus modifiés pour chaque réplica.

4. Analyses physico-chimiques

Les analyses visuelles, structurales et élémentaires ont été effectuées au Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France (C2RMF, Paris), grâce à l'aide précieuse de l'équipe d'AGLAE+ (Accélérateur Grand Louvre pour l'Analyse Élémentaire).

4.1. Préparation des échantillons

4.1.1. Lavage des échantillons

Pour ces différentes analyses, les cheveux sont analysés sans nettoyage préalable d'une part, et après une étape de nettoyage d'autre part. Pour ce lavage, les cheveux bruts sont tout d'abord placés dans un bain d'eau UP, afin d'enlever les éventuels résidus de surface, puis les éventuels matériaux organiques solubles sont extraits de la surface du cheveu par un mélange MeOH/DCM 1:1 (v/v). Les cheveux sont ensuite rincés à l'eau UP, puis soumis à un bain d'acétone et finalement rincés trois fois à l'eau UP.

4.1.2. Préparation de l'échantillon pour la microscopie électronique à balayage

Pour l'observation SEM, un ou deux fragments de cheveux d'1 cm de longueur sont fixés sur un support adapté, à l'aide de ruban adhésif au carbone. N'étant pas des matériaux conducteurs, les fibres capillaires choisies ont été tout d'abord recouvertes d'une couche conductrice à base de carbone – environ 10 nm – ou à base d'un mélange Pt/Pd – environ 1,2 nm.

4.1.3. Préparation de l'échantillon pour la spectroscopie de fluorescence des rayons X et l'imagerie par faisceau d'ions

Pour ces analyses, une mèche de quelques cheveux, la plus fine possible (deux ou trois cheveux d'épaisseur) est placée entre deux feuilles de carton, percées au préalable d'un trou, afin de laisser une partie de la mèche apparente (Figure B.4). Les cheveux maintenus dans ce portoir peuvent ainsi être placés devant l'appareil à l'aide d'une pince, et la position de l'échantillon facilement adaptée aux besoins de l'analyse.



Figure B. 4 – Photographie du porte-échantillon réalisé pour les analyses élémentaires par XRF et PIXE.

4.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

Pour cette étude, nous avons utilisé un spectroscope FTIR (Perkin-Elmer) équipé d'un accessoire *Golden Gate™* (Specac) à cristal de diamant – mono-réflexion, indice de réfraction de 2,4 à 1000 cm^{-1} – pour des analyses en réflexion totale atténuée (ATR – *Attenuated Total Reflectance*), avec un angle de 45° . Le dépouillement des spectres a été effectué à l'aide du logiciel *OMNIC* (Perkin-Elmer). Pour chaque analyse, une fine mèche aplatie, composée de deux ou trois cheveux, a été analysée. Dans ces conditions expérimentales, l'analyse ne permet pas d'étudier la structure du cheveu de manière globale, mais seulement la structure de la surface du cheveu (la cuticule) sur une profondeur d'environ $1\text{ }\mu\text{m}$.

4.3. Analyses élémentaires

4.3.1. Microscopie électronique à balayage et microanalyse élémentaire

Les observations morphologiques de la surface du cheveu, combinées à la micro-analyse élémentaire ont été réalisées par SEM-EDS.

Les observations ont été réalisées à l'aide de deux appareils : un SEM XL30 CP de chez FEI et un SEM 7800F de chez JEOL, équipé d'un canon à effet de champ (FEG – *Field Effect Gun*) permettant l'obtention d'images à plus haute résolution. Ces appareils sont équipés de détecteurs à dérive au silicium (SDD – *Silicon Drift Detector*) pour la microanalyse élémentaire par rayons X. L'appareil XL30 CP dispose d'un détecteur SDD X-MAX 50 (Oxford Instruments), équipé d'une fenêtre de béryllium et d'une surface active de 50 mm^2 . Le FEG-SEM 7800F dispose quant à lui de deux détecteurs SDD AXS 6|30 (Bruker), équipés d'une fenêtre de Be et d'une surface active de 30 mm^2 . Les observations morphologiques ont été réalisées en mode « électrons secondaires » (SE – *Secondary Electrons*) avec

une tension d'accélération de 5 keV et une distance de travail d'environ 4 mm. Le mode « électrons rétrodiffusés » (BSE – *Back Scattered Electrons*) a été utilisé pour les analyses élémentaires grâce à une tension d'accélération de 15 ou 20 keV et une distance de travail de l'ordre de 10 mm. Dans ces conditions, la profondeur d'analyse est d'environ 1 μm , la microanalyse est donc limitée, dans notre cas, à l'analyse de la surface (diamètre minimum d'un cheveu de l'ordre de 50 μm).

Les images et spectres EDS obtenus sont finalement traités à l'aide des plateformes analytiques *AZtec Energy Advanced* pour les analyses sur le SEM XL30 CP, et *Bruker Quantax Duo 400*, logiciel *Esprit*, pour les analyses sur le FEG-SEM 7800F.

4.3.2. Spectroscopie de fluorescence des rayons X et imagerie par faisceau d'ions

Les analyses élémentaires globales du cheveu ont été réalisées par deux techniques : la spectroscopie XRF et l'imagerie PIXE.

▣ Paramètres d'analyse en XRF

L'appareil du C2RMF est équipé d'un tube à rayons X Moxtek à anode de Mo (raies d'énergie $K\alpha$ à 17,5 keV et $K\beta$ à 19,6 keV), alimenté par une tension de 40 kV et une intensité de 800 μA . Un absorbeur de Co de 50 μm d'épaisseur a été placé à la sortie du tube, afin de réduire le bruit de fond dans la zone d'intérêt (entre 7,5 et 15 keV). L'échantillon est placé à une distance d'environ 1 cm du tube à rayons X, l'angle d'impact est de 45° et l'angle de détection de 90°. La profondeur d'analyse dans ces conditions expérimentales est d'environ 50-100 μm , ce qui correspond au diamètre moyen d'un cheveu. La détection a été effectuée par un détecteur Si à barrière de surface (XFlash 2000A Röntec) doté d'une fenêtre d'entrée en Be de 8 μm d'épaisseur. Les spectres sont collectés par un analyseur multicanal (Amtek MCA8000A portable) pendant une durée d'enregistrement de 1200 secondes et traités par le logiciel *PyMCA* (version 4.3.0).^a

▣ Paramètres d'analyse en PIXE

Les analyses PIXE s'inscrivent dans le cadre du projet PIXHAM (*PIXE imaging of Hair from Andean Mummies*), dont la proposition a été déposée et acceptée au cours de ces travaux.

^aLes spectres XRF ont été effectués avec deux détecteurs différents. Le détecteur le plus récent, plus performant, permet de détecter des éléments plus légers que l'argon, tels que le soufre et le chlore par exemple. L'absence de ces composés de certains spectres ne constitue donc pas une indication de son absence dans les cheveux analysés puisqu'elle peut être due au détecteur et non pas à l'échantillon, notamment dans le cas du soufre, élément majeur du cheveu.

L'accélérateur de particules du C2RMF est dédié aux analyses élémentaires et stratigraphiques, dites non-invasives, des objets du patrimoine historique et culturel. Le système de détection mis en place sur la ligne à faisceau extrait utilise plusieurs détecteurs à surface active, permettant d'augmenter l'angle de détection des rayons X pour obtenir rapidement des cartographies élémentaires à haute résolution^{256,257}.

Les analyses PIXE des échantillons de cheveux sélectionnés ont été réalisées à l'aide de trois détecteurs SDD (surface active de 50 mm², fenêtre d'entrée en Be de 8 µm), dont un était équipé d'un filtre en aluminium de 50 µm d'épaisseur et les deux autres de filtres en Mylar^a de 100 µm d'épaisseur – les données enregistrées par ces deux derniers détecteurs ont été sommées. L'énergie du flux de protons a été fixée à 3 MeV et son intensité à 2 nA, afin d'obtenir un diamètre de faisceau le plus petit possible, entre 30 et 40 µm. L'acquisition a été réalisée en balayant l'échantillon sur une zone large de 2000 µm et haute de 500 µm, avec une taille de pixels de 10 x 10 µm, pour des temps d'analyse entre 20 et 45 min et dose totale d'irradiation de 500 000 ou 1 000 000.

Les données brutes obtenues sont ensuite traitées *via* les logiciels spécialement développés à AGLAE : *AGLAE-Map* (v. 3.4.2)²⁵⁸ et *PLotAndROI* (v.3.1.1), permettant la visualisation des spectres PIXE d'un échantillon donné pour un détecteur donné, ainsi que la visualisation des cartographies élémentaires associées à des pics d'intérêt de ce spectre et la superposition de cartes de différents éléments.

▣ Quantification

Les procédures de quantification ont été effectuées par Thomas Calligaro et Quentin Lemasson de l'équipe d'AGLAE+. Les procédures sont reportées succinctement dans ce paragraphe.

N.B. Il est important pour ce paragraphe de noter que les résultats obtenus ici ne sont que semi-quantitatifs et constituent une indication d'un ordre de grandeur, et non pas une concentration précise.

Spectroscopie XRF

Le traitement par le logiciel *PyMCA* permet d'avoir une première approximation des quantités présentes en éléments détectés. Pour cela, une première approximation est faite, qui consiste à assimiler le cheveu à une feuille de Mylar (matrice constituant les cibles minces des standards). Les différents spectres sont alors normalisés par comparaison des massifs des raies du Mo et des raies de l'effet Compton obtenus pour les échantillons, avec ceux des cibles standards d'éléments d'intérêt de concentrations connues. Après normalisation, il est alors possible de retrouver le pourcentage

^a Mylar : poly(téréphtalate d'éthylène), PET, de formule brute (C₁₀H₈O₄)_n

massique d'un élément donné à partir des données obtenues pour la cible standard correspondante, puis d'estimer les quantités en ppm des éléments présents.

Imagerie PIXE²⁵⁸

Afin de pouvoir effectuer des calculs de quantification, trois cibles minces contenant une quantité connue d'un élément d'intérêt ont été analysées chaque jour : GaAs, CuS et Fe.

Dans un premier temps, l'angle solide a été normalisé pour une charge de 1 μC et les filtres ajustés jusqu'à ce que les spectres des standards soient acceptables. Une fois ces paramètres fixés, ils ont été entrés dans le logiciel *GUPIX/TRAUPIXE* pour les calculs de quantification. Les résultats de ces calculs ont finalement été normalisés par rapport à la dose totale reçue par les échantillons pour chaque analyse et par la surface occupée par l'échantillon sur la zone analysée.

Ces calculs nous donnent donc les quantités de chaque élément détecté dans l'échantillon en ng/cm^2 .

Chapitre C

-

Approche protéomique pour
l'étude de la conservation de
cheveux de momies
préhispaniques de la côte andine

Les cheveux de momies sont étudiés depuis des décennies par diverses techniques physico-chimiques, visant à les caractériser au niveau structural et élémentaire. Cependant, peu de travaux se sont intéressés à leur caractérisation moléculaire et à l'étude de leur état de préservation au niveau moléculaire. Pouvoir estimer cet état de conservation pourrait notamment permettre d'adapter la stratégie analytique qui sera appliquée aux échantillons de cheveux archéologiques, de s'assurer de la fiabilité des résultats d'analyse obtenus et également offrir un modèle idéal, afin d'étudier les processus de dégradation des cheveux modernes et l'influence de l'environnement sur leur conservation. Ainsi, de telles études pourraient aider à la mise en place de protocoles de conservation des cheveux de momies, grâce à une meilleure compréhension de la structure capillaire et des interactions avec son environnement.

L'objectif de cette partie des travaux de recherche était donc de mettre en place une approche interdisciplinaire, basée sur l'observation globale et structurale des fibres capillaires archéologiques et sur leur caractérisation élémentaire et moléculaire. Il s'agissait notamment d'implémenter une stratégie protéomique *bottom-up* pour l'étude des cheveux de momies, afin de s'assurer que les protéines capillaires sont toujours identifiables dans les fibres anciennes, et dans ce cas, d'aller plus loin dans leur caractérisation en s'attachant à l'étude des PTMs, des processus de dégradation et si possible, des interactions métaux-protéines – interactions arsenic-kératine plus particulièrement. Pour cela, des échantillons de cheveux modernes ont été utilisés comme référence, dans deux objectifs : d'une part, mettre en place notre approche protéomique sur des échantillons non précieux, avant de l'appliquer aux cheveux archéologiques, et d'autre part servir de référence pour l'interprétation des résultats des analyses moléculaires, mais aussi structurales et élémentaires.

Ce chapitre se divise en 4 parties :

1. La description des échantillons archéologiques étudiés et des résultats d'analyses préliminaires obtenus par observation au microscope électronique à balayage (SEM, *Scanning Electron Microscopy*) et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).
2. Le choix et la mise en place du protocole final pour l'étude protéomique par nanoLC-ESI-MS/MS des cheveux de momies du corpus ayant fait l'objet d'une publication acceptée dans le journal *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
3. L'étude de l'état de préservation des cheveux de momies du corpus par l'approche protéomique mise en place.
4. La détection des métaux dans les cheveux par microanalyse élémentaire couplée au SEM (SEM-EDS), par spectroscopie de fluorescence X (XRF) et par spectroscopie d'émission de rayons X induite par faisceau d'ions (PIXE).

1. Observations préliminaires des cheveux de momies préhispaniques de la côte andine

Dans le cadre de la collaboration entre le LSMIS (Strasbourg), le C2RMF (Paris) et le LAIA (Arica, Chili), les momies faisant l'objet de ce chapitre ont été mises à notre disposition par l'équipe du Pr Vivien Standen du Musée universitaire San Miguel de Azapa (Universidad de Tarapacá, Arica, Chili), afin d'effectuer les prélèvements de cheveux nécessaires à la datation par le carbone 14 et aux différentes analyses structurales, élémentaires et moléculaires. Les échantillons de cheveux étudiés au cours de ce travail de thèse ont été prélevés sur les têtes de momies conservées au Musée San Miguel de Azapa, en 2012 par le Dr Pascale Richardin (C2RMF).

1.1. Cas des momies des sites archéologiques Playa Miller, Quiani et Camarones

La région d'Arica et Parinacota étant le berceau des civilisations andines, les sites d'occupation antiques y sont très nombreux, notamment sur la côte. Ce travail de thèse n'a pas pour objectif de s'intéresser à tous les sites archéologiques mis au jour, mais vise à montrer l'intérêt d'une étude moléculaire approfondie sur les momies d'un site d'occupation bien défini. L'étude sera élargie à deux autres sites importants de la région afin de vérifier dans quelle mesure les résultats obtenus peuvent s'appliquer de manière plus globale aux momies préhispaniques des Andes. Ainsi, dans ce chapitre, nous nous intéresserons principalement au site Playa Miller 7 et l'élargissement de l'étude portera sur les sites Quiani 7 et Camarones 15.

Peu d'informations historiques étaient disponibles sur les momies du corpus, et notamment, leur période d'origine. Au préalable de ce travail de thèse, les échantillons du corpus d'étude ont été datés par le carbone 14 au C2RMF par l'équipe du Dr Pascale Richardin. Les dates obtenues ont ainsi permis de replacer les momies d'intérêt dans leur contexte historique²² et sont détaillées sur la frise chronologique ci-dessous (Figure C.1). Les dates indiquées correspondent à une date moyenne déterminée à partir des données calibrées, *via* le logiciel dédié à la datation par le radiocarbone OxCal²⁵⁹ (University of Oxford) (cf. Annexe 1).

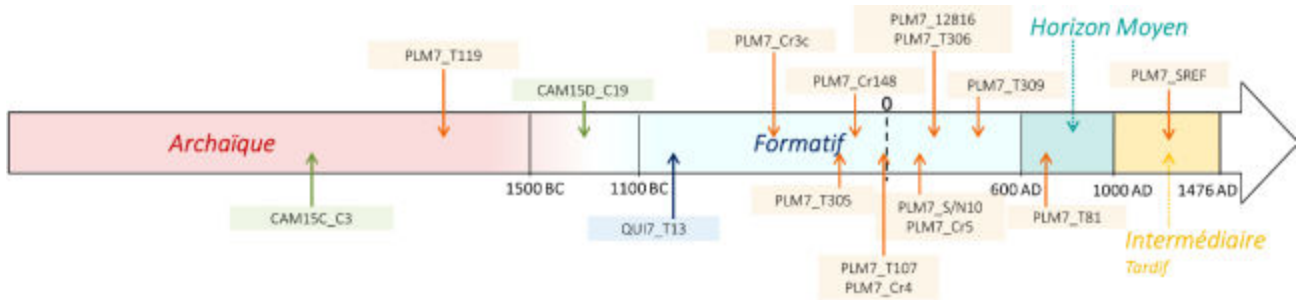


Figure C. 1 – Frise chronologique de la période préhispanique et localisation temporelle des cheveux de momies du corpus.

1.1.1. Momies du site Playa Miller 7

📖 Description du site

Ce site, situé sur les collines de sable longeant la côte Pacifique à la limite de la ville d'Arica (Figure A.1.), a été mis au jour par Focacci²¹⁰ dans les années 1960 et renfermait plusieurs sépultures circulaires recouvertes de nattes végétales. Compte tenu du type des sépultures et d'une datation par le carbone 14 d'une graine de coton, retrouvée dans une tombe, autour de 500 av. J.-C., ce site a été classé dans la période Formative²⁶⁰, mais il semblerait que certaines zones correspondent aussi à la période plus récente de l'Intermédiaire Tardif²². Les corps retrouvés sont des momies post-Chinchorro naturelles d'adultes et d'adolescents, en position fœtale, fléchie ou assise, enveloppés dans des tissus ou des nattes végétales (fardeaux funéraires), et entourés d'objets funéraires, tels que des outils ou des céramiques par exemple.

📖 Description des échantillons

13 des 16 têtes de momies étudiées au cours de ce travail de thèse proviennent de ce site archéologique : PLM7_12816, PLM7_S/N10, PLM7_SREF, PLM7_T306, PLM7_T309, PLM7_T107, PLM7_T305, PLM7_Cr148, PLM7_Cr4, PLM7_Cr5, PLM7_Cr3c, PLM7_T81 et PLM7_T119.

Les 13 échantillons de Playa Miller 7 et les têtes de momie associées sont décrits dans la section jaune PLM7 du Tableau C.1.

1.1.1. Momies du site Quiani 7

📖 Description du site

Le site archéologique est situé sur une plage à coquillages à quelques kilomètres au sud d'Arica (Figure A.1), initialement fouillé par Bird dans les années 1940, puis par Mostny et Dauelsberg²⁴¹. Ce

site côtier d'habitation de la phase Quiani renferme les traces de peuples antiques sur plusieurs périodes, de la fin de la période Archaïque à la période pré-Inca.

▣ Description des échantillons

Dans le cadre de ce travail de thèse, une seule tête de momie naturelle de ce site sera étudiée : QUI7_T13, décrite dans la section bleue QUI7 du Tableau C.1.

1.1.2. Momies du site Camarones 15

▣ Description du site

Le site Camarones 15, situé sur un plateau à l'embouchure de la rivière Camarones à une centaine de kilomètres d'Arica (Figure A.1.), représente l'un des secteurs d'un tertre de coquillage abritant un important cimetière antique des périodes Archaïque – sépultures Chinchorro avec présence de momies rouges – et Formative²⁶¹.







▣ Description des échantillons







Pour ce site, deux têtes de momies naturelles seront étudiées : CAM15C_C3 et CAM15D_C19. Les deux échantillons et les têtes de momie associées sont décrits dans la section verte CAM15 du Tableau C.1.







1.1.3. Cheveux modernes






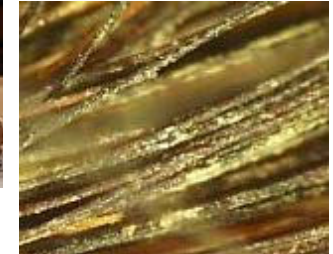
Un échantillon de cheveux modernes d'origine européenne, désigné par « EuropeM », et un échantillon moderne d'origine chilienne, désigné par « ChiliM », n'ayant pas été exposés à des traitements cosmétiques ou chimiques particuliers (permanente, décoloration ou coloration par exemple), ont été étudiés. Ces échantillons de cheveux modernes ont permis de mettre en place le protocole final de notre approche protéomique pour l'étude des cheveux de momies. De plus, ces échantillons ont servi de témoin pour l'interprétation des résultats d'analyses structurales, élémentaires et moléculaires des cheveux de momies du corpus d'étude.





Tableau C. 1 – Description des têtes de momies étudiées et des échantillons de cheveux prélevés. Les données relatives au sexe et à l'âge ont été déterminées par les anthropologues de l'UTA à partir des ossements de chaque momie. Le régime alimentaire ainsi que la calibration des dates ont été déterminés à l'aide des analyses isotopiques réalisées par le Département de Géosciences de l'Université de Tübingen²². Les informations techniques concernant la datation par le carbone 14 et la calibration des dates sont détaillées en Annexe 1.





Réf	Age	Sexe	Régime	Tête de momie	Prélèvement	Description	Datation (années BP)	Age calibré
Site Playa Miller 7 (PLM7)								
PLM7_12816	Nourisson	N.A.	Marin			Cheveux bruns, fins et cassants Présence d'une substance jaune et noire inconnue maintenant les cheveux collés Dépôts jaunes filandreux	2153 ± 22	cal. AD 52-336 (1.000)
				Tête avec turban de laine et rembourrage	Prélèvement côté dextre, au-dessus de l'oreille. Cheveux dépassant des cordelettes de textile.			
PLM7_S/N10	Enfant	N.A.	Terrestre			Cheveux fins et roux Dépôts brun-jaune et brun-noir sur les cheveux	2101 ± 22	cal. AD 20-214 (1.000)
				Crâne aux cheveux courts et roux	Prélèvement à la racine			
PLM7_T81	Adulte	N.A.	Mixte			Cheveux fins et bruns Présence de cristaux dans la mèche et de dépôts blanchâtres à la surface des cheveux	1658 ± 22	cal. AD 640-884 (1.000)
				Crâne aux cheveux longs et bruns	Prélèvement à la racine			

Réf	Age	Sexe	Régime	Tête de momie	Prélèvement	Description	Datation (années BP)	Age calibré
PLM7_Cr5	Adulte (37-43 ans)	F	Marin	 Tête avec turban de laines de différentes nuances de brun	 Cheveux découpés sous la tête	Cheveux bruns et jaunes, cassants Présence de cristaux et de dépôts brun clair à la surface des cheveux Présence de fragments de plumes dans la mèche prélevée	2235 ± 22	11-6 cal. BC (0.004) cal. AD 2-335 (0.0996)
PLM7_T306	Nourisson	N.A.	Marin	 Tête avec natte tissée	 Prélèvement à la racine (cheveux pour analyses isotopiques)	Cheveux légèrement roux. Présence de dépôts et substances non identifiées collées aux cheveux	2220 ± 30	cal. AD 16-360 (1.000)
PLM7_SREF	N.A.	N.A.	N.A.	 Tête recouverte d'une peau d'oiseau	 Prélèvement à l'arrière de la tête	Cheveux bruns et jaunes. Présence de dépôts sédimentaires jaune-brun à la surface des cheveux.	785 ± 30	AD 1220-1300 (0.954)

Réf	Age	Sexe	Régime	Tête de momie	Prélèvement	Description	Datation (années BP)	Age calibré
PLM7_T119	Nourisson	N.A.	Marin	 Fardeau funéraire avec cheveux, laines et végétaux	 Prélèvement sur le côté dextre. Mèche de cheveux sortant du fardeau.	Cheveux bruns et cassants. Présence de dépôts et sédiments.	3880 ± 30	2123-1777 cal. BC (1.000)
PLM7_T309	Adulte (22-28 ans)	F	Marin	 Cheveux brun et laine brun-clair et foncé	 Prélèvement à la base de la chevelure.	Cheveux bruns et cassants. Présence de dépôts et sédiments. Certaines parties de la mèche sont enrobées d'une substance brun-rouge non identifiée.	2040 ± 22	cal. AD 233-565 (1.000)
PLM7_Cr148	Adulte (40-46 ans)	M	Marin	 Tête avec coiffe en textile tissé	 Prélèvement à la racine	Cheveux cassants de différentes couleurs : brun, brun clair, jaune. Présence de dépôts et substances inconnues.	2414 ± 22	341-281 cal. BC (0.060) 259 cal. BC - cal. AD 29 (0.940)

Réf	Age	Sexe	Régime	Tête de momie	Prélèvement	Description	Datation (années BP)	Age calibré
PLM7_Cr3c	Adulte	N.A.	Marin	 Tête avec turban de laines entremêlées multicolores	 Cheveux détachés du crâne, côté gauche.	Cheveux brun clair et cassants. Présence de dépôts à la surface des cheveux.	2648 ± 22	726-685 cal. BC (0.028) 666-343 cal. BC (0.960) 281-258 cal. BC (0.013)
PLM7_T305	Adulte	M	Marin	 Tête avec turban de laine brune recouvert de végétaux tressés	 Prélèvement à la racine	Cheveux bruns et cassants. Présence de divers dépôts et résidus. Coloration rouge non homogène à la surface des cheveux.	2455 ± 22	355-53 cal. BC (1.000)
PLM7_Cr4	Enfant (8-12 ans)	N.A.	Marin	 Tête avec turban de laines entremêlées de différentes nuances de brun.	 Prélèvement à l'arrière de la tête	Cheveux bruns et jaunes, mats. Présence de dépôts accrochés aux cheveux	2335 ± 22	167 cal. BC - cal. AD 120 (1.000)

Réf	Age	Sexe	Régime	Tête de momie	Prélèvement	Description	Datation (années BP)	Age calibré
PLM7_T107	Adulte (37-43 ans)	F	Marin			Cheveux bruns. Présence de dépôts clairs à la surface.	2278 ± 22	132 cal. BC - cal. AD 142 (1.000)
				Fardeau funéraire, mélange de cheveux tressés et laine brun clair	Cheveux détachés de la chevelure, sur le dessus.			
Site Quiani 7 (QUI7)								
QUI7_T13	Adulte (27-33 ans)	F	Marin			Cheveux légèrement roux, cassants. Présence de sédiments et les cheveux semblent être recouverts de façon homogène d'une substance non identifiée.	3098 ± 22	1086-806 cal. BC (1.000)
				Tête 'rouge' aux cheveux roux	Prélèvement à l'arrière de la tête.			

Réf	Age	Sexe	Régime	Tête de momie	Prélèvement	Description	Datation (années BP)	Age calibré
Site Camarones 15 (CAM15)								
CAM15D_C19	Adulte	N.A.	Marin			Cheveux bruns et jaunes cassants. Présence de résidus de plumes.	3423 ± 22	1496-1185 cal. BC (1.000)
				Tête avec masque de plumes et de tresses végétales	Prélèvement à l'arrière de la tête.			
CAM15C_C3	Adulte (34-40 ans)	F	Marin			Cheveux brun-roux 'englués' Petits fragments	4391 ± 22	2831-2811 cal. BC (0.012) 2755-2308 cal. BC (0.988)
				Tête avec turban végétal	Prélèvement sur le côté gauche de la tête, sous l'oreille.			

1.2. Etude visuelle et structurale

Des analyses préliminaires aux analyses élémentaires et protéomiques ont été effectuées au C2RMF au cours de mon projet de fin d'études et poursuivies dans le cadre de ces travaux, afin d'étudier l'état de conservation globale et structurale des fibres capillaires archéologiques. Ces analyses ont été menées par SEM et FTIR.

Ces analyses préliminaires ont constitué une première partie des résultats d'analyses physico-chimiques détaillés dans un article publié dans *Forensic Science International* (Elsevier – Fresnais *et al.* Recent Advances in the Characterization of Hair of Mummies from the Chilean Andean Coast. *Forensic Sci. Int.* **2015**, 249, 25–34)²⁰.

1.2.1. Observations au microscope électronique à balayage

Les images SEM des cheveux bruts archéologiques (paramètres expérimentaux détaillés dans le Chapitre B, partie 3.3.1.) montrent une quantité importante de résidus, dépôts sédimentaires et cristaux à la surface des cheveux (Figure C.2.B à E), comme observé à la loupe binoculaire (Tableau C.1), dépôts non présents sur les deux échantillons de cheveux modernes bruts (Figure C.2.A).

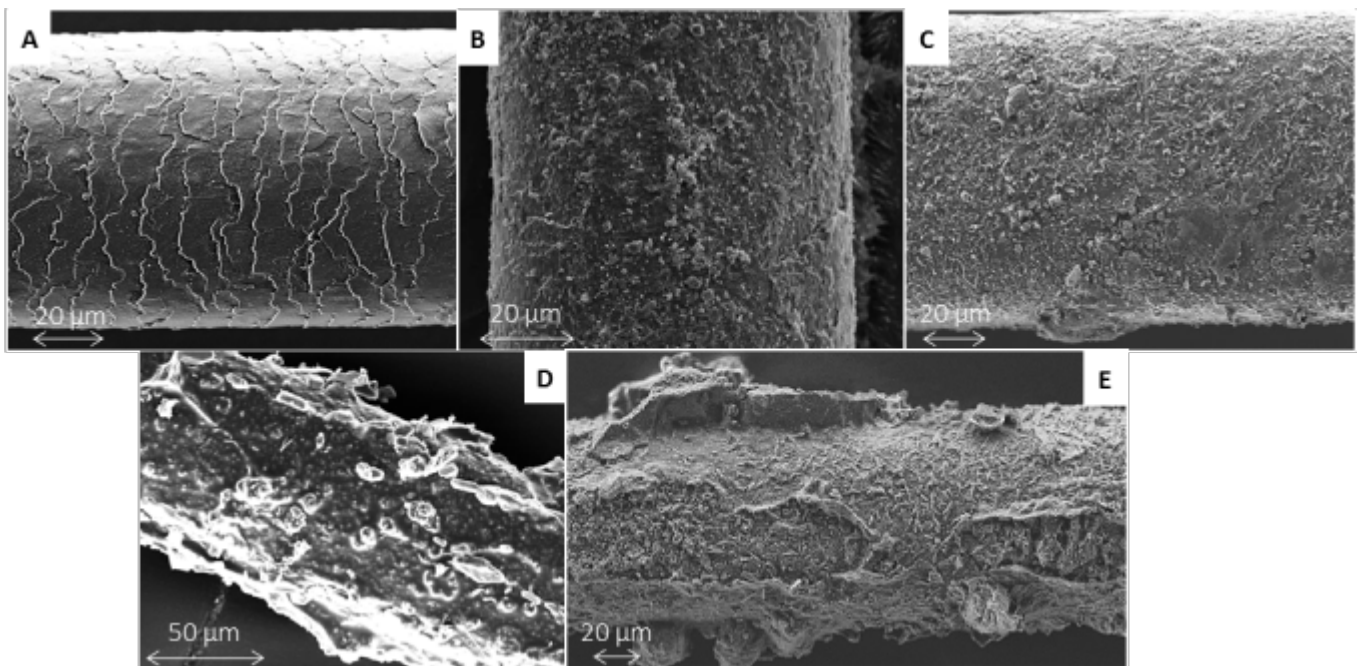


Figure C. 2 – Images SEM en mode SE d'un échantillon de cheveux modernes (A) et de quatre échantillons de cheveux de momies (B : PLM7_T119, C : PLM7_T305, D : QUI7_T13 et E : CAM15C_C3). FEG-SEM 7800F (A,C,E): tension d'accélération = 5 keV, distance de travail = 3-4 mm ; SEM XL30 CP (B,D): tension d'accélération = 8 keV, distance de travail = 10 mm.

La surface des cheveux archéologiques est en grande partie masquée par ces dépôts de surface qui empêchent une visualisation claire des écailles. Pour certains échantillons, la surface paraît cependant très irrégulière, ce qui pourrait mettre en évidence une dégradation de la surface du cheveu (Figure C.2.D et E). Afin de pouvoir mieux visualiser la surface des différents échantillons de cheveux, ceux-ci ont été lavés selon le protocole décrit dans le chapitre B, partie 4.1.1.

Après nettoyage, la surface des cheveux archéologiques a pu être observée (Figure C.3.B à D). A l'image des échantillons présentés ici, la plupart des cheveux archéologiques présentent des écailles assez bien conservées et similaires à celles observées pour les cheveux modernes (Figure C.3.A), bien que parfois décollées ou irrégulières par endroits (Figure C.3.C). Cependant, quelques échantillons ne possèdent plus aucune écaille sur certaines zones ou sur la totalité de leur surface (Figure C.3.B et D). Les images montrent également que le nettoyage effectué est efficace : pour la majorité des cheveux, les résidus et dépôts observés sur la fibre brute ont presque totalement disparu.

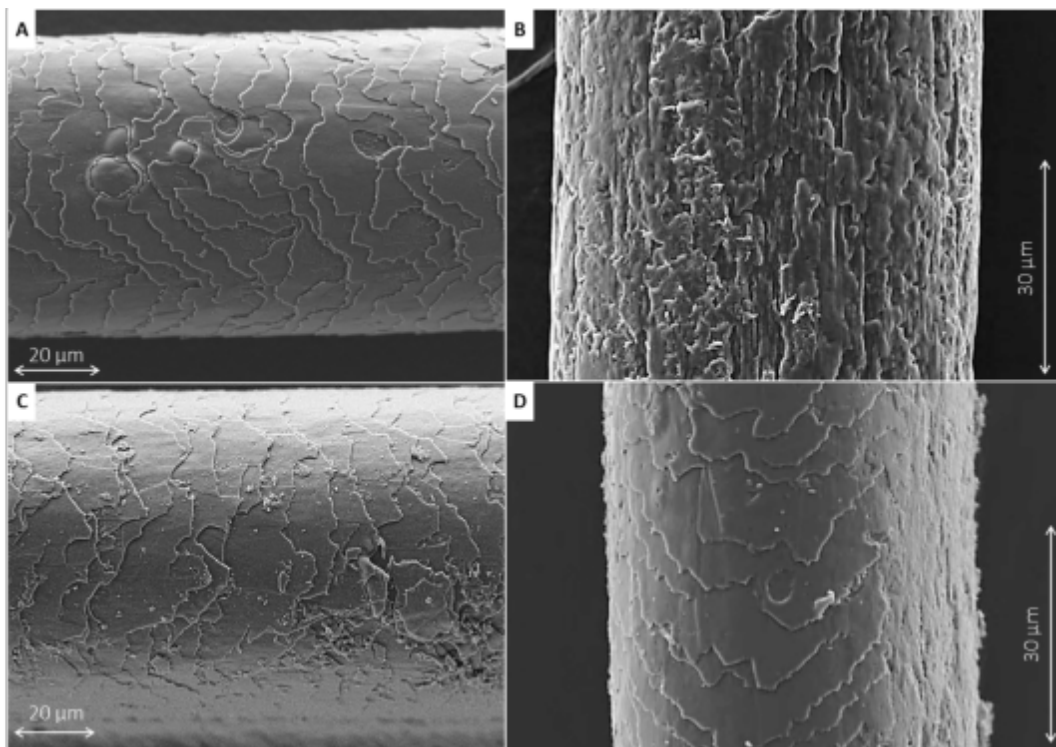


Figure C. 3 – Images SEM en mode SE d'un échantillon de cheveux modernes après lavage (A) et de trois échantillons de cheveux de momies après lavage (B : PLM7_T305, C : PLM7_T119 et D : QUI7_T13). FEG-SEM 7800F (A,C) : tension d'accélération = 5 keV, distance de travail = 3-4 mm ; SEM XL30 CP (B,D) : tension d'accélération = 8 keV, distance de travail = 10 mm.

1.2.2. Analyses structurales par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

L'utilisation de la spectroscopie FTIR (cf. Chapitre B – Partie 4.2.) a eu pour objectif d'étudier l'état de conservation structural des échantillons archéologiques. Il existe en effet des corrélations entre les variations d'intensité de certaines vibrations et le vieillissement (oxydation, exposition au rayonnement UV, etc.) d'un cheveu. La bande caractéristique de l'amide I^a vers 1630 cm⁻¹ et celle de la cystine vers 1040 cm⁻¹, par exemple, peuvent aider à définir le niveau d'oxydation du cheveu²⁶². Dans ce paragraphe, les observations s'appuieront sur un échantillon dont les résultats obtenus en FTIR sont représentatifs de l'ensemble du corpus, les cheveux de la momie PLM7_Cr148.

▣ Observations des spectres FTIR des cheveux de momie

Les spectres FTIR des cheveux de momie (Figure C.5) sont tous relativement similaires et présentent les bandes d'absorption caractéristiques des molécules de kératine – protéines majoritaires du cheveu (cf. Chapitre A, partie 3.2.2)^{262–266,198,200} :

- i) élongation $\nu(\text{C-H})$ des amides A et B à environ 3300 et 3070 cm⁻¹,
- ii) élongations $\nu(\text{C=O})$ et $\nu(\text{C-N})$, et déformations $\delta(\text{N-H})$ et $\delta(\text{O=C=N})$ des amides I, II et III vers 1630, 1520 et 1230 cm⁻¹,
- iii) bandes d'absorption dues à la présence de cystines à 1121, 1071 et 1040 cm⁻¹, selon le degré d'oxydation (Figure C.4).

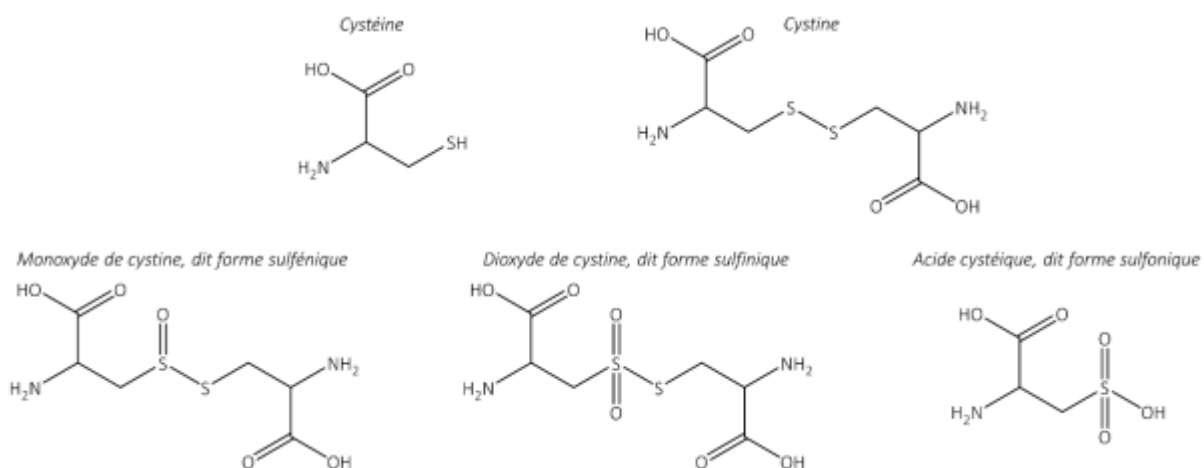


Figure C. 4 – Formules semi-développées de la cystéine et de la cystine sous ses différentes formes non-oxydée, monoxydée, dioxydée ou trioxydée.

Ces bandes d'absorption des amides I et II sont relativement similaires pour la grande majorité des spectres et aucune modification significative n'est observée après le nettoyage des cheveux

^a Les amides A, B, I, II et III correspondent à différents mouvements de vibration des amides présentes dans les protéines.

(Figure C.5). La présence des cystines des molécules de kératine est mise en évidence sur les spectres des échantillons archéologiques dans la région entre 1200 et 1000 cm^{-1} . La vibration à 1040 cm^{-1} est attribuée la contribution des acides cystéiques (forme sulfonique, annotée S=O sur les spectres FTIR), correspondant à la rupture des ponts disulfure par tri-oxydation (Figure C.4), et des vibrations supplémentaires à 1075 cm^{-1} et 1121 cm^{-1} peuvent également être observées. Celles-ci indiquent la présence de dérivés moins oxydés de la cystine, respectivement le monoxyde de cystine, ou forme sulfénique, (indiquée par SO sur les spectres FTIR) et le dioxyde de cystine, ou forme sulfinique, (indiquée par SO_2 sur les spectres FTIR)¹⁹⁸.

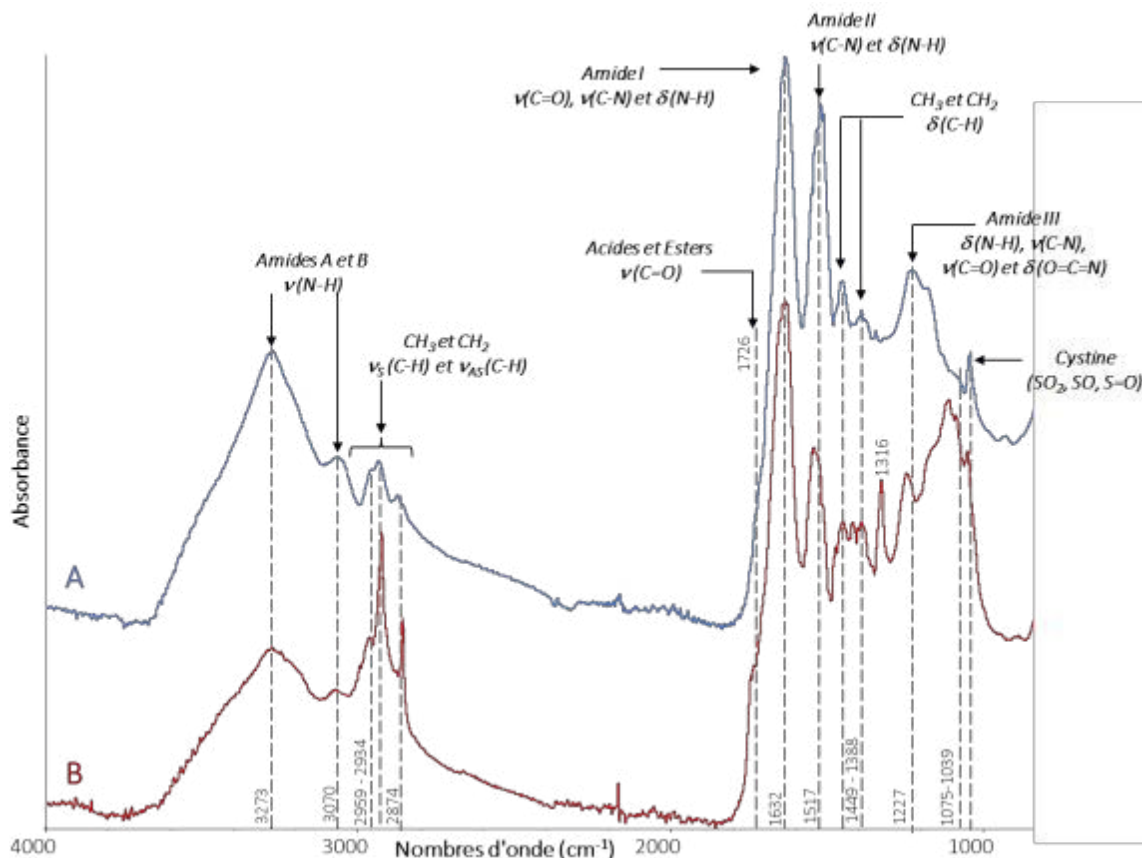


Figure C.5 – Spectres FTIR en mode ATR de l'échantillon PLM7_Cr148 brut (B) et nettoyé (A), représentatif des spectres obtenus pour l'ensemble des cheveux du corpus. Spectromètre de type Golden Gate™ équipé d'un cristal de diamant (mono-réflexion, indice de réfraction de 2,4 à 1000 cm^{-1}). Analyse de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} , 150 scans, résolution de 4 cm^{-1} .

Nous pouvons cependant observer des modifications dues à la disparition des lipides de surface au cours du lavage et mettant en évidence la proportion plus importante des groupes CH_2 par rapport aux groupes CH_3 dans les lipides que dans les protéines²⁶⁵. En effet, une différence de profil entre les cheveux bruts et nettoyés est visible dans la région 3000-2800 cm^{-1} , et notamment la modification après le traitement des proportions des bandes d'absorption correspondant à l'élongation des groupes CH_2 et CH_3 . De plus, la région entre 1750 et 1200 cm^{-1} comporte également quelques changements des bandes correspondant à la déformation C-H des groupes CH_2 et CH_3 après le

nettoyage des cheveux. Pour certains échantillons, une bande d'absorption à environ 1320 cm^{-1} , pouvant être attribuée à l'élongation des liaisons C-O des lipides, est observée sur les spectres des cheveux avant lavage, et disparaît après celui-ci (Figure C.5).

▣ Etat de la conservation des protéines des cheveux nettoyés

Les spectres des cheveux de momies traités sont très similaires aux spectres des cheveux modernes bruts et nettoyés (Figure C.6). Cette observation nous permet de penser que la structure de la kératine au niveau de la cuticule des cheveux de momies est globalement bien conservée.

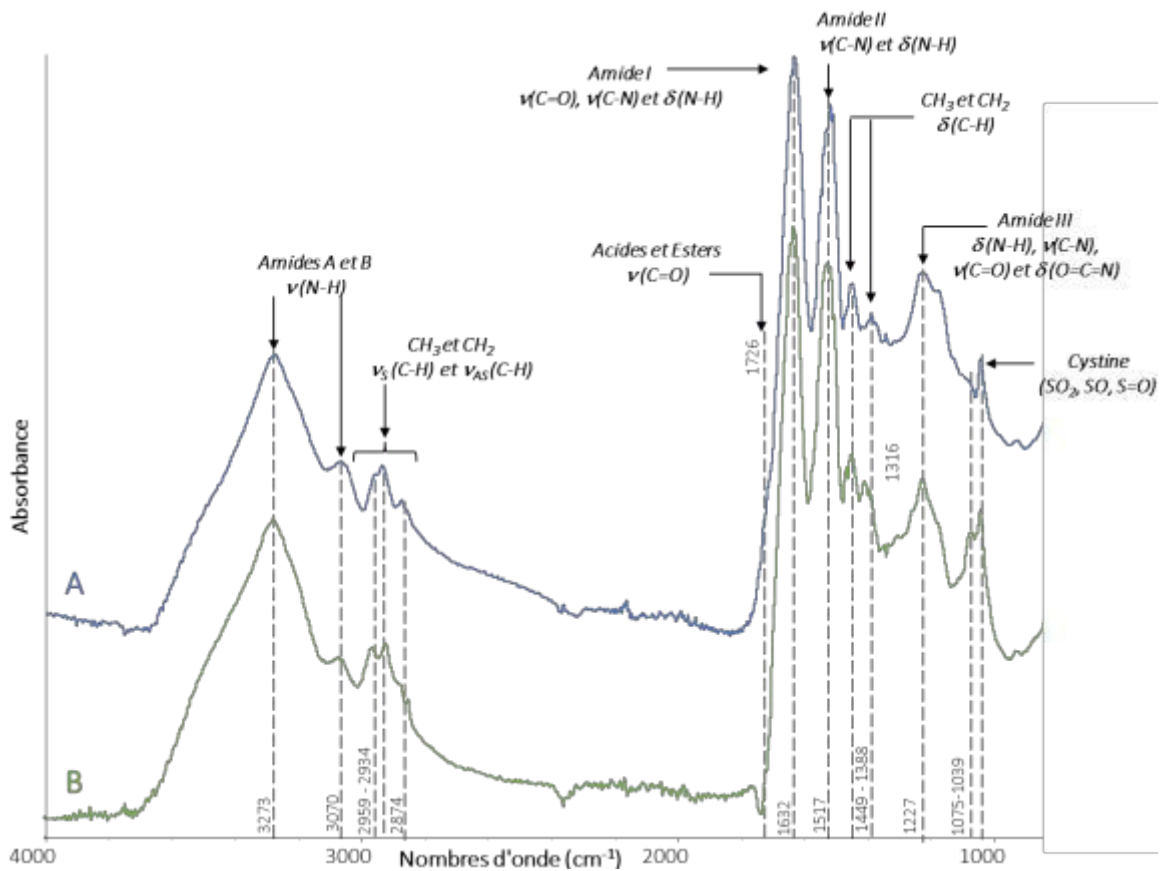


Figure C.6 – Spectres FTIR en mode ATR d'un échantillon de cheveux modernes (B) et de l'échantillon PLM7_Cr148 (A - représentatif des spectres obtenus pour l'ensemble des cheveux du corps) nettoyés. Spectromètre de type Golden Gate™ équipé d'un cristal de diamant (mono-réflexion, indice de réfraction de 2,4 à 1000 cm^{-1}). Analyse de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} , 150 scans, résolution de 4 cm^{-1} .

De plus, Zhang & al.¹⁹⁸ propose, pour les deux bandes à 1630 et 1520 cm^{-1} , de calculer le ratio de leurs intensités (amide I / amide II) et de le corrélérer à la conservation de la cuticule. En effet, d'après une étude sur des laines de Merino, le ratio pour une fibre kératinisée qui présente une bonne conservation de la kératine est de 1,3, alors que pour une fibre moins bien préservée (cortex non protégé par la cuticule), le ratio vaut 12,5. Les échantillons archéologiques nettoyés présentent des ratios d'intensité entre 1,03 et 1,24, ce qui semble indiquer une bonne conservation de la cuticule, à

l'image de l'échantillon moderne dont le ratio est de 1,08. Egalement, le nombre d'onde de la bande d'absorption correspondant à l'amide I est plus élevé dans le cas du cortex (environ 1650 cm^{-1}) que dans celui de la cuticule (environ 1630 cm^{-1}). Sur les différents spectres de cheveux nettoyés, le nombre d'onde de la bande de l'amide I pour nos six échantillons est compris entre 1629 et 1636 cm^{-1} , ce qui est cohérent avec une bonne conservation de la cuticule.

1.3. Conclusion

Les études préliminaires menées sur les cheveux du corpus mis à disposition pour ce travail de thèse ont, dans un premier temps, permis de replacer les momies étudiées dans leur contexte historique, grâce à la datation par le radiocarbone. Les résultats ont montré une distribution assez large des momies étudiées sur la période d'intérêt, depuis la fin de la période Archaïque jusqu'à la période pré-Inca (Intermédiaire tardif – Figure C.1). Le corpus d'étude constitue donc un panel bien représentatif de la période d'intérêt pour débiter ce travail de recherche.

Les observations morphologiques réalisées au SEM ont mis en évidence la présence d'importants dépôts inorganiques ou organiques, de composition encore non élucidée, à la surface des cheveux bruts, qui sont facilement éliminés par le protocole de nettoyage des échantillons. Celui-ci a permis de visualiser une conservation hétérogène de la surface capillaire selon l'échantillon considéré : un certain nombre d'échantillons présente une cuticule et des écailles globalement bien conservées, et une autre partie des signes de dégradation des écailles, voire une disparition totale de celles-ci.

Les profils obtenus par FTIR des cheveux archéologiques et la comparaison avec les spectres obtenus pour les cheveux modernes ont mis en évidence une bonne conservation structurelle de la surface des cheveux anciens. L'observation plus particulière de certaines bandes d'absorption nous permet de renforcer cette constatation : les valeurs des aires des bandes de l'amide II à 1520 cm^{-1} pour les différents échantillons sont cohérentes avec un bon état de conservation de la surface, et les ratios des intensités des bandes des amides I et II sont similaires à ceux attendus pour une fibre kératinisée possédant une cuticule bien préservée. L'observation de la région entre 1200 et 1000 cm^{-1} a cependant montré l'oxydation partielle des échantillons grâce à la présence de pics à 1040 , 1075 et 1121 cm^{-1} .

Ces analyses préliminaires ont donc mis en évidence une bonne conservation globale de la surface des fibres capillaires anciennes, dans la majeure partie des cas. Dans le cadre de notre approche protéomique, nous nous attacherons à aller plus en profondeur dans le cheveu en nous intéressant à l'état de conservation moléculaire des protéines capillaires.

2. Développement méthodologique pour l'analyse par spectrométrie de masse d'échantillons archéologiques

2.1. Avant-propos

Les analyses préliminaires développées dans la partie précédente avaient permis de mettre en avant la bonne conservation globale et structurelle de la surface des cheveux archéologiques. Les travaux de recherche détaillés dans cette deuxième partie ont eu pour objectif de développer une approche novatrice pour l'étude moléculaire des cheveux de momies du corpus, grâce à la mise en place au laboratoire d'une approche protéomique « *bottom-up* », basée sur l'extraction et la digestion des protéines capillaires, puis leur analyse par nanoLC-ESI-MS/MS. Il s'agit dans cette partie de s'assurer de la possibilité d'accéder à l'identification des protéines capillaires des cheveux de momies d'une part, et dans l'affirmative, de caractériser ces protéines, grâce à l'étude des modifications moléculaires, dont certaines peuvent être spécifiques du vieillissement en contexte archéologique.

Dans ce but, trois protocoles décrits dans la littérature ont été appliqués à l'échantillon de cheveux modernes européens, choisi comme témoin pour la mise en place du protocole final. Le premier protocole a été sélectionné du fait de son développement initial pour l'extraction des protéines capillaires dans le cadre de la préparation des échantillons de cheveux pour la datation par le carbone 14 ^{19,250}. Le second protocole avait été mis au point pour l'analyse protéomique de cheveux modernes^{194,177} et le dernier protocole avait pour but l'étude des protéines de fibres kératinisées extraites de textiles archéologiques²⁶⁷. Il faut noter que les extractions mises en œuvre avec ces trois approches ne se limitent pas au seul cortex du cheveu et que des protéines de la cuticule peuvent également être extraites. Les résultats d'identification obtenus par ces stratégies constitueront donc une vision globale de la composition protéique des échantillons.

Les cheveux bruts ont été nettoyés avec différents bains de solvants, avant d'extraire les protéines capillaires qui ont alors été analysées par MALDI-TOF-MS, afin de visualiser l'empreinte protéique de chaque échantillon. Les protéines extraites ont ensuite été digérées par la trypsine, puis dessalées sur cartouche SPE (phase C18), et les digests sont finalement analysés par MALDI-TOF-MS sur l'appareil Autoflex II TOF/TOF et par nanoLC-ESI-MS/MS sur le système Ultimate 3000 couplé au microTOF-Q II (Chapitre B, Parties 2. et 3.1).

Cette application et optimisation des trois protocoles sur l'échantillon de cheveux modernes a permis de sélectionner le troisième protocole pour aller plus loin dans la mise au point. En effet, contrairement aux deux autres démarches, celle-ci comporte peu d'étapes et permet une préparation rapide et simple de l'échantillon, tout en minimisant les risques de pertes, grâce à la conservation des

protéines en solution depuis l'étape d'extraction, jusqu'au dessalage final du digest peptidique. Il est ainsi possible de travailler sur des quantités d'échantillons 10 fois moins importantes que pour les deux autres protocoles – 1 mg au lieu de 10 mg – tout en obtenant des résultats d'identification des protéines de cheveux modernes équivalents, voire meilleurs – nombre de kératines identifiées équivalent, hauts scores d'identification *Mascot* et recouvrements de séquence supérieurs à 50 %.

Le troisième protocole a donc été choisi afin d'être appliqué à un échantillon de cheveux archéologiques : les cheveux du fardeau funéraire PLM7_T119, daté entre 2123 et 1777 av. J.-C. (Partie 1.1.1. – Tableau C.1). Il a également été possible d'aller plus loin dans l'optimisation en réduisant la quantité de cheveux engagée de 1 mg à 500 µg, tout en conservant une bonne qualité de données MS/MS et de résultats d'identification.

Ce protocole optimisé a permis d'identifier avec succès une partie des protéines capillaires de cheveux anciens – 8 kératines, parmi les 18 kératines capillaires humaines décrites, ainsi que quelques autres protéines présentes dans les cheveux. Il a également été possible de mettre en évidence les marqueurs d'une dégradation moléculaire des cheveux de momies et des hypothèses sur des voies de dégradation de la fibre capillaire, et ce dès la phase d'extraction des protéines. Pour cela, l'étude s'est focalisée sur les kératines identifiées à la fois dans les cheveux archéologiques et modernes, pour lesquelles une nette différence de conservation moléculaire a pu être mise en évidence selon l'âge de l'échantillon. Notamment, plusieurs marqueurs permettent d'émettre des hypothèses sur des processus de dégradation moléculaire :

- i) une proportion de peptides modifiés largement supérieure dans les cheveux anciens,
- ii) une plus importante contribution de PTMs induites par le vieillissement, telles que la déamidation des asparagines et glutamines, ou les mono-, di-, et tri-oxydation des cystéines,
- iii) la perte d'information sur les protéines capillaires minoritaires pour les cheveux de momies.

Les résultats présentés dans cette deuxième partie du Chapitre C ont fait l'objet d'une publication, actuellement en cours de relecture (soumission le 04.05.2016), dans le journal *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Springer).

2.2. Publication: Characterization of ancient human hair by a proteomic approach

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2016) under review.

Abstract

Hair is an important biological indicator that has become a material of choice in archaeometry to study the ancient civilizations and their environment. Current characterization of ancient hair is based on elemental (Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, X-Ray Fluorescence spectroscopy and Particle Induced X-ray Emission imaging) and structural (Fourier Transformed InfraRed spectroscopy and X-Ray Diffraction) analyses but only few research focus on the molecular study of ancient hair proteins and their conservation state and in such cases, applied extraction protocols require important amounts of raw hair, between 30 and 100 mg. In this work, we optimized a new proteomic approach in order to accurately identify archaeological hair proteins and to assess their preservation state while using a minimum of raw material. Testing and adaptation of three protocols was done on modern hair. Modern proteins were extracted, analyzed by MALDI-TOF-MS before and after their digestion, and finally identified using nanoLC-MS/MS and the Mascot research algorithm. The two most promising workflows were applied to an archaeological sample before selecting the final proteomic approach on the basis of MS and MS/MS data quality, and of required initial sample amount. Finally, we were able to identify 13 main ancient hair proteins and to visualize the preservation state of mummy's hair from only 500 µg of raw material.

Article soumis à droits d'auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

Article soumis à droits d'auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

Article soumis à droits d'auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

Article soumis à droits d'auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

Article soumis à droits d'auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

Article soumis à droits d'auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

Article soumis à droits d'auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

Article soumis à droits d'auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

Article soumis à droits d'auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

Article soumis à droits d'auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

Article soumis à droits d'auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

Article soumis à droits d'auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

Article soumis à droits d'auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

2.3. Choix de la technique d'analyse

Afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles, une seconde méthode d'analyse par nanoLC-ESI-TripleTOF-MS/MS (cf. Chapitre B – Partie 3.2.) a été appliquée à l'échantillon de cheveux de la momie PLM7_T119. Le digest peptidique analysé a été préparé à partir de 500 µg de fibres, à l'aide du protocole final mis en place précédemment (Protocole 3 – Partie 2.2.3 "*Analysis of hair from an Andean mummy – Minimization of raw hair amount*"), et analysé avec les deux appareillages microTOF-Q et tripleTOF.

Tableau C.2 - Comparaison des résultats obtenus par nanoLC-ESI-QTOF-MS/MS et nanoLC-ESI-TripleTOF-MS/MS pour l'identification des protéines d'un échantillon de 500 µg de cheveux de la momie PLM7_T119 préparé à l'aide du Protocole 3.

	Peptides détectés	Protéines acceptées	Kératines capillaires	Recouvrements de séquence	Scores
microTOF-Q	790	7	6	Entre 50 et 80 %	< 5 000
TripleTOF	5 300	27	13	> 80 %	> 20 000

L'utilisation du TripleTOF a permis l'identification de près de 7 fois plus de peptides que pour une analyse sur le microTOF-Q, ce qui a abouti à la validation de 27 protéines avec des scores d'identification 5 fois plus élevés et de meilleurs taux de recouvrement de séquence (Tableau C.2).

Compte tenu de ces résultats, l'approche protéomique mise en place dans cette partie utilisera la nanoLC-ESI-TripleTOF-MS/MS et sera appliquée à l'ensemble du corpus.

2.4. Conclusion

Les travaux réalisés dans cette partie de mon projet de recherche se sont donc en premier lieu focalisés sur trois protocoles d'extraction et de digestion de kératines modernes ou archéologiques, qui ont été testés sur des cheveux modernes, afin d'optimiser les différentes étapes de traitement des échantillons.

En se basant sur la qualité des résultats MS/MS, le protocole 3 adapté de Solazzo *et al.*²⁶⁷ a été sélectionné pour la mise au point sur un échantillon archéologique : les cheveux du fardeau funéraire PLM7_T119. Ce choix a pris en compte le nombre de protéines identifiées avec chaque protocole, la

qualité de ces identifications par l'algorithme *Mascot* (scores et recouvrements de séquence), la facilité de réalisation du protocole, ainsi que la possibilité de minimiser au maximum les quantités d'échantillon mises en jeu. Finalement, nous avons mis au point un protocole de protéomique simple, robuste, reproductible, donnant des résultats MS/MS fiables et pouvant être appliqué à 500 µg de cheveux seulement.

Les résultats prometteurs obtenus sur le premier échantillon de cheveux archéologiques ont permis d'identifier une partie des protéines capillaires des cheveux anciens, ainsi que les premiers marqueurs d'une dégradation moléculaire des cheveux de momies. Contrairement aux cheveux modernes, qui ne sont que peu affectés par l'extraction, les cheveux anciens sont en effet presque entièrement « solubilisés », ce qui semble souligner une fragilisation des interactions entre les protéines capillaires. Malgré cela, pour l'échantillon de cheveux de PLM7_T119, il a été possible d'identifier par nanoLC-ESI-MS/MS 8 kératines, parmi les 18 kératines capillaires humaines décrites dans la littérature, ainsi que quelques autres protéines présentes dans les cheveux, comme par exemple des KAPs. La suite de l'étude s'est focalisée sur 7 kératines, identifiées pour tous les cheveux archéologiques et modernes analysés, pour lesquelles les fréquences d'apparition de différentes PTMs ont été étudiées. La nette différence de conservation moléculaire des cheveux anciens par rapport aux cheveux modernes a ainsi pu être mise en évidence, avec une proportion de peptides modifiés largement supérieure dans les cheveux anciens – globalement plus de 60 % de peptides modifiés contre moins de 50 % de peptides modernes modifiés. Enfin, les cheveux de momies présentent une plus importante contribution de PTMs induites par le vieillissement, telles que la déamidation des asparagines et glutamines, ou les mono-, di-, et tri-oxydation des cystéines. La perte d'information sur les protéines capillaires minoritaires pour les cheveux de momies – KAPs et histones notamment – permet également d'émettre une hypothèse sur des processus de dégradation moléculaire en fonction du type de protéines.

De plus, après la réalisation d'analyses comparative sur un même échantillon de 500 µg de cheveux archéologiques préparés avec le protocole final, la nanoLC-ESI-QTOF-MS/MS a été choisie comme technique analytique pour la suite de ces travaux. Cette méthode a en effet permis d'identifier 3 fois plus de protéines que par nanoLC-ESI-QTOF-MS/MS, et plus particulièrement, 13 kératines capillaires ont pu être identifiées (contre 6 avec le microTOF-Q), avec de hauts scores d'identification et des recouvrements de séquence supérieurs à 80 %.

Cette approche protéomique apporte un regard neuf et plus approfondi sur l'étude de cheveux de momies, aidant non seulement à identifier les protéines des cheveux de momies avec de bons scores d'identification et des taux de recouvrement supérieurs à 50 %, mais aussi à caractériser les kératines majoritaires grâce à l'étude des PTMs. Cette étude a ainsi permis pour la première fois de mettre en

évidence des indicateurs moléculaires de dégradation des cheveux archéologiques et offre de nouvelles perspectives dans la recherche de biomarqueurs de dégradation des protéines, spécifiques au contexte archéologique.

3. Conservation moléculaire des cheveux de momies

Le protocole final, mis en place et optimisé dans la partie précédente, a ensuite été appliqué à l'ensemble du corpus d'étude. 500 µg de chacun des 16 échantillons de cheveux de momie ont ainsi été préparés, afin d'obtenir les digests peptidiques des protéines capillaires (Figure C.7, Protocole P3), qui ont été séparés et analysés par nanoLC-ESI-TripleTOF-MS/MS (cf. Chapitre B – Partie 3.2).

3.1. Identification des protéines capillaires de cheveux de momies

Les analyses des digests peptidiques sur le TripleTOF ont montré que, malgré l'âge des momies, les protéines de leurs cheveux sont bien identifiées par notre approche. Les analyses des blancs de contrôle ont montré qu'aucune kératine capillaire n'était détectée, mettant ainsi en évidence l'absence de contaminations modernes significatives. La mise en œuvre du protocole optimisé a permis la validation de 20 à 40 protéines de cheveux de momies, contre respectivement 37 et 35 protéines dans les cheveux modernes européens et chiliens (Figure C.12).

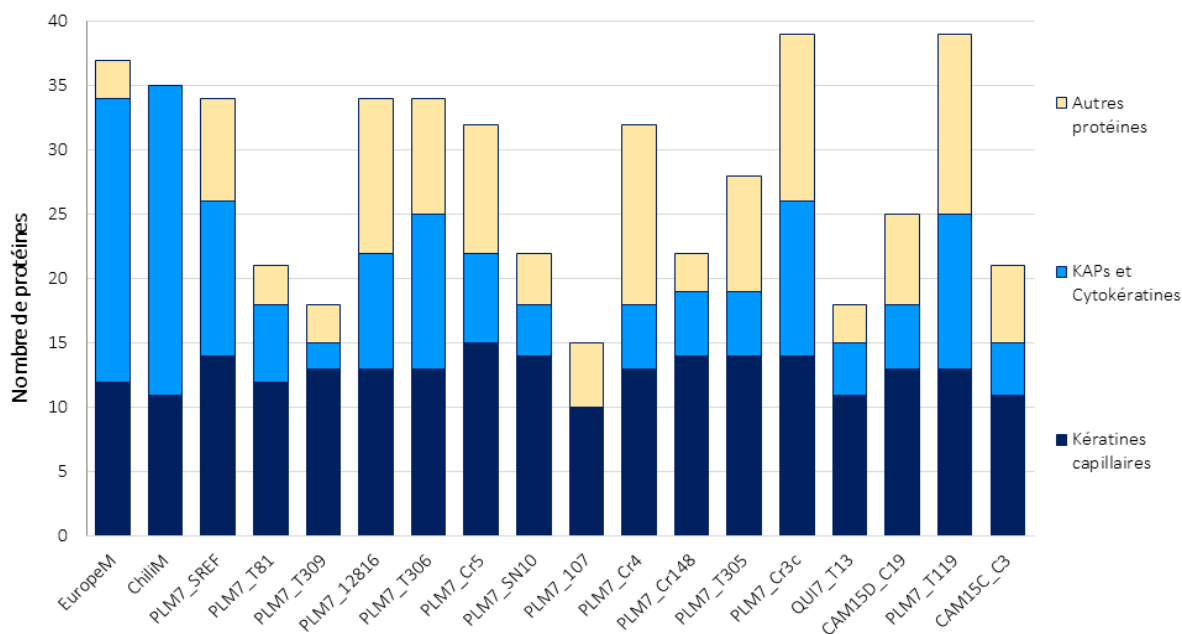


Figure C. 7 – Nombres de protéines identifiées pour les contrôles modernes européens (EuropeM) et chiliens (ChiliM), et pour les 16 échantillons archéologiques. Répartition des protéines identifiées par types de protéine.

Plus particulièrement, 10 à 15 kératines, parmi les 18 décrites pour les cheveux humains (cf. Chapitre A – Partie 3.3.1), ont été identifiées dans les cheveux de momies, contre 12 et 11

kératines pour les contrôles modernes (Tableau C.3), dont 9 sont communes à tous les échantillons archéologiques et modernes : K31, K32, K33a, K33b, K34, K35, K83, K85 et K86. Ces 9 kératines sont identifiées avec de hauts scores *Mascot* (supérieurs à 10 000) et des recouvrements de séquences supérieurs à 50 % pour tous les échantillons archéologiques. Ces performances d'identification, similaires, voire supérieures dans certains cas, à celles atteintes pour les cheveux modernes montrent bien la possibilité d'identifier les protéines de cheveux datant d'il y a plusieurs millénaires et conservés dans des conditions favorables.

Tableau C. 3 – Résultats d'identification et recouvrements de séquences des 18 kératines capillaires pour les digests de contrôles modernes européens (EuropeM) et chiliens (ChiliM), et pour les 16 échantillons de cheveux de momies. A) Kératines de type-I. B) Kératines de type-II.

A	K31	K32	K33a	K33b	K34	K35	K36	K37	K38	K39	K40
EuropeM	95.7%	52.2%	98.0%	97.5%	74.3%	70.3%	42.8%			25.7%	
ChiliM	52.4%	29.7%	59.4%	56.4%	37.6%	31.0%	15.6%				
PLM7_SREF	78.8%	50.2%	86.1%	88.1%	67.0%	55.4%	47.6%	29.6%	30.5%	4.7%	
PLM7_T81	86.8%	63.3%	86.1%	86.4%	72.7%	71.0%		26.3%		13.6%	
PLM7_T309	72.4%	47.1%	73.0%	81.7%	64.2%	48.4%	44.8%			13.0%	
PLM7_12816	70.0%	55.4%	83.4%	76.7%	56.9%	61.1%	41.8%		34.0%	12.2%	
PLM7_T306	68.8%	64.3%	84.2%	92.8%	70.0%	60.2%			45.0%	16.7%	
PLM7_Cr5	80.0%	50.9%	88.4%	88.4%	77.3%	59.8%	41.3%	31.8%	30.0%	54.0%	
PLM7_SN10	89.4%	71.9%	88.4%	88.4%	71.6%	69.0%	45.6%	21.8%	48.7%	13.0%	
PLM7_T107	68.8%	55.0%	80.7%	74.0%	66.7%	55.6%					
PLM7_Cr4	75.2%	63.8%	83.9%	80.2%	66.7%	70.8%	38.5%	43.7%		44.6%	
PLM7_Cr148	77.9%	52.7%	83.4%	81.7%	67.9%	65.7%		37.9%	43.9%	11.5%	
PLM7_T305	85.3%	62.7%	98.0%	90.6%	84.6%	65.7%	42.4%	37.2%	47.1%	50.9%	
PLM7_Cr3c	79.1%	80.2%	77.5%	77.5%	64.4%	51.6%	49.3%	34.1%		20.8%	
QUI7_T13	85.6%	66.3%	86.9%	82.4%	74.1%	62.6%				18.1%	
CAM15D_C19	74.3%	59.6%	80.2%	77.5%	68.8%	54.5%		48.1%	60.3%	42.4%	
PLM7_T119	99.8%	65.8%	90.6%	90.3%	84.6%	63.3%		39.4%		40.3%	
CAM15C_C3	86.8%	63.4%	82.2%	84.7%	56.2%	54.7%		6.9%		18.7%	

B	K80	K81	K82	K83	K84	K85	K86
EuropeM				88.8%		89.7%	93.4%
ChiliM		42.8%		52.7%		56.2%	59.9%
PLM7_SREF		79.8%	43.1%	87.0%		91.3%	93.2%
PLM7_T81		86.7%		85.8%		87.8%	88.7%
PLM7_T309		68.9%	44.1%	80.7%		72.4%	81.9%
PLM7_12816		72.9%		77.5%		80.9%	87.0%
PLM7_T306		73.1%	54.0%	80.5%		83.4%	88.5%
PLM7_Cr5		69.9%	46.6%	82.2%		81.1%	85.2%
PLM7_SN10		72.7%		77.5%		79.1%	87.9%
PLM7_T107			40.0%	77.9%		72.2%	86.8%
PLM7_Cr4		70.1%		69.2%		83.6%	87.0%
PLM7_Cr148		71.1%	54.0%	75.7%		78.3%	86.0%
PLM7_T305		83.2%		88.2%		91.5%	96.7%
PLM7_Cr3c		58.2%	49.5%	85.4%		78.3%	85.2%
QUI7_T13			45.6%	77.3%		81.7%	82.9%
CAM15D_C19			52.0%	80.1%		81.3%	87.2%
PLM7_T119		84.2%	42.9%	86.6%		97.8%	100.0%
CAM15C_C3				78.7%		85.2%	89.7%

Il faut noter que parmi les kératines non ou peu identifiées (identification non systématique, recouvrement de séquence plus faible, etc.), certaines sont, soit spécifiques à la cuticule, à l'image de

K40, K80 et K82, soit peu décrites pour le protéome capillaire, comme K37 – protéome des poils du duvet et du canal médullaire – et K84 – protéome de la langue (Tableau C.3)¹⁸⁸. L'identification systématique de K32, et celle de K82 (pour 10 échantillons sur 16), kératines exclusivement présentes dans la cuticule montre également que le protocole d'extraction n'est pas spécifique au cortex, mais extrait également, dans une moindre mesure, des kératines cuticulaires. L'approche protéomique mise en place donne donc accès à une caractérisation globale des fibres capillaires anciennes.

3.2. Marqueurs moléculaires de dégradation liés au vieillissement

La réalisation du protocole d'extraction et l'interprétation des données MS/MS générées par les analyses des digests de cheveux archéologiques ont mis en évidence l'existence de marqueurs d'une dégradation moléculaire des protéines de cheveux de momies. Ces différents marqueurs sont détaillés dans cette partie.

La quantité de données générées pour une analyse peut être extrêmement importante et demande un traitement long et complexe. Dans ce contexte, toutes les données expérimentales n'ont pas encore été entièrement exploitées. Certains résultats présentés ici (étude des déamidations et des oxydations) ne concernent que 4 échantillons archéologiques : PLM7_T119, PLM7_T305, QUI7_T13 et CAM15C_C3, ainsi que les contrôles modernes de cheveux européens et chiliens. Seuls les observations globales, le nombre de protéines identifiées et les pourcentages de peptides modifiés sont présentés pour tout le corpus.

3.2.1. Observations macroscopiques

A l'image des observations faites lors de la mise au point du protocole final (Partie 2.2.3 "*Analysis of hair from an Andean mummies*"), les cheveux archéologiques ont tous été presque entièrement solubilisés au bout de 4 heures d'extraction, contrairement aux cheveux modernes (Figure C.13). Comme discuté plus tôt, ce phénomène suggère une altération au cours du temps des interactions moléculaires participant à la cohésion de la fibre capillaire, et notamment une altération des ponts disulfures, principaux responsables de la robustesse des cheveux. Les ponts disulfures peuvent en effet être impactés par les processus d'oxydation des protéines, liés aux rayonnements UV et au vieillissement des tissus, ce qui mènerait à la rupture de la liaison (Partie 1.2.2. – Figure C.4) et donc à la fragilisation de la fibre²⁷.

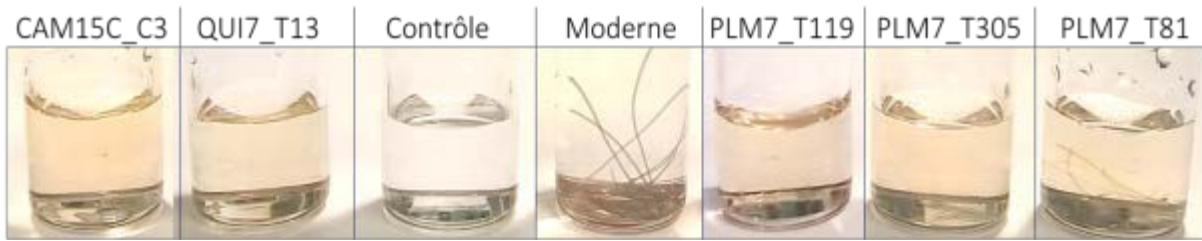


Figure C. 8 – Extraits protéiques de 5 cheveux de momies, d'un échantillon de cheveux modernes européens et d'un blanc de contrôle (eau UP), après 4 heures d'extraction dans une solution à 8 M d'urée, 50 mM de DTT et 100 mM de NH_4HCO_3 (tampon pH 9,1).

Un résidu de cheveux est toujours nettement visible après 4 heures d'extraction, pour deux échantillons du corpus PLM7_T81 (Figure C.13) et PLM7_SREF. Ces deux cas particuliers ont été prélevés sur les momies les plus récentes du corpus, puisqu'elles sont respectivement datées de 640-884 ap. J.-C. et 1220-1300 ap. J.-C. (Figure C.1 et Tableau C.1). Ces observations seraient ainsi cohérentes avec l'hypothèse d'une fragilisation progressive de la fibre par rupture des ponts disulfures au cours du temps, qui serait de ce fait plus marquée pour des échantillons plus anciens.

3.2.2. Protéines identifiées

Comme détaillé précédemment, Partie 3.1, il a été possible d'identifier entre 20 et 40 protéines capillaires pour les cheveux de momie, contre 37 et 35 pour les cheveux modernes européens et chiliens (Figure C.12). Plus précisément, si le nombre de kératines identifiées dans les différents échantillons est globalement constant, l'histogramme de la Figure C.12 permet de mettre en évidence une nette diminution du nombre de KAPs et de cytokératines dans les cheveux archéologiques, par rapport aux cheveux modernes. Ainsi, le nombre de ces protéines minoritaires chute d'une vingtaine de protéines dans les contrôles modernes, à systématiquement moins de 12 protéines : entre 7 et 12 KAPs ou cytokératines pour 6 échantillons de cheveux anciens, et moins de 6 pour les 10 autres échantillons.

Cette diminution pourrait être un indicateur d'une voie de dégradation des cheveux au cours du temps, et plus particulièrement d'une dégradation préférentielle des KAPs et cytokératines, par rapport aux kératines capillaires.

Le Tableau C.3 montre également les hauts taux de recouvrement obtenus pour les kératines capillaires, à la fois pour les cheveux de momies, mais aussi pour l'échantillon moderne européen (EuropeM) – plus de 80 % pour les 9 kératines communes à tous les échantillons. En revanche, dans le cas des cheveux modernes chiliens, de plus faibles performances d'identification sont obtenues, avec des recouvrements de séquence compris entre 30 et 60 %.

Ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse d'une dégradation des ponts disulfures au cours du temps, induisant une fragilisation de la fibre. En effet, les performances d'identification plus faibles pourraient ainsi s'expliquer par la présence dans la fibre d'une quantité plus importante de ponts disulfure non altérés, qui renforcerait la cohésion moléculaire des cheveux et gênerait l'extraction des protéines. Les variations observées, entre l'échantillon de cheveux modernes chiliens et celui de cheveux modernes européens, mettraient de ce fait en évidence une différence dans la structure moléculaire des cheveux, propre à l'individu ou à une ethnie, qui se manifesterait plus particulièrement par l'abondance variable des ponts disulfures.

3.2.3. Etude des modifications post-traductionnelles

Le dernier marqueur d'altération moléculaire des cheveux archéologiques a été mis en évidence grâce à l'étude des PTMs dans les différents échantillons. Lors des recherches dans les bases de données protéomiques, différentes PTMs ont été recherchées, telles que les carbamidométhylations (C), les carbamylations (N-term), les déamidations (NQ), les méthylations (DE), et les oxydations (M) et les mono-, di- et trioxydations (C) (cf. Chapitre B – Partie 3.3.2). Ainsi, différents aspects dans la conservation des protéines capillaires sont décrits dans les paragraphes suivants.

Les différents pourcentages présentés ici représentent, pour un échantillon donné, soit une moyenne des valeurs obtenues pour chacun des deux répliques (pourcentage de peptides modifiés), soit une combinaison des résultats obtenus pour ces deux répliques (pourcentages de sites déamidés et oxydés), comme détaillé au Chapitre B, Partie 3.3.3. Les calculs pour chacun des échantillons se sont focalisés sur les 6 kératines capillaires majoritaires présentant les plus hauts taux de recouvrement, à savoir 4 kératines de type-I – K31, K33a, K33b et K34 – et 2 kératines de type-II – K85 et K86.

▣ Proportion de peptides modifiés

Pour ce premier aspect, l'évolution du pourcentage de peptides modifiés en fonction de l'âge de l'échantillon a été tracée pour chacune des 6 kératines d'intérêt (Figure C.14). Afin de limiter l'influence des modifications non liées au vieillissement naturel, les PTMs induites par le traitement n'ont pas été prises en compte : les carbamidométhylations (cystéines) – dues à l'IAM – et les carbamylations (N-terminal) – dues à l'urée.

La Figure C.14 met en évidence de manière claire, la différence de conservation moléculaire existant entre les cheveux modernes, pour lesquels le pourcentage de peptides modifiés est systématiquement inférieur à 20 %, quelle que soit la kératine ciblée, et les cheveux archéologiques

pour lesquels les pourcentages sont compris entre 20 et 70 %. Cette différence montre bien une dégradation moléculaire des cheveux de momies avec le temps.

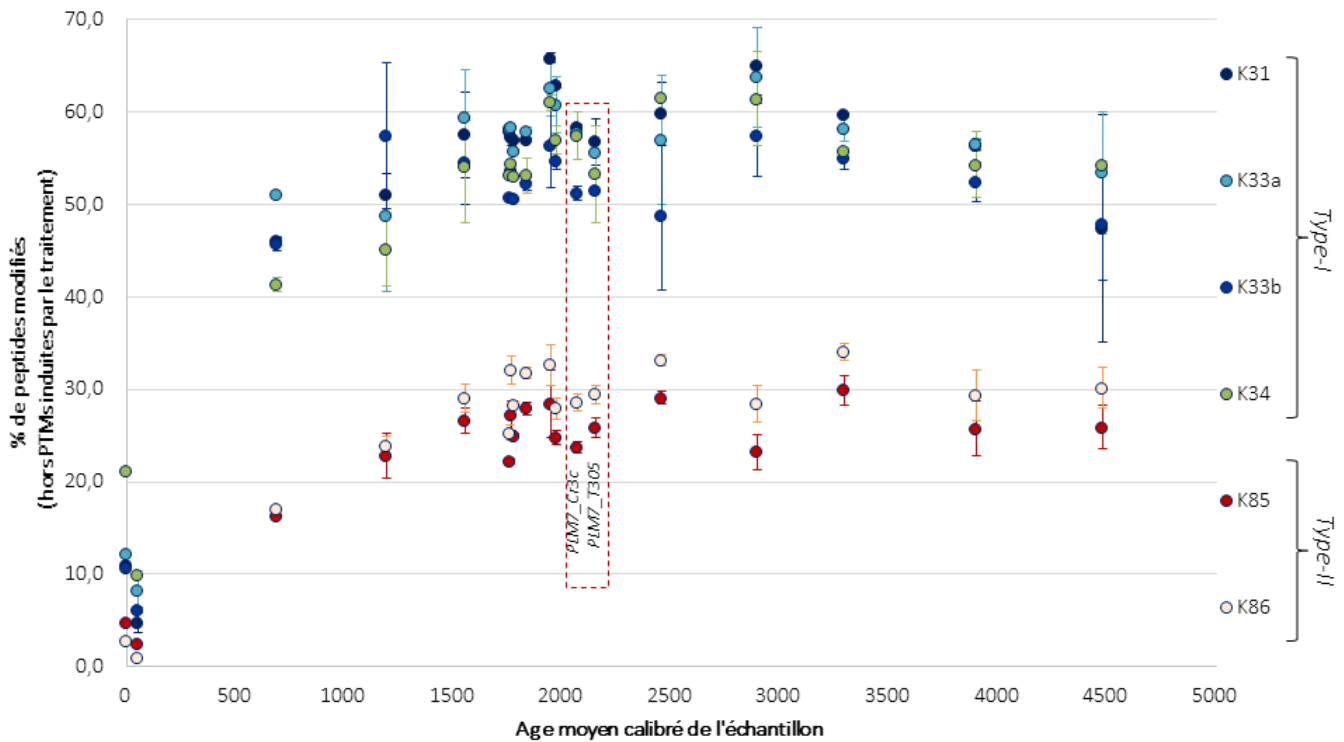


Figure C. 9 Evolution du pourcentage de peptides modifiés^a – PTMs induites par le traitement non incluses (carbamidométhylations et carbamylations) – pour chacune des 6 kératines d'intérêt, en fonction de l'âge de l'échantillon. Chaque échantillon correspond à une colonne de 6 points.

A environ 2 000 ans BP (années avant 1950), deux échantillons présentent des pourcentages de modifications plus bas que les échantillons de la même époque, et ce pour les 6 kératines étudiées : PLM7_Cr3c et PLM7_T305. Cette différence pourrait être due à la présence de quantités importantes de métaux lourds dans les cheveux de ces momies (Partie 4 de ce chapitre), ce qui aurait favorisé une meilleure conservation des protéines capillaires²⁴⁰.

Par ailleurs, dans le cas des échantillons archéologiques, un écart marqué est visible entre deux groupes de kératines, correspondant aux 4 kératines de type-I, avec des pourcentages de peptides modifiés entre 45 et 60 %, et aux 2 kératines de type-II, avec des pourcentages de peptides modifiés entre 20 et 30 %. Cette différenciation nette n'est pas visible pour les deux contrôles modernes et pourrait donc être indicatrice d'une voie de dégradation des protéines capillaires, consistant en une dégradation préférentielle des kératines de type-I par rapport aux kératines de type-II.

Cet aspect pourrait être associé aux conclusions de différents travaux de la littérature. Les premiers, qui s'intéressent à l'étude de cheveux archéologiques ou de cheveux vieillissants artificiellement,

^a Les écarts-types ont été calculés selon l'équation (1) décrite dans le Chapitre B – Partie 3.3.3..

expliquent que ceux-ci se dégradent depuis le centre de la fibre jusqu'à son enveloppe externe^{25,239}. De plus, grâce à l'étude de cheveux modernes¹⁷², Bednarczyk a montré la présence des kératines de type-II vers l'extérieur des arrangements protéiques, ce qui les rend plus exposées à leur environnement et induirait plus de PTMs sur celles-ci. Ces informations et les observations faites sur nos échantillons permettent ainsi de suggérer une localisation des kératines de type-I à l'intérieur de la fibre et des arrangements protéiques, au contraire des kératines de type-II, du fait de l'état de dégradation plus avancé des kératines de type-I.

▣ Déamidation des glutamines et asparagines

Les déamidations des glutamines et asparagines (Figure C.15) représentent l'une des PTMs les plus courantes, qui apparaît sur les protéines soit au cours de la mise en œuvre des protocoles expérimentaux, soit *in vivo*, au cours de la vie d'un système biologique et après sa mort²⁷⁹. Le rôle des déamidations n'est actuellement pas clairement établi, mais cette PTM est cependant reconnue comme une horloge biologique moléculaire^{280–282}.

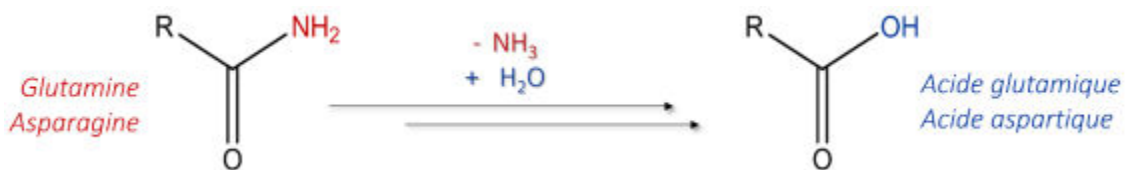


Figure C. 10 – Déamidation des résidus glutamine et asparagine en acides glutamique et aspartique.

De même que précédemment, l'évolution des pourcentages glutamines et asparagines modifiées en fonction de l'âge de l'échantillon a été tracée pour chacune des 6 kératines d'intérêt (Figure C.16). Il apparaît ainsi clairement que les échantillons archéologiques présentent, comme attendu, des pourcentages plus élevés de sites déamidés – entre 60 et 90 % – par rapport aux échantillons modernes – moins de 40 % dans le cas des cheveux européens (EuropeM) et moins de 25 % dans le cas des cheveux chiliens (ChiliM).

Les déamidations étant une PTM courante, qui peut être induite par le traitement, il est important ici de disposer des contrôles de cheveux modernes, qui ont aussi été soumis au processus de déamidation au cours du développement de la fibre et de la préparation des échantillons. Le faible taux de sites déamidés dans les cheveux modernes par rapport aux cheveux de momies permet bien de mettre en évidence l'intérêt de cette PTM comme horloge biologique moléculaire.

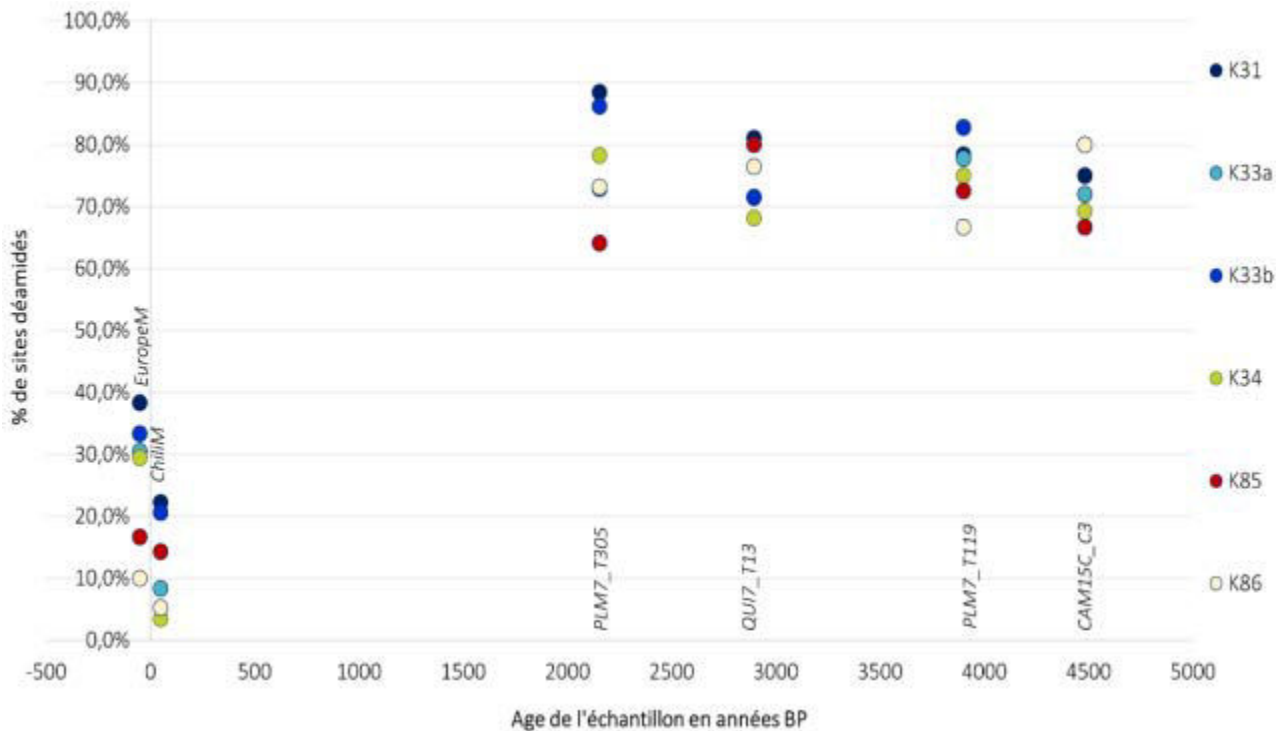


Figure C. 11 – Evolution du pourcentage de sites de déamidation modifiés pour chacune des 6 kératines d'intérêt, en fonction de l'âge de l'échantillon. Chaque colonne de 6 points correspond à un échantillon.

▣ Oxydations des cystéines

Les oxydations des cystéines (mono-, di- et trioxydations – Figure C.4) sont une autre PTM reconnue comme étant liée au vieillissement des échantillons biologiques. Les mono-, di- et trioxydations des cystéines ont donc été recherchées *via* les bases de données de protéomique.

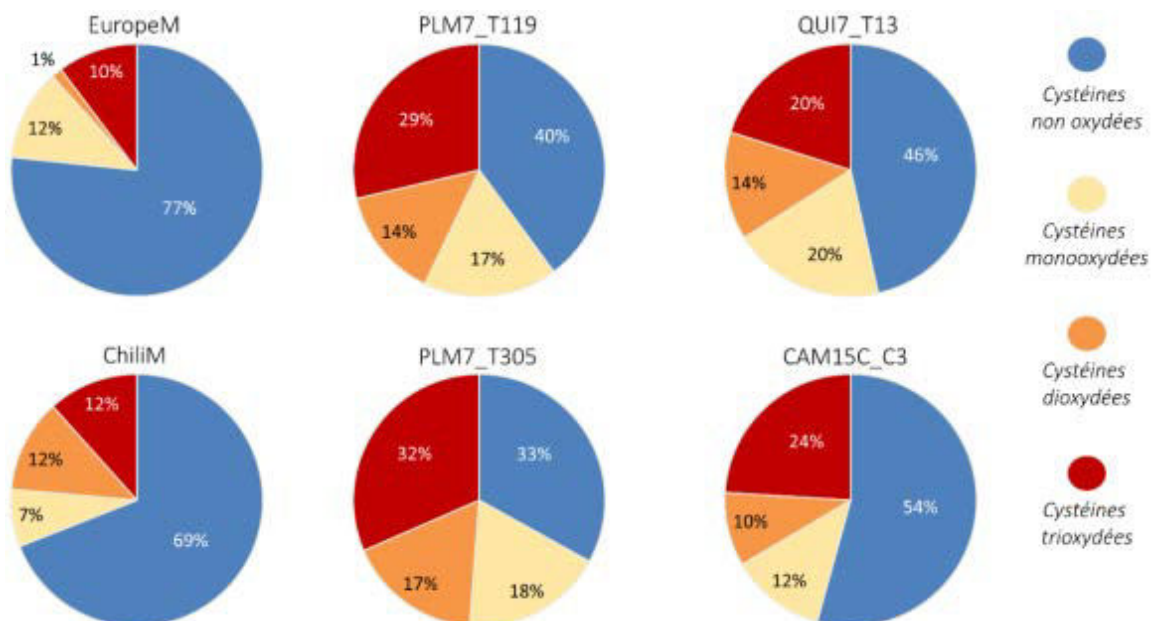


Figure C. 12 – Proportions des cystéines non oxydées, monoxydées, dioxydées et trioxydées pour les échantillons de cheveux modernes européens (EuropeM) et chiliens (ChiliM), et les 4 échantillons de cheveux de momies.

Les échantillons de cheveux de momies montrent un taux de sites non oxydés plus faibles que les contrôles modernes (Figure C.17). Cette réduction est principalement due à l'augmentation du taux de cystéines trioxydées, qui est passé de près de 10 % dans les cheveux modernes à 20-30 % dans les cheveux archéologiques. Les sites mono- et dioxydés ont aussi une contribution plus importante dans les cheveux anciens, bien que les taux calculés soient proches des taux modernes pour certains échantillons. Ces résultats montrent donc bien un lien entre l'augmentation des niveaux d'oxydation des cystéines des kératines capillaires et l'âge des échantillons.

3.3. Conclusion

L'application de l'approche protéomique, mise en place dans la Partie 2, aux échantillons de cheveux de momies du corpus d'étude a permis de montrer la possibilité d'identifier des protéines capillaires dans tous les échantillons de cheveux étudiés et ce, à partir de seulement 500 µg. Malgré l'âge des échantillons, les protéines sont identifiées avec des scores d'identification élevés et des taux de recouvrement pouvant dépasser 70 %, dans le cas des 6 kératines majoritaires : K31, K33a, K33b, K34, K85 et K86. La préparation des échantillons et la caractérisation des protéines identifiées ont aidé à mettre en évidence la présence de marqueurs de dégradation moléculaire des cheveux de momies. En particulier,

- i) les cheveux les plus anciens sont presque entièrement solubilisés au cours de l'étape d'extraction, alors que les plus récents ne sont que peu impactés,
- ii) l'identification des protéines montre une perte d'information vis-à-vis des protéines minoritaires, telles que les KAPs et les cytokératines, ce qui suggère une dégradation préférentielle de ces composés par rapport aux kératines capillaires,
- iii) les pourcentages de peptides modifiés, de glutamines et asparagines déamidés et de cystéines oxydées – et notamment trioxydés, sont nettement supérieurs aux pourcentages observés pour les cheveux modernes,
- iv) la nette différenciation en deux groupes des kératines de type-I et de type-II par rapport à leurs pourcentages de peptides modifiés permet de suggérer une localisation des kératines de type-I, vers l'intérieur de la fibre et des arrangements protéiques,

Ces résultats apportent ainsi de nouveaux indices prometteurs quant à la compréhension des processus de dégradation moléculaire des fibres capillaires.

Malgré la mise en évidence des premiers indicateurs moléculaires de la dégradation des cheveux archéologiques, l'étude doit encore être approfondie. Plus particulièrement, nous nous intéresserons

à la recherche de modifications spécifiques au contexte environnemental ou au vieillissement en contexte archéologique, et non répertoriées dans les bases de données protéomiques existantes, telles que les modifications liées à la présence de métaux lourds, à l'image de l'arsenic.

De plus, aucune différence significative d'état de conservation n'a pu être mise en évidence sur les résultats obtenus pour les 3 sites étudiés ici. Un élargissement du corpus sera ainsi nécessaire afin d'obtenir une meilleure représentativité inter- et intra-sites.

4. Détection des métaux lourds

Comme mentionné dans le Chapitre B, Partie 4, les analyses élémentaires présentées dans cette dernière partie ont été effectuées au C2RMF avec la collaboration de l'équipe d'AGLAE+ (Accélérateur Grand Louvre pour l'Analyse Élémentaire).

Les analyses par SEM-EDS et XRF ont été réalisées en amont de ces recherches, dans le cadre de mon projet de fin d'études réalisé au C2RMF, puis complétées au cours de ces trois années de recherches. Les résultats de ces analyses élémentaires ont également été rapportés, avec les observations SEM et les analyses FTIR (Partie 1.2. de ce chapitre), dans un article publié dans la revue *Forensic Science International* (Fresnais *et al.* Recent Advances in the Characterization of Hair of Mummies from the Chilean Andean Coast. *Forensic Sci. Int.* **2015**, *249*, 25–34)²⁰.

Les analyses élémentaires par spectroscopie d'émission de rayons X induite par particules (PIXE) ont été réalisées au C2RMF sur l'accélérateur AGLAE, dans le cadre du projet PIXHAM (*PIXE Mapping of Hair from Andean Mummies*), déposé et accepté au cours de ces trois années de thèse.

4.1. Introduction

L'objectif de ces analyses est de détecter la présence des métaux tels que Fe, Cr, Cu, Pb, Hg ou encore As, afin d'établir une corrélation avec différentes pratiques funéraires utilisées au cours des rites de momification ou avec l'exposition des civilisations anciennes à ces éléments, présents dans leur environnement direct (cf. Chapitre A, Partie 4.1.3).

Pour cela, des analyses par SEM-EDS et spectroscopie XRF ont été mises en œuvre, ainsi que des analyses par imagerie PIXE, afin d'atteindre des limites de détection et quantification de l'ordre de 1 ppm.

Dans ce dernier paragraphe, sera également abordé l'intérêt de la spectrométrie de masse en complément de ces méthodes. Les échantillons de cheveux lavés ont notamment été analysés selon l'approche protéomique décrite dans ce chapitre, à la suite des analyses PIXE afin de visualiser l'impact réel au niveau moléculaire des méthodes d'analyse par faisceau d'ions sur des échantillons biologiques anciens. De plus, nous évoquerons la possibilité de détecter la présence de ces métaux lourds dans les cheveux, grâce à notre approche protéomique, et d'étudier les interactions au niveau moléculaire de ces composés avec les protéines capillaires.

Pour cette étude, une partie des échantillons du corpus ont été sélectionnés et analysés systématiquement avant et après lavage (cf. Chapitre B – Partie 4.1.1). Bien que la totalité des échantillons ait été observée et analysée par SEM-EDS et par XRF, seuls 7 échantillons archéologiques ont pu être analysés par imagerie PIXE. Il faut noter que les compositions élémentaires obtenues pour ces 7 échantillons par SEM-EDS et XRF sont cependant représentatives des compositions observées pour l'ensemble du corpus, ce qui a conduit à leur sélection pour les analyses PIXE. Afin de pouvoir comparer les résultats avec fiabilité, cette dernière partie se concentrera donc sur ces 7 échantillons : PLM7_Cr3c, PLM7_T119, PLM7_T305, PLM7_T107, PLM7_T81, QUI7_T13 et CAM15D_C19. De plus, les résultats obtenus pour un échantillon moderne témoin, constitué de cheveux d'une femme chilienne, seront également mentionnés.

4.2. Analyses préliminaires par microanalyse élémentaire et fluorescence des rayons X

Chaque échantillon étudié dans cette partie a été analysé avant et après nettoyage, à l'aide d'un détecteur EDS couplé au SEM, ce qui a permis d'obtenir des spectres et des cartographies élémentaires associés aux images des cheveux (Partie 1.2.1 de ce chapitre). Les paramètres expérimentaux (cf. Chapitre B – Partie 4.3.1) permettant de déterminer la composition élémentaire du cheveu jusqu'à 1 μm de profondeur seulement, les analyses EDS ne donnent par conséquent qu'une vision partielle de la composition élémentaire d'un échantillon, à savoir celle de sa cuticule.

Contrairement à l'EDS, les analyses XRF permettent d'obtenir des informations sur la composition élémentaire globale du cheveu – cuticule et cortex, puisque la profondeur d'analyse est de l'ordre du diamètre d'un cheveu dans notre cas. Les paramètres instrumentaux sont détaillés dans le Chapitre B – Partie 4.3.2, ainsi que les traitements des données pour l'obtention des résultats qualitatifs et quantitatifs.

Les analyses EDS et XRF ont mis en évidence la présence d'éléments communs aux échantillons modernes et aux échantillons archéologiques, tels que les composants majoritaires de la kératine – C, O, N, S – et certains éléments traces typiques des cheveux – Ca, Na, Cu, Fe et Zn. D'autres éléments, non présents dans le cas d'échantillons modernes, ont été mis en évidence dans les cheveux bruts et lavés. Les sources probables pour ces différents éléments sont discutées dans la suite de cette partie.

4.2.1. Contribution exclusivement exogène

Les cheveux analysés en EDS et XRF présentent, de manière générale, une quantité importante de sels et de silicates à leur surface – Mg, Al, Si, P, Cl et K notamment, probablement issus du sol dans lequel étaient enterrées les momies, comme suggéré par la disparition quasi-systématique du signal de ces éléments dans les cheveux nettoyés (Figures C.18.B et C.19.B). Cette observation est cohérente avec les images SEM des cheveux bruts (Figure C.2.B à E) sur lesquelles de nombreux composés, tels que des minéraux ou des substances non identifiées sont clairement visibles. De plus, il a été observé que les échantillons archéologiques pour lesquels ces composés sont encore détectés après le lavage présentent toujours des traces de composés minéraux à leur surface, à l'image des cheveux de PLM7_T119 analysés en SEM-EDS (Figures C.3.B).

4.2.2. Contribution mixte

Les résultats mettent également en évidence la présence de métaux lourds, tels que As, Pb, Hg, Cr, Mn, et Ni, dans certains échantillons de cheveux archéologiques. Comme détaillé dans le Chapitre A, Partie 4.1.3., de fortes concentrations en métaux sont présents dans les sols et les cours d'eau du nord du Chili du fait de l'activité volcanique importante et de la présence de nombreuses sources d'eaux thermales. Il est donc raisonnable de penser que ces métaux détectés dans les cheveux de momies peuvent provenir du sol dans lequel étaient enterrées les momies, à l'image des sels et silicates mentionnés plus tôt. Notamment, parmi ces composés, certains ne sont plus visibles après le nettoyage, indiquant l'origine exogène probable de ces métaux, comme pour Hg (QUI7_T13), Cr (QUI7_T13 et PLM7_T81), et même Pb (QUI7_T13, PLM7_T81, PLM7_Cr3c et PLM7_T305) ou As (PLM7_T81) dans certains cas (Figures C.18.B et C.19.B).

Dans d'autres cas, ces éléments sont présents de manière significative avant et après le lavage, ce qui permet d'émettre l'hypothèse d'une imprégnation plus profonde de la fibre, et donc d'une contribution pouvant être en partie endogène. Si Cu et Fe sont présents en faibles quantités dans les cheveux modernes (Figures C.18.A et C.19.A – Spectres 1.), les intensités détectées en XRF des cheveux archéologiques sont trop élevées par rapport à ce qui peut être attendu dans des cheveux sains. La présence dans les cheveux lavés de CAM15D_C19, PLM7_T107, PLM7_T305 ou encore PLM7_Cr3c (Figure C.19.B et Tableau C.4) de quantités importantes de Cu, de Fe (plus de 200 ppm contre 50 ppm en moyenne dans les cheveux modernes¹⁸²), de As (entre 40 et 125 ppm contre moins de 0,1 ppm dans les cheveux modernes sains²⁸³) ou encore de Pb (plus de 150 ppm contre 20 ppm dans les cheveux modernes), permet de mettre en évidence l'influence de l'environnement sur la

composition des cheveux et pourrait indiquer une origine endogène – alimentation, eau, traitement cosmétique, etc.

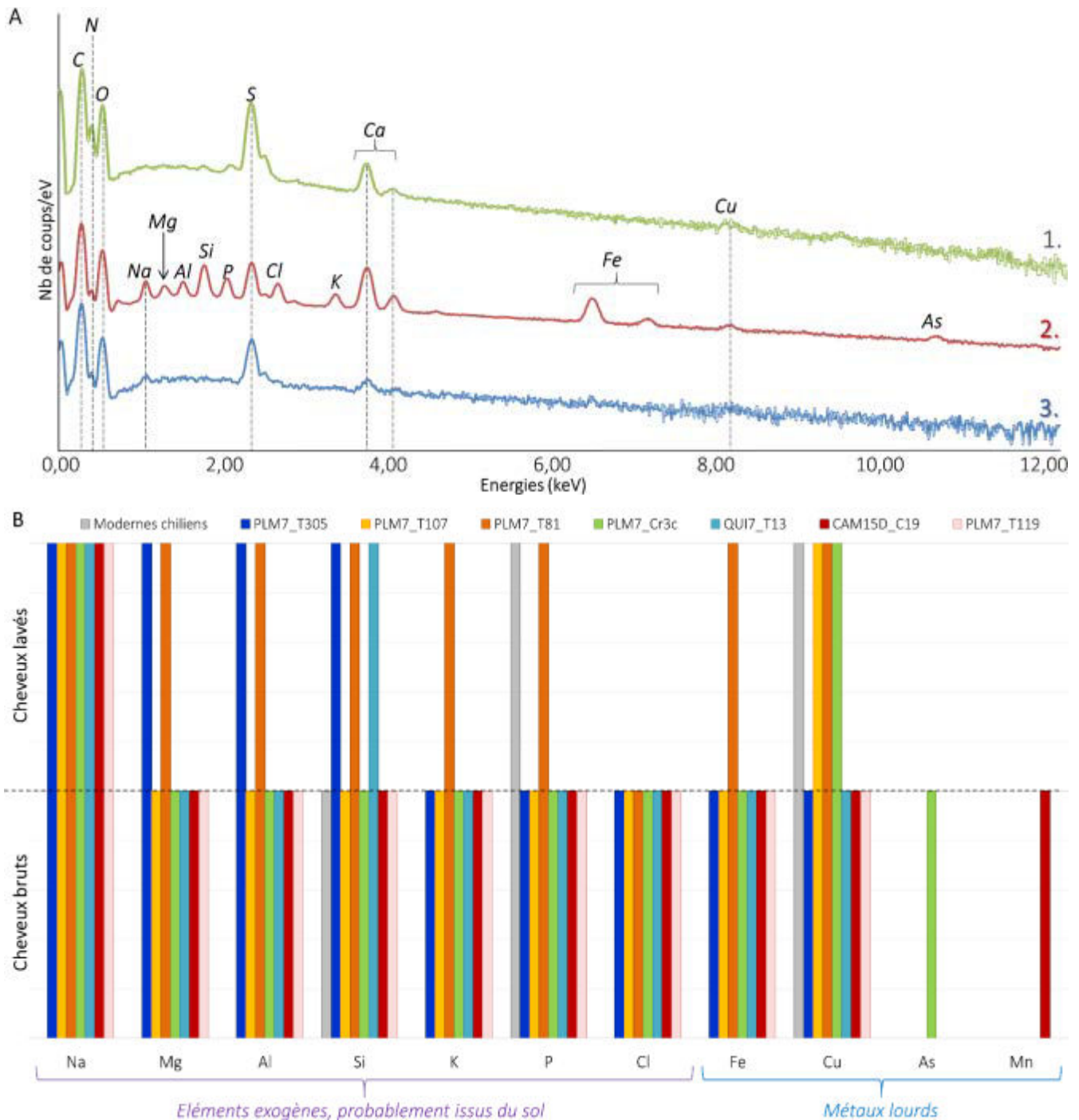


Figure C. 13 – A) Spectres EDS de l'échantillon de cheveux chiliens modernes (1), et de l'échantillon PLM7_Cr3c brut (2) et nettoyé (3), représentatif des résultats obtenus sur la totalité du corpus. Couche de 10 nm de carbone, SEM XL30 CP, Tension = 20 keV, distance de travail = 10 mm. B) Éléments identifiés (hors éléments classiques du cheveu C, N, O, S et Ca) en microanalyse élémentaire dans les sept échantillons archéologiques étudiés et dans un échantillon de cheveux modernes chiliens. Ces éléments sont classés selon leur origine présumée.

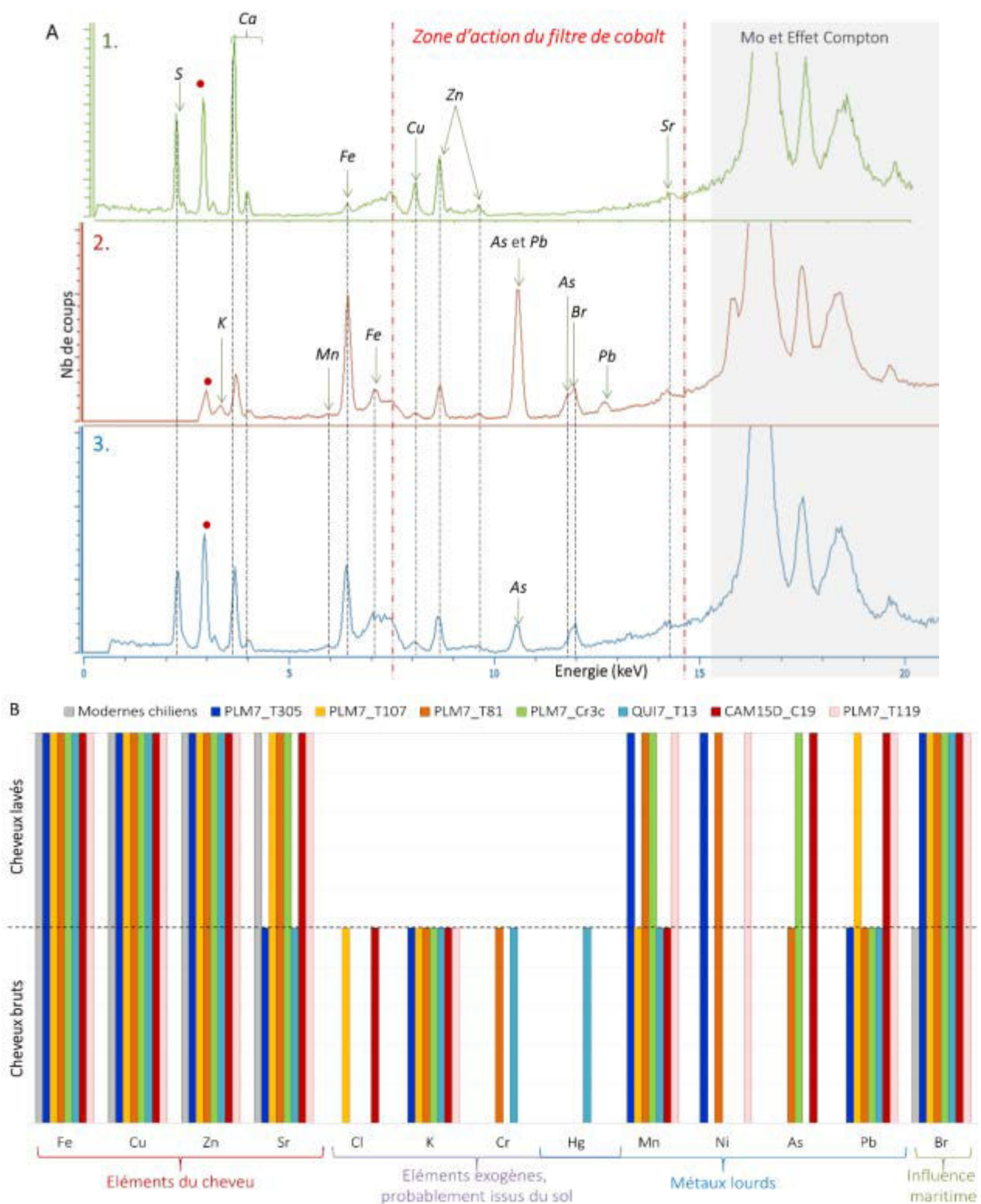


Figure C. 14 – A) Spectres XRF de l'échantillon de cheveux chiliens modernes (1), et de l'échantillon PLM7_Cr3c brut (2) et lavé (3), représentatif des résultats obtenus sur la totalité du corpus. Tube à rayons X de Mo : $K\alpha = 17,479$ keV et $K\beta = 19,607$ keV, tension = 40 kV, courant = 800 μ A, 1024 canaux, absorbeur de Co 50 μ m, acquisition = 20 min. Marqueur rouge : raie $K\alpha$ (2,954 keV) de Ar. B) Éléments identifiés (hors éléments classiques du cheveu S et Ca) par spectroscopie XRF dans les sept échantillons archéologiques étudiés et dans un échantillon de cheveux modernes chiliens. Ces éléments sont classés selon leur origine présumée.

Dans le cas de la momie PLM7_Cr3c notamment (Figure C.19.A et Tableau C.4), la présence d'As, en quantité suffisante pour être détectée après nettoyage en XRF (124 ppm), pourrait être corrélée avec la présence d'As dans l'environnement chilien, due notamment à l'activité volcanique de la région, et donc avec une exposition de l'individu étudié à l'arsenic de son vivant.

Tableau C. 4 – Données semi-quantitatives obtenues pour les éléments identifiés par spectroscopie XRF des cheveux modernes et archéologiques, bruts et lavés. Pour chaque échantillon, les éléments détectés sont représentés par une case bleue et la quantité estimée est indiquée en ppm lorsque celle-ci est supérieure à la limite de quantification. Les cases rouges contenant une croix indiquent une absence de détection de l'élément.

	ChiliM		PLM7_T119		PLM7_T305		PLM7_T107		PLM7_T81		PLM7_Cr3c		QUI7_T13		CAM150_C19	
	Bruts	Lavés	Bruts	Lavés	Bruts	Lavés	Bruts	Lavés	Bruts	Lavés	Bruts	Lavés	Bruts	Lavés	Bruts	Lavés
Cl	x	x		x		x	-	x		x		x		x	-	x
K	x	x	5592	x	19647	x	-	x	6124	x	5111	x	8039	x	-	x
Cr	x	x	x	x	x	x	x	x	20	x	x	x	25	x	x	x
Mn	x	x	-	20	x	15	-	x	147	133	54	47	-	x	-	x
Fe	-	-	647	452	34717	133	-	-	1831	915	3762	1113	2442	611	-	-
Ni	x	x	x	-	x	-	x	x	x	-	x	x	x	x	x	x
Cu	-	-	60	176	77	200	-	-	48	178	53	157	49	176	-	-
Zn	-	-	583	636	365	157	-	-	276	314	455	364	273	168	-	-
Hg	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	412	x	x	x
As	x	x	x	x	x	x	x	x	-	x	371	124	x	x	-	-
Pb	x	x	241	-	230	x	-	-	149	x	1478	x	149	x	-	-
Br	-	x	8808	7003	6470	891	-	-	680	296	3331	2089	4162	1792	-	-
Sr	-	-	176	271	109	x	-	-	404	347	95	168	149	x	-	-

L'association entre l'imagerie SEM, le système EDS et les analyses de XRF a aussi mis en évidence la présence en grande quantité de Fe à la surface des cheveux de l'échantillon PLM7_T305 brut – de l'ordre de 35 000 ppm, soit 3,5 % massique (Tableau C.4). Après le lavage, le pic de Fe disparaît en EDS et son intensité est considérablement réduite en XRF, ce qui serait en corrélation avec une contribution principalement exogène pour cette présence de fer. L'observation à la loupe binoculaire avait mis en évidence une coloration rouge à la surface des cheveux de cette momie (Tableau C.1). Les résultats des analyses élémentaires permettent ainsi de supposer l'utilisation d'hématite^a en guise de pigment. Cette observation faite, il n'est pas étonnant de retrouver la présence de Fe même après le lavage (133 ppm), puisqu'il est très probable que ce composé se soit incrusté dans la fibre au cours de la coloration de la chevelure et dans les années qui ont suivi. Une certaine proportion de contribution endogène peut aussi expliquer cette quantité de Fe significative non éliminée par le traitement.

^a L'hématite est un pigment brun à rouge de formule chimique Fe₂O₃.

4.2.3. Contribution endogène

Enfin, tous les spectres XRF de cheveux archéologiques bruts et lavés mettent en évidence d'importantes quantités de brome (de l'ordre de 1 000 ppm et plus contre moins de 500 ppm de nos jours – Tableau C.4), semblant provenir d'une source principalement endogène. Cette observation peut être mise en relation avec la localisation des civilisations sédentaires du désert d'Atacama. Ces peuples s'installaient sur les régions côtières et vivaient en grande partie de la pêche et des ressources maritimes. Le brome se trouve majoritairement dans l'eau de mer et s'accumule dans l'organisme des animaux marins, entre autres, et donc par extension, dans l'organisme des prédateurs qui s'en nourrissent, comme les hommes.

4.2.4. Conclusion préliminaire

Les analyses élémentaires préliminaires par microanalyse élémentaire EDS et spectroscopie XRF ont mis en avant la présence de métaux lourds dans les cheveux de momies étudiés, tels que Fe, Cu, Mn, As ou encore Pb, en concentrations élevées aussi bien avant qu'après le lavage. Ces observations pourraient ainsi mettre en évidence une part non négligeable de contribution endogène pour l'apport de ces métaux dans les échantillons archéologiques, à laquelle peut s'ajouter une contribution exogène apportée par l'environnement des momies, pollué en métaux lourds. Ce point doit cependant être approfondi afin d'étudier dans quelle mesure il est possible de différencier les composés d'origine exogène et ceux d'origine endogène, et de vérifier nos hypothèses.

Egalement, grâce aux analyses XRF et à la détection systématique de quantités non négligeables de brome dans les cheveux de momies avant et après lavage, il a été possible de visualiser l'influence des ressources marines dans le mode de vie, et principalement dans l'alimentation, des civilisations étudiées.

Comme précisé précédemment, compte tenu de la pollution environnementale importante, notamment en arsenic et en plomb, et donc de la probable exposition des civilisations anciennes à ces éléments, nous pouvons nous attendre à les détecter dans la majorité des cas. Les analyses préliminaires n'ont cependant pas montré de présence systématique de ces composés toxiques dans les échantillons archéologiques.

Ceci pourrait s'expliquer de deux manières. D'une part, dans le cas de As et Pb dans les cheveux, la spectroscopie XRF possède des limites de détections élevées – supérieures à 10 ppm – qui peuvent mettre en évidence des expositions aiguës (teneurs supérieures à 10 ppm), mais ne permettraient pas de détecter des expositions chroniques (teneurs comprises entre 1 et 10 ppm). D'autre part, les

teneurs en As et en Pb sont relativement variables, même dans la région d'Arica-Parinacota, et il est possible que les momies étudiées n'aient pas toutes été exposées de la même manière à As et Pb.

4.3. Analyses de traces : Imagerie PIXE et analyse élémentaire par faisceau d'ions

L'accélérateur de particules du C2RMF est dédié aux analyses élémentaires, dites non-invasives, des objets du patrimoine historique et culturel. Sa mise en œuvre donne accès à des informations qualitatives et quantitatives, et permet d'atteindre des hautes performances analytiques, en termes de sensibilité (détection et quantification d'éléments traces présents à des concentrations de l'ordre de 1 ppm contre 10 ppm en XRF), de résolution spatiale (peut descendre jusqu'à 20 μm contre une précision de 50 μm à 1 mm en XRF) ou encore de précision (inférieure à 5 % contre 10 à 20 % en XRF). De plus, la réalisation de cette technique demande peu de préparation d'échantillon (cf. Chapitre B – Partie 4.1.3) et l'utilisation d'un faisceau extrait à l'air permet l'analyse d'objets de toutes tailles.

4.3.1. Introduction

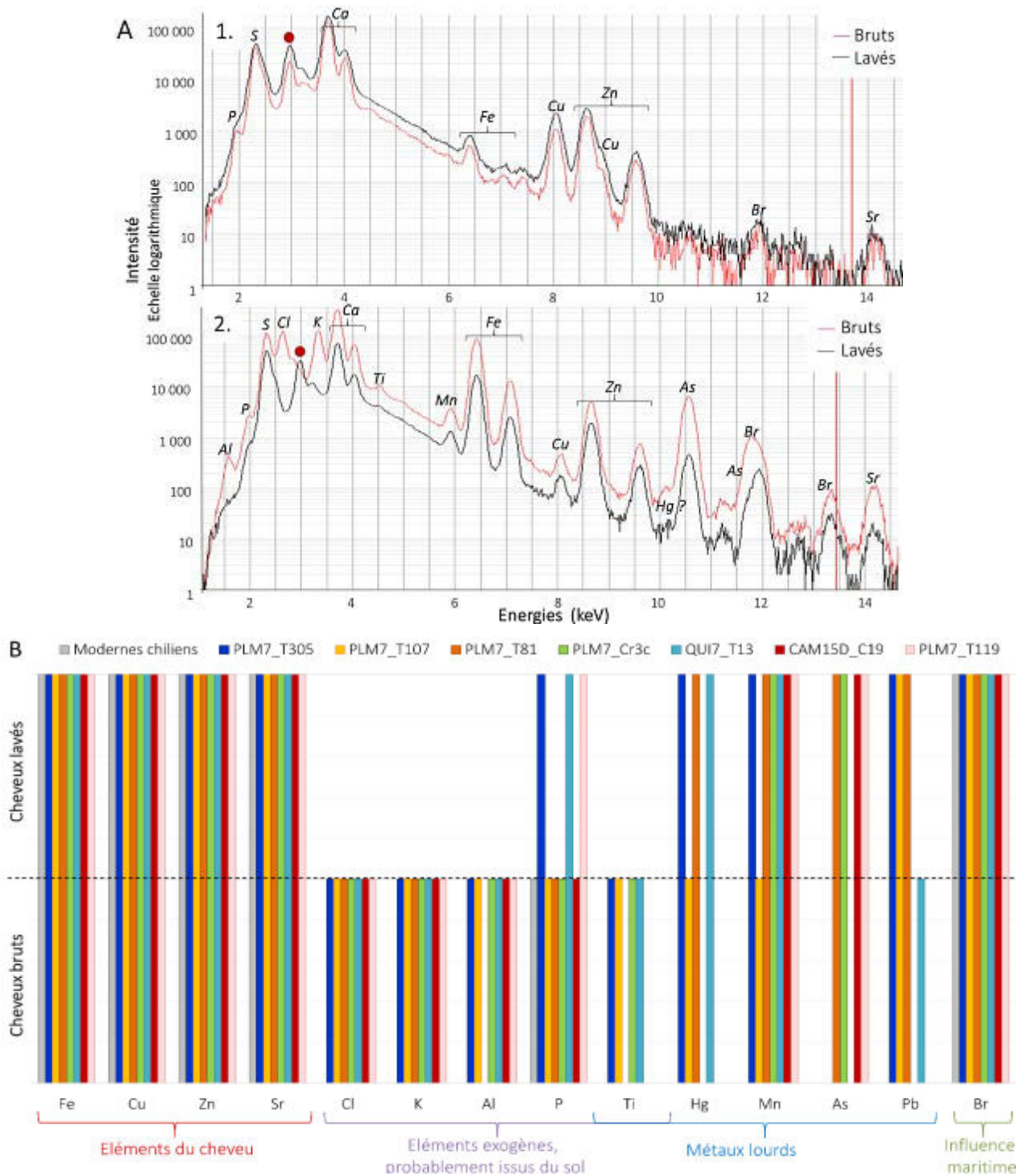
Pour ces analyses, l'objectif était donc de mettre en œuvre une technique plus précise et plus sensible que la spectroscopie XRF, permettant l'analyse de la globalité du cheveu et non pas seulement de sa surface, contrairement aux analyses par SEM-EDS.

De plus, l'utilisation de cette approche permet l'obtention de cartographies élémentaires globales des échantillons étudiés, donnant ainsi accès à la visualisation de la répartition des éléments détectés dans le cheveu, afin de vérifier si des corrélations peuvent être faites entre la répartition des éléments et leur origine supposée (exogène ou endogène). Grâce au logiciel de traitement des spectres et des cartographies (cf. Chapitre B, Partie 4.3.2), il est notamment possible de:

- i) sélectionner un pic d'intérêt sur le spectre, afin de visualiser la répartition d'un élément précis dans l'échantillon,
- ii) sélectionner un spot d'intérêt sur la carte pour en obtenir le spectre et la composition élémentaire.

Les paramètres expérimentaux utilisés pour les analyses sont détaillés dans le Chapitre B, Partie 4.3.2, ainsi que les détails de la procédure de quantification.

4.3.2. Analyse et cartographie élémentaires de cheveux de momies par faisceau d'ions



Eléments communs aux cheveux modernes et archéologiques

A l'image des résultats obtenus par les analyses préliminaires, les spectres PIXE mettent en évidence la présence d'un certain nombre d'éléments communs aux cheveux modernes et archéologiques (Figure C.20), tels que S et Ca, ou encore des éléments traces en quantités variables – Fe, Cu, Zn et Sr.

Cu, Zn et Sr sont répartis de manière homogène à l'intérieur des fibres capillaires – modernes et archéologiques, et sont présents en proportions non négligeables (jusqu'à 500 ng/cm² dans les cheveux lavés – Tableau C.5).

Il faut noter que la présence de Fe en faibles quantités dans les cheveux modernes (moins de 25 ng/cm²) semble principalement due à des spots de fer présents sur certaines fibres, et donc probablement à des poussières exogènes non éliminées par le lavage des cheveux (Figure C.21.A).

Comme observé précédemment, un signal dû au Br a aussi été détecté à la fois dans les cheveux modernes et dans les cheveux de momies, avant et après le lavage. Les quantités de Br dans les cheveux modernes, probablement dues à une contribution marine dans le régime alimentaire de l'individu concerné, sont visiblement plus faibles que celles observés dans les cheveux de momies. Ceci pourrait indiquer une consommation moindre de ressources marines pour l'individu moderne, par rapport aux momies étudiées.

Tableau C. 5 – Données semi-quantitatives obtenues pour les éléments identifiés par imagerie PIXE des cheveux modernes et archéologiques, bruts et lavés. Pour chaque échantillon, les éléments détectés sont représentés par une case bleue et la quantité estimée est indiquée en ng/cm² lorsque celle-ci est supérieure à la limite de quantification. Les cases rouges contenant une croix indiquent une absence de détection de l'élément.

	Chilim		PLM7_T119		PLM7_T305		PLM7_T107		PLM7_T81		PLM7_Cr3c		QUI7_T13		CAM15D_C19	
	Bruts	Lavés	Bruts	Lavés	Bruts	Lavés	Bruts	Lavés	Bruts	Lavés	Bruts	Lavés	Bruts	Lavés	Bruts	Lavés
Cl	x	x	21933	x	21655	x	14486	x	36637	x	14097	x	35483	x	5661	x
K	x	x	5950	x	16382	x	5925	x	6690	x	4357	x	5237	x	1052	x
Ti	x	x	x	x	121	x	40	x	x	x	102	x	60	x	x	x
Mn	x	x	43	30	129	98	40	x	586	274	107	20	60	6	128	104
Fe	24	15	641	663	26452	1208	5046	1388	3608	2608	4940	533	2577	320	352	316
Cu	130	97	58	46	67	31	1274	514	41	27	31	7	31	6	95	190
Zn	278	162	641	464	375	381	331	133	386	404	592	131	306	63	89	196
Hg	x	x	x	x	12	-	-	x	-	-	x	x	67	-	x	x
As	x	x	67	17	x	x	x	x	13	-	1870	88	x	x	7	8
Pb	x	x	x	x	57	11	141	37	-	-	x	x	10	x	x	x
Br	7	4	821	458	512	246	427	183	76	37	312	63	372	60	39	70
Sr	14	7	291	80	155	49	105	20	588	211	157	15	1115	52	24	17

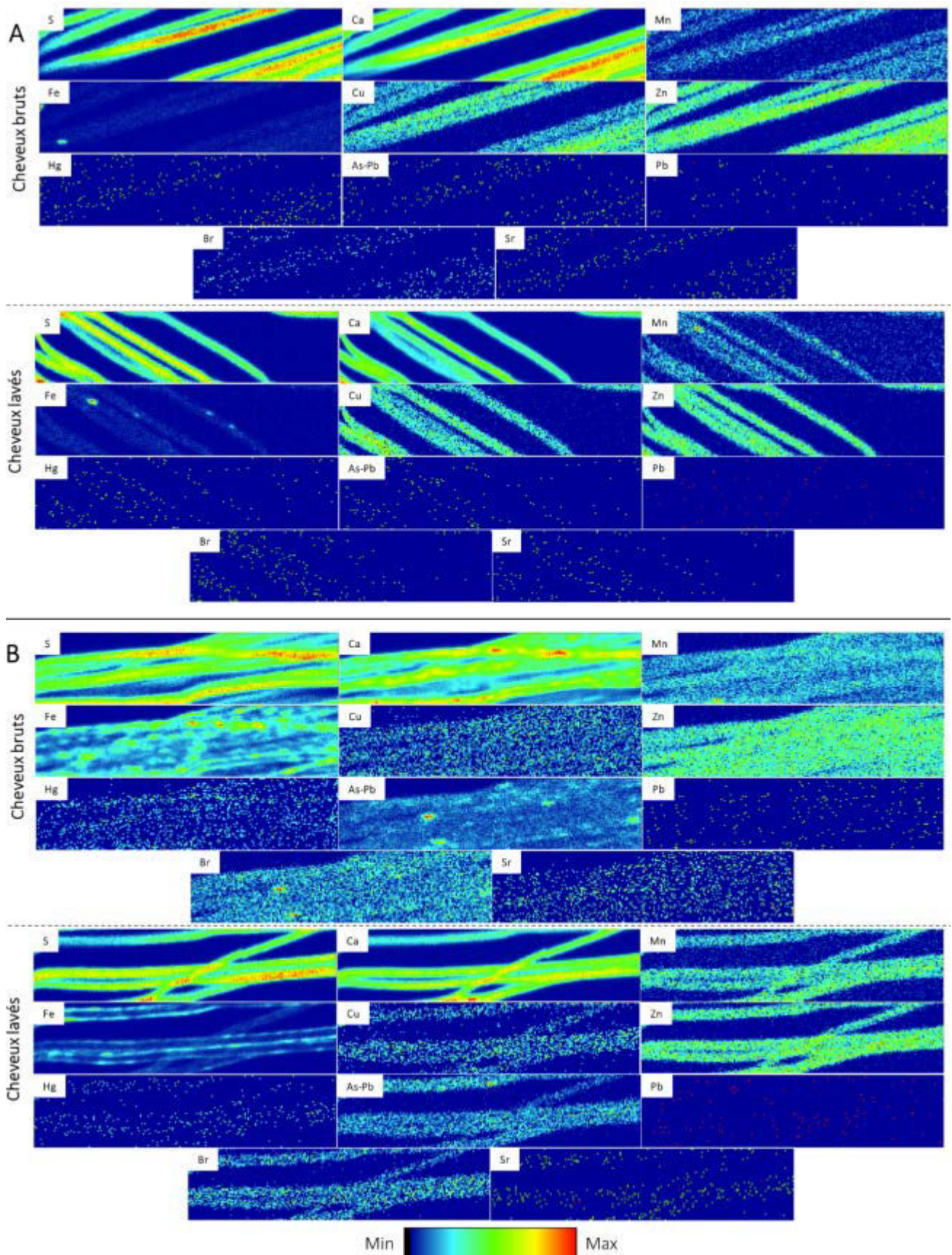


Figure C. 16 – Cartographies PIXE des cheveux modernes chiliens bruts et lavés (A) et des cheveux de la momie PLM7_Cr3c bruts et lavés (B). Energie 3 MeV, courant = 2 nA, faisceau = 30 à 40 μm , filtres : Al 50 μm et Mylar 100 μm , zone analysée = 2000 x 500 μm , pixels = 10 x 10 μm .

▣ Contributions principalement exogènes

Les analyses PIXE ont montré la présence pour les cheveux archéologiques d'éléments très probablement issus du sol dans lequel étaient conservées les momies, tels que Cl, K, P, Ti et Pb. En effet, ceux-ci ne sont plus détectés pour la plupart des échantillons anciens lavés (Figure C.20.B), ce qui semble mettre en avant leur présence principalement à la surface de l'échantillon, favorisant ainsi leur élimination au cours du lavage. Cette observation est cohérente avec les résultats obtenus pour les analyses préliminaires des échantillons – images SEM des cheveux bruts, microanalyse élémentaire et spectroscopie XRF (cf. Parties 1.2.1 et 4.2).

▣ Contributions mixtes

Les résultats mettent en évidence la présence de métaux lourds déjà détectés lors des analyses préliminaires, tels que As, Pb, Hg, Mn et Fe, dans les échantillons archéologiques. Dans la majorité des cas, ces composés métalliques sont détectés dans les cheveux de momies avant et après leur nettoyage, en quantités significatives par rapport aux cheveux modernes (plus de 300 ng/cm² dans le cas de Fe et plus de 5 et 10 ppm pour As et Pb), ce qui suggérerait une contribution en partie endogène.

Notamment, les cartographies de Mn obtenues pour les 7 échantillons analysés, bruts ou lavés, montrent une répartition globalement homogène de Mn à l'intérieur de la fibre. Cette observation est en corrélation avec une incorporation de ce métal de manière régulière, *via* l'alimentation par exemple ou du fait d'une exposition au manganèse au cours des rites funéraires, l'oxyde de manganèse étant en effet l'un des principaux pigments utilisés pour la confection des momies²⁸⁴.

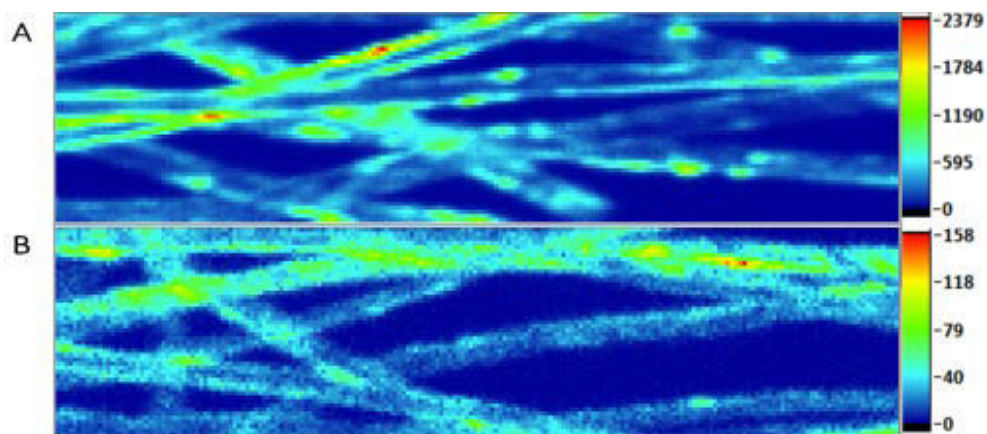


Figure C. 17 – Cartographies élémentaires PIXE du Fe des cheveux de la momie PLM7_T305 : (A) Cheveux bruts et (B) Cheveux lavés. Energie 3 MeV, courant = 2 nA, faisceau = 30 à 40 µm, filtres : Al 50 µm et Mylar 100 µm, zone analysée = 2000 x 500 µm, pixels = 10 x 10 µm.

En revanche, l'observation des cartographies de Fe pour les différents échantillons archéologiques montrent une répartition plus ou moins homogène, principalement à la surface des fibres (Figure C.22). Le cas de la momie PLM7_T305 dont les cheveux ont été teints en rouge, probablement par de l'hématite – pigment rouge à base de fer, illustre parfaitement cette observation. Les cartographies du fer de l'échantillon brut et nettoyé montrent effectivement une localisation majoritaire de Fe à la surface de la fibre, de manière homogène et avec une concentration plus de 20 fois plus faible après le lavage, bien que toujours importante (1 208 ng/cm² contre 26 452 ng/cm² avant lavage – Tableau C.5).

L'interprétation des spectres PIXE seuls aurait conduit à une forte présomption d'origine principalement endogène pour la présence de Fe dans les cheveux de momies, compte tenu de la présence de Fe dans les cheveux nettoyés. L'étude des cartographies cependant permet ici, soit de mettre en doute ces conclusions, soit de formuler de nouvelles hypothèses permettant de les compléter. Dans le premier cas, la localisation du fer à la surface des fibres tendrait plutôt à démontrer une contribution d'une source exogène, tels que le sol, ou des traitements capillaires prodigués au cours de la vie de l'individu concerné ou au cours des rites funéraires. Dans le second cas, si cette contribution est bien d'origine endogène, cela signifierait que Fe a migré au cours du temps de l'intérieur de la fibre vers sa surface.

D'autres métaux lourds particulièrement toxiques, qui nous intéressent plus spécifiquement dans cette étude, ont aussi été détectés dans certains échantillons, avant et après le lavage des cheveux : As, Pb et Hg.

Hg semble principalement provenir d'une source exogène, comme le suggère sa distribution à la surface des cheveux de PLM7_T305 et de QUI7_T13 notamment, avec une forte diminution, voire une disparition du signal dans les cheveux lavés (Tableau C.5). Sa présence à la surface des cheveux de PLM7_T305 permet d'émettre l'hypothèse d'une certaine proportion de pigment rouge à base de mercure, probablement du cinabre^a, qui aurait pu être ajoutée au pigment de fer.

Pb, bien que détecté également après le lavage dans quelques échantillons, semblent également provenir d'une source exogène, comme des sédiments du sol environnant ou des pigments ajoutés à la coloration, à l'image des observations faites pour le mercure sur les cheveux de PLM7_T305.

Enfin, As a été détecté pour trois échantillons de cheveux de momies, bruts et lavés : PLM7_Cr3c, PLM7_T119 et CAM15D_C19. Dans le cas de la momie PLM7_Cr3c notamment (Figure C.20.A – Spectres 2 – et Figure C.21.B), As est clairement réparti de manière homogène à l'intérieur des fibres capillaires, que ce soit pour l'échantillon brut ou lavé. De plus, dans le cas des cheveux bruts, la

^a Le cinabre, aussi appelé vermillon, est un minéral rouge de formule chimique HgS courant dans la nature.

cartographie de As permet de visualiser une contribution supplémentaire exogène, localisée sur des spots discrets. Cette hypothèse d'une contribution mixte exogène et endogène est cohérente avec la quantité estimée de As qui passe de plus de 1 500 ng/cm² dans les cheveux bruts, à environ 90 ng/cm² après le lavage (Tableau C.5). La Figure C.23 montre notamment à l'aide d'une superposition de cartes élémentaires, la localisation nette de As à l'intérieur de la fibre et de Fe à la surface. Ces observations sont en corrélation avec celles effectuées au cours des analyses préliminaires par SEM-EDS et XRF, ainsi qu'avec la présence d'As dans l'environnement chilien.

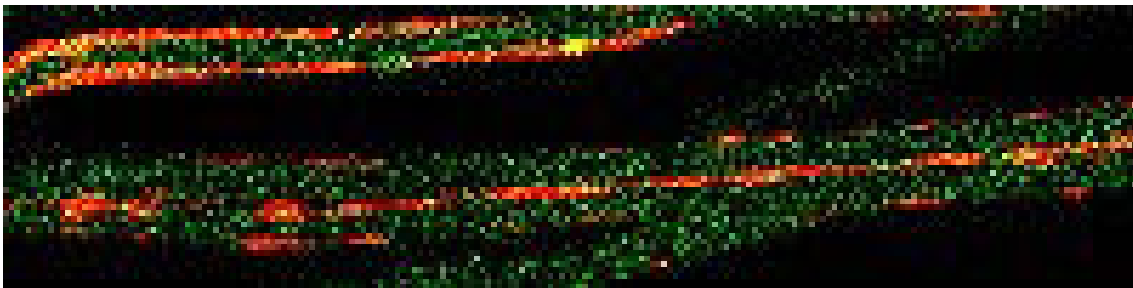


Figure C. 18 – Cartographies combinées de As (vert) et Fe (rouge) des cheveux de la momie PLM7_Cr3c après lavage.

4.4. Apports complémentaires de la spectrométrie de masse aux analyses élémentaires

4.4.1. Impact des analyses par faisceau d'ions sur la conservation moléculaire des cheveux

Les analyses par rayonnements ionisants, sur accélérateur ou synchrotron, sont de plus en plus répandues pour l'étude des matériaux du patrimoine culturel et historique, et sont généralement désignées comme étant non destructrices. Malgré les énergies importantes appliquées pour les analyses, permettant au faisceau de traverser l'échantillon sans s'y arrêter, les particules chargées peuvent malgré tout déclencher des processus d'altération du matériau²⁸⁵. Les modifications qui en résultent peuvent biaiser les résultats d'analyses ultérieures, dans le cas d'un même échantillon analysé par plusieurs techniques, sans que l'opérateur n'en soit forcément conscient. En effet, les altérations macroscopiques (jaunissement, friabilité accrue, etc.) traduisent principalement des modifications moléculaires, qui peuvent parfois apparaître après un certain délai.

L'impact de l'analyse sur un échantillon dépend généralement de l'irradiation subie, de la nature de l'échantillon et de certains facteurs environnementaux, qui auraient pu fragiliser le matériau étudié. Ainsi, les matériaux bio-organiques, tels que le cuir, le bois ou encore les matériaux kératinisés comme les cheveux, sont particulièrement sujets aux altérations moléculaires, et notamment les protéines,

qui peuvent subir des oxydations, des déamidations, des racémisations d'acides aminés ou encore des coupures de liaisons covalentes^{285,286}.

Cette partie s'intéresse donc aux observations effectuées sur les échantillons de cheveux modernes et anciens à la suite des analyses PIXE, d'un point de vue macroscopique et moléculaire, dans le but de déterminer l'impact de cette technique sur ces biomatériaux.

Pour cela, nous nous sommes focalisés sur trois échantillons : les cheveux modernes chiliens, les cheveux de la momie PLM7_T305 et les cheveux de la momie PLM7_T119, qui ont permis la mise en place de notre approche protéomique finale, et pour lesquels nous disposons d'une quantité de données de comparaison importante.

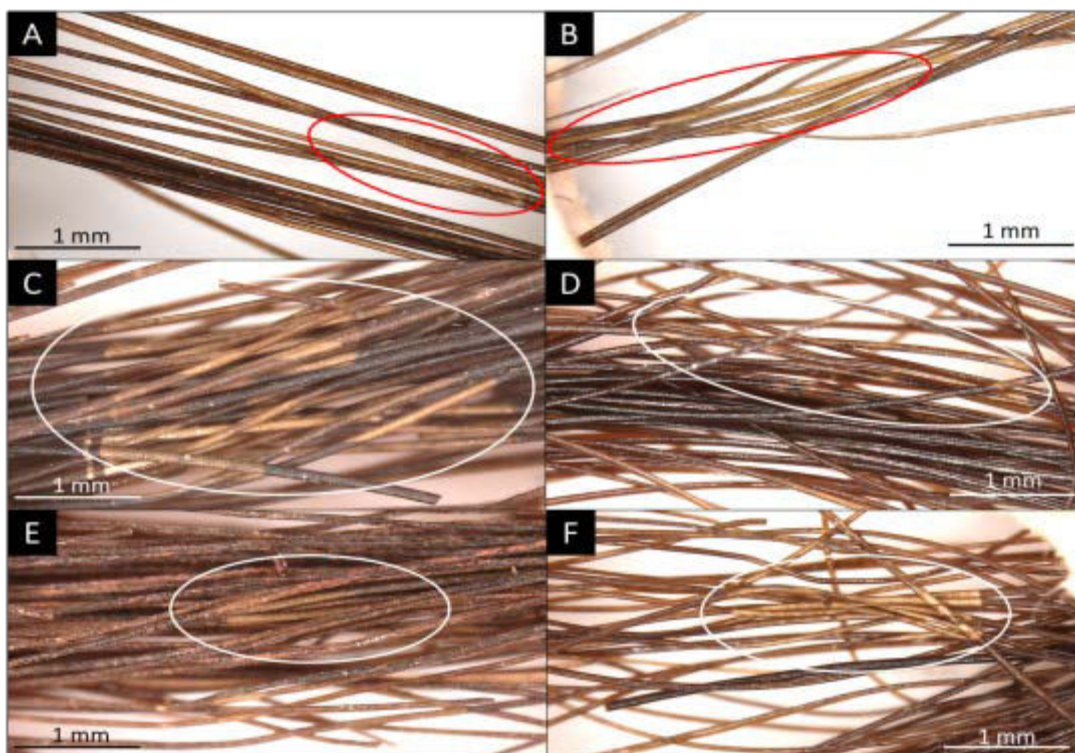


Figure C. 19 – Jaunissement observé à la loupe binoculaire des cheveux modernes chiliens bruts (A) et lavés (B), des cheveux de la momie PLM7_T119 bruts (C) et lavés (D) et des cheveux de la momie PLM7_T305 (E) et lavés (F) après les analyses PIXE.

▮ Observations macroscopiques

Au cours des acquisitions PIXE, ou moins d'une dizaine de minutes après, un jaunissement de la zone analysée a été observé sur la quasi-totalité des échantillons bruts ou lavés (Figure C.24).

Une première hypothèse était d'attribuer ce changement de couleur à une modification moléculaire des mélanines. D'après les travaux de Moini et ses collaborateurs sur les conséquences de l'irradiation par rayons X de divers biomatériaux et de cristaux de cystine²⁸⁶, une seconde hypothèse peut être faite. Dans ces travaux, Moini montre le jaunissement progressif, puis le brunissement, de composés ne comportant pas de mélanines et étant incolores, ce qui suggère une contribution non négligeable

de modifications moléculaires des protéines ou des acides aminés les constituant pour ce changement de couleur.

▣ Analyse protéomique et modifications moléculaires

Afin d'étudier plus en profondeur les effets au niveau moléculaire de l'analyse par faisceau d'ions, l'approche protéomique mise en place au cours de ces travaux a été appliquée aux 3 échantillons de cheveux lavés mentionnés dans cette partie, 2 mois après leur analyse par imagerie PIXE.

Pour cela, les zones des échantillons présentant un jaunissement des fibres ont été prélevées et soumises au protocole d'extraction-digestion des protéines capillaires. Les digests dessalés ont finalement été analysés par nanoLC-ESI-TripleTOF-MS/MS. L'identification et la caractérisation des protéines des échantillons analysés après imagerie PIXE ont montré des comportements différents selon l'échantillon.

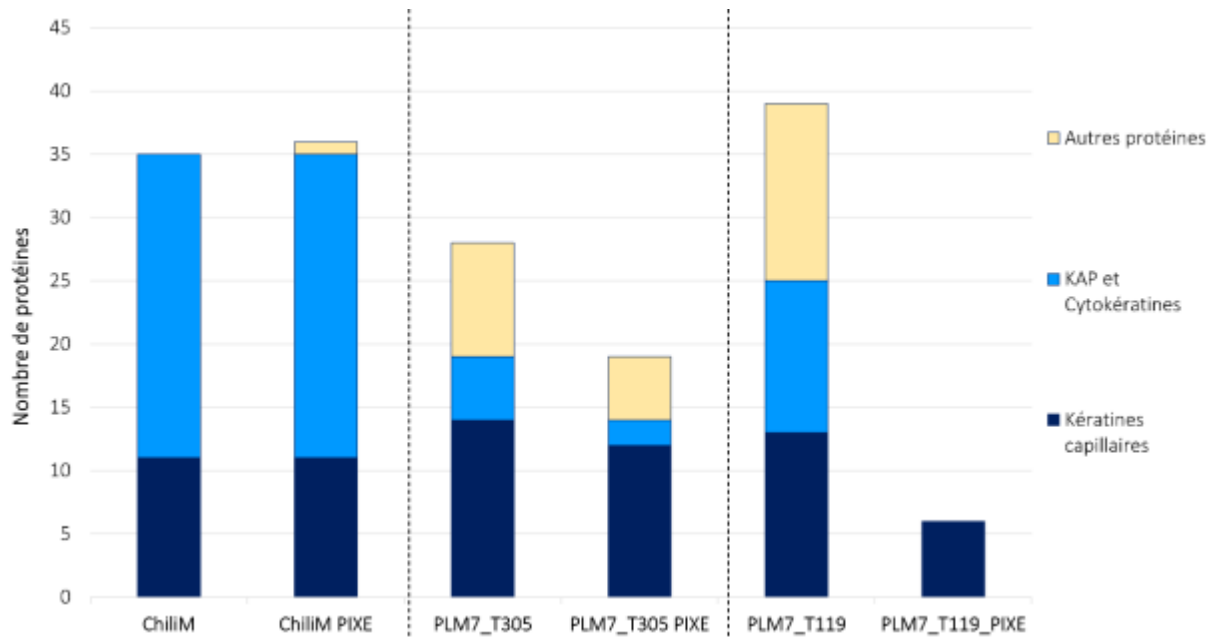


Figure C. 20 – Nombres de protéines identifiées pour le contrôle moderne chilien sans analyse PIXE et après analyse PIXE, et pour les 2 échantillons archéologiques sans analyse PIXE et après analyse PIXE. Répartitions des protéines identifiées par types de protéines.

Cheveux modernes chiliens (ChiliM)

Le nombre de protéines capillaires identifiées dans le contrôle chilien, ainsi que la répartition de celles-ci selon le type de protéines, sont similaires aux résultats obtenus pour les cheveux n'ayant pas été analysés par faisceau d'ions (Figure C.25). De ce point de vue, la méthode appliquée ne semble pas avoir eu d'effet significatif sur la composition protéique de l'échantillon moderne. Les taux de recouvrements de séquence pour ce témoin sont cependant nettement plus élevés que dans le cas de

l'échantillon sans analyse PIXE, et notamment dans le cas des 6 kératines capillaires majoritaires : K31, K33a, K33b, K34, K85 et K86 (Tableau C.6). Cette observation pourrait être en corrélation avec des ruptures de liaisons covalentes induites par l'irradiation, telles que les ponts disulfures, ce qui fragiliserait la cohésion des structures protéiques et faciliterait l'extraction des protéines.

L'étude des PTMs (Figure C.26) a mis en évidence une augmentation des pourcentages de peptides modifiés (hors PTMs induites par le traitement, cf. Partie 3.2.3) et de sites de déamidation (NQ) modifiés, ce qui suggère bien une modification moléculaire des protéines capillaires par les analyses PIXE.

Tableau C. 6 – Résultats d'identification et recouvrements de séquences des kératines capillaires pour les digests de contrôle moderne chilien sans analyse PIXE et après analyse PIXE, et pour les 2 échantillons de cheveux de momies sans et après analyse PIXE.

	Type I											Type II						
	K31	K32	K33a	K33b	K34	K35	K36	K37	K38	K39	K40	K80	K81	K82	K83	K84	K85	K86
ChilIM	52.4%	29.7%	59.4%	56.4%	37.6%	31.0%	15.6%						42.8%		52.7%		56.2%	59.9%
ChilIM PIXE	83.7%	32.1%	80.0%	67.8%	56.7%	45.1%	22.3%						61.8%		72.4%		62.9%	74.9%
PLM7_T305	85.3%	62.7%	98.0%	90.6%	84.6%	65.7%	42.4%	37.2%	47.1%	50.9%			83.2%		88.2%		91.5%	96.7%
PLM7_T305 PIXE	91.3%	51.1%	89.9%	88.9%	62.6%	56.7%	49.9%				15.1%		76.8%		81.1%		91.1%	95.3%
PLM7_T119	99.8%	65.8%	90.6%	90.3%	84.6%	63.3%		39.4%		40.3%			84.2%	42.9%	86.6%		97.8%	100.0%
PLM7_T119 PIXE	40.6%		39.9%	40.8%	22.2%												25.0%	22.6%

Cheveux archéologiques PLM7_T119

Le nombre de protéines identifiées pour l'échantillon après l'analyse PIXE est nettement plus faible que pour l'échantillon n'ayant pas été irradié, avec 6 protéines identifiées contre presque 40 sans irradiation (Figure C.25). Ces 6 protéines correspondent aux 6 kératines majoritaires identifiées dans tous les échantillons analysés avec les plus hauts taux de recouvrement. Dans le cas des cheveux irradiés de PLM7_T119, les recouvrements de séquence obtenus pour ces 6 protéines sont nettement plus bas, entre 20 et 40 %, que pour l'échantillon non irradié – recouvrements supérieurs à 85 % (Tableau C.6).

De même que pour les cheveux modernes, le pourcentage de peptides modifiés et de site déamidés ont augmenté après irradiation (Figure C.26). De plus, l'étude plus détaillée des pourcentages de glutamines et asparagines déamidées a mis en évidence une augmentation de la séparation entre les kératines capillaires de type-I et les kératines de type-II. Avant irradiation, les kératines de type-I possèdent entre 50 et 60 % de sites déamidés, et les kératines de type-II, entre 25 et 30 %, soit un écart minimum d'environ 20 %. Après irradiation, cet écart minimum est de 30 %, avec 80 à 95 % de sites déamidés pour les kératines de type-I et 35 à 50 % de sites déamidés pour les kératines de type-

II. Ce phénomène montre une fois de plus que les kératines de type-I sont préférentiellement altérées par rapport aux kératines de type-II.

Ces résultats mettent donc bien en évidence une modification moléculaire des cheveux par irradiation au cours des analyses PIXE. De plus, compte tenu des différences existant entre l'altération des cheveux modernes et des cheveux de PLM7_T119 irradiés, ces observations montrent l'influence de l'état de conservation moléculaire initial sur la résistance de l'échantillon à l'irradiation.

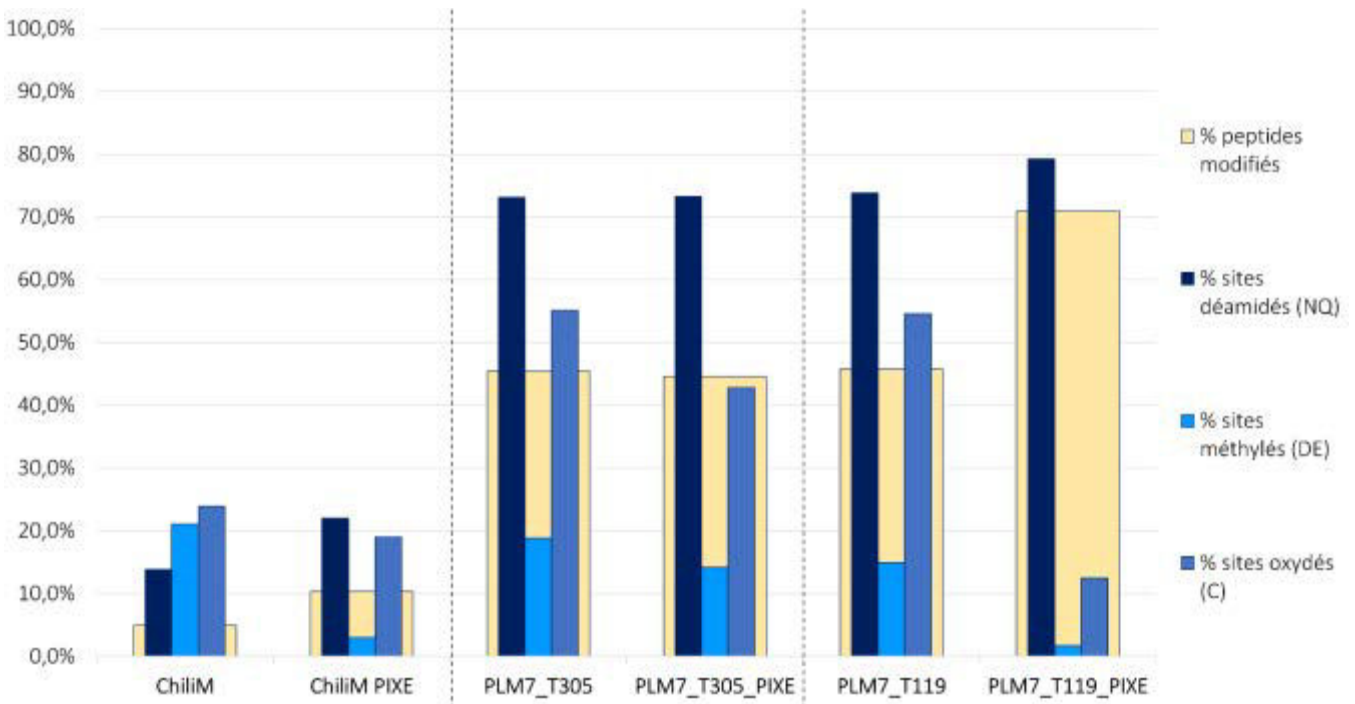


Figure C. 21 – Pourcentages moyens d'apparition des principales PTMs recherchées et pourcentage moyen de peptides modifiés, hors PTMs induites par le traitement (carbamidométhylation (C) et carbamylation (N-term)), pour le contrôle moderne chilien et les 2 échantillons archéologiques, sans irradiation et après irradiation.

Cheveux archéologiques PLM7_T305

Contrairement aux cheveux de la momie PLM7_T119, ceux de PLM7_T305 ne semblent que peu impactés par les analyses par faisceau d'ions. Le nombre de protéines a diminué de plus de 25 protéines sans irradiation, à moins de 20 protéines après irradiation (Figure C.25), mais les pertes se manifestent principalement par une diminution de moitié du nombre de protéines minoritaires identifiées. L'identification des kératines capillaires est quant à elle similaire entre les échantillons non irradié et irradié, avec seulement deux kératines capillaires d'identifiées en moins, dont K37, qui n'est que peu exprimée dans les cheveux. De plus, les taux de recouvrements obtenus sont très similaires, avec seulement de légères diminutions du recouvrement pour K33a et K34 (Tableau C.6). L'étude des modifications n'a quant à elle montré aucune différence significative entre les cheveux non irradiés et les cheveux irradiés (Figure C.26).

Les différences de comportement observées entre les cheveux de PLM7_T305 et ceux de PLM7_T119 vis-à-vis de l'irradiation pourraient s'expliquer par la présence d'importantes quantités de Fe à la surface des cheveux de PLM7_T305 (cf. Parties 4.3.1, 4.3.2. et Figure C.22) qui protégerait l'échantillon²⁴⁰. Cette hypothèse est cohérente avec les observations effectuées dans la Partie 3, au cours de l'étude des PTMs (Partie 3.2.3. « *Proportion de peptides modifiés* », Figure C.14), qui semblait mettre en évidence une meilleure conservation moléculaire de PLM7_T305, par rapport aux autres échantillons du corpus.

4.4.2. Détection des métaux lourds par spectrométrie de masse

L'étude de la présence de métaux lourds, et plus particulièrement de As dans les cheveux, aussi bien archéologiques que modernes, a fait l'objet d'un grand nombre de travaux de recherche^{4,216,217,283,287}. Parmi ces travaux, certaines conclusions concernant la contribution d'une source exogène ou endogène pour la présence d'arsenic font débat. En effet, pour beaucoup de chercheurs, la présence d'As à l'intérieur de la fibre, et non près de la surface, ne serait pas une preuve d'une contribution endogène, et inversement. En revanche, la recherche de métabolites de l'arsenic constituerait une méthode pouvant aider à discriminer l'arsenic endogène de l'arsenic exogène, puisque sans absorption par l'organisme, As ne serait pas métabolisé.

▣ Etude pilote de la détection des interactions As-protéine sur une protéine modèle

Dans le cadre de la stratégie protéomique appliquée ici au corpus de cheveux archéologiques, l'analyse des digests peptidiques, et notamment l'étude des PTMs, pourrait apporter des réponses à cette problématique. En recherchant spécifiquement les différences de masse pour les peptides détectés qui correspondraient à une addition d'arsenic ou d'un de ses métabolites – arsenic méthylé ou arsenic diméthylé, il pourrait ainsi être possible de démontrer la contribution d'une source endogène de As.

Cependant, il faut vérifier au préalable si les interactions arsenic-protéine – interactions covalentes – ne sont pas impactées par la préparation de l'échantillon pour les analyses nanoLC-ESI-MS/MS, et si elles le sont, si la présence d'As a malgré tout laissé une « empreinte » sur la protéine. Pour cela, une étude sur une protéine modèle se liant à As – la métallothionéine (MT) – a été menée.

Après incubation de la MT dans une solution à base d'arsenic²²², afin d'obtenir la protéine arsénée MT-As_x (x = 1 à 6), celle-ci a été analysée par ESI-MS/MS sur un spectromètre de masse équipé d'un piège à ions (IT – *Ion Trap*), afin de s'assurer de l'obtention de la protéine arsénée. La MT-As_x a ensuite été engagée dans le protocole mis au point dans la Partie 2 de ce chapitre, puis le digest

obtenu a été analysé par ESI-IT-MS/MS. Les résultats obtenus pour cette première expérience n'ont cependant pas été concluants, concernant la synthèse de la MT arsénée et par conséquent l'obtention de peptides arséniés.

▣ Perspectives

L'expérience mentionnée précédemment devra être répétée avec une protéine arsénée déjà synthétisée, afin de ne pas induire de biais, et les analyses devront être effectuées sur un spectromètre de masse permettant les analyses MS/MS, sans *cut-off* qui empêcherait la détection de peptides modifiés d'intérêt, contrairement à la trappe ionique (*cut-off* correspondant au rapport m/z du pic sélectionné pour la MS/MS, divisé par 3,5).

De plus, deux problèmes supplémentaires se posent.

- i) D'une part, sachant que As peut se lier à trois cystéines et l'arsenic méthylé à deux, si les interactions As-protéine sont maintenues, les peptides obtenus pourraient être trop complexes pour pouvoir être identifiés comme appartenant à une protéine de l'échantillon.
- ii) D'autre part, s'il est vraiment possible de détecter l'arsenic lié aux protéines par notre approche protéomique, est-ce toujours le cas lorsque l'on considère les faibles concentrations en As pouvant être présentes dans les échantillons archéologiques étudiés ?

Cette partie du projet concernant la détection de As dans les digests peptidiques reste donc à approfondir. Si les résultats futurs obtenus pour As sont concluants, l'étude pourrait être élargie aux autres métaux lourds présentant un mode d'interaction avec les protéines similaire à l'arsenic. Ainsi, cela pourrait permettre l'identification des protéines capillaires d'un échantillon archéologique, la détection des métaux lourds et l'identification de leur origine en une seule analyse, nécessitant seulement 500 µg de quantité initiale.

4.5. Conclusions pour les analyses élémentaires

Les analyses élémentaires SEM-EDS, XRF et PIXE mises en œuvre dans cette partie ont permis de déterminer la composition élémentaire de 7 échantillons de cheveux archéologiques du corpus : PLM7_T119, PLM7_Cr3c, PLM7_T305, PLM7_T107, PLM7_T81, QUI7_T13 et CAM15D_C19, et de la comparer à celle d'un témoin moderne, à savoir des cheveux d'une femme chilienne vivant dans la région d'intérêt.

Parmi eux, les éléments majoritaires et les éléments traces classiquement présents dans les cheveux ont bien été retrouvés, de façon similaire aux cheveux modernes. Egalement, un certain nombre d'éléments ont été mis en évidence dans les cheveux archéologiques bruts seulement et semblent ainsi être d'origine exogène – sol d'inhumation des momies notamment. La présence systématique de quantités significatives de Br a également été mise en évidence même après le lavage, ce qui serait indicatif de l'influence marine dans l'alimentation et le mode de vie des civilisations anciennes. De plus, des éléments métalliques ont été détectés dans une grande partie des cheveux archéologiques en quantités anormalement élevées pour des cheveux sains, ce qui est cohérent avec la pollution en métaux lourds des eaux et des sols de la région.

Un signal important de Fe a notamment été détecté pour tous les échantillons archéologiques bruts et lavés. Les cartographies élémentaires SEM-EDS et PIXE de Fe dans les différents échantillons ont permis de localiser la majeure partie de cet élément à la surface des cheveux, ce qui permet de penser à une source exogène importante, à l'image d'un pigment rouge probablement à base de Fe sur les cheveux de PLM7_T305.

Enfin, quatre échantillons contiennent de l'arsenic, et plus particulièrement, un signal intense est observé pour les cheveux de la momie PLM7_Cr3c avant et après le lavage des cheveux. De plus, les cartographies de As pour cet échantillon montrent une répartition homogène de As à l'intérieur des fibres, ce qui est cohérent avec une source endogène et donc avec l'hypothèse d'une exposition importante à l'As.

Des analyses par LA-ICP-MS pourrait permettre la détection et la quantification de composés présents à l'état d'ultra-traces dans un seul cheveu, ce qui donnerait également accès à un suivi temporel de l'exposition d'un individu à différents éléments, grâce à une analyse depuis le bulbe jusqu'à la pointe de la fibre.

Les échantillons de cheveux analysés par imagerie PIXE ont montré des signes d'altération quelques minutes après l'irradiation – jaunissement de la fibre. Notre approche protéomique appliquée aux cheveux analysés par imagerie PIXE a permis de visualiser des marqueurs d'une dégradation moléculaire des fibres, induite par l'irradiation. Cette altération semble être cependant variable selon le type de l'échantillon, qu'il s'agisse de cheveux modernes ou archéologiques, ou encore de cheveux ayant subi un traitement particulier au cours des rites funéraires notamment, à l'image des cheveux de PLM7_T305 qui semblent être protégés par la présence de Fe.

De plus, des premiers tests développés dans cette partie ont eu pour objectif d'étudier la possibilité de détecter la présence d'As et de ses métabolites dans les digests de cheveux par les analyses MS/MS. Les premiers résultats n'ont cependant pas été concluants et l'étude doit être approfondie.

5. Conclusions

Cette partie des travaux de recherche a permis la mise en place d'une approche interdisciplinaire pour la caractérisation de cheveux de momies, basée sur des observations microscopiques, des analyses structurales, élémentaires et moléculaires.

Il s'agissait ainsi d'étudier l'état de préservation et l'influence de l'environnement sur des cheveux de momies de la région d'Arica-Parinacota, au nord du Chili. Ces cheveux archéologiques, datés des périodes Archaique à pré-Inca (Intermédiaire Tardif) entre 2 800 av. J.-C. et 1 300 ap. J.-C., avait montré un bon état de conservation visuel et structurel de la surface des fibres, et la question s'est posée de savoir si cette bonne préservation était toujours valable à l'intérieur de la fibre, au niveau des molécules capillaires.

Pour cela, une stratégie protéomique *bottom-up* a été mise en place, permettant l'extraction et la digestion des protéines des cheveux anciens à partir de seulement 500 µg d'échantillon. Cette approche, basée sur des analyses par nanoLC-ESI-TripleTOF-MS/MS des digests capillaires a permis, non seulement d'identifier les protéines majoritaires des cheveux de momies avec des hauts scores et des pourcentages de recouvrement supérieurs à 50 %, mais aussi d'aller plus loin dans la caractérisation de ces protéines grâce à l'étude des PTMs. A partir de cette caractérisation, nous avons pu mettre en évidence l'existence de premiers marqueurs de dégradation moléculaire des cheveux de momies, tels que l'augmentation du pourcentage de peptides modifiés pour une kératine, et l'augmentation des pourcentages de glutamines et asparagines déamidées, ou de cystéines oxydées (mono-, di- et trioxydations). De plus, cette stratégie a permis d'émettre des hypothèses quant à différentes voies de dégradation de la fibre capillaire.

Cet état de conservation moléculaire peut être fortement influencé par l'environnement des matériaux d'intérêt, c'est pourquoi, en parallèle de la mise en place de l'approche protéomique, des analyses élémentaires par SEM-EDS, spectroscopie XRF et imagerie PIXE ont été mises en œuvre. Celles-ci ont permis plus particulièrement de détecter la présence de métaux lourds, tels que As, Pb ou Fe, issus de l'environnement des momies et de suggérer une origine probable pour ces éléments (exogène ou endogène). Ces observations constituent des données de référence pour l'application des techniques de spectrométrie de masse à l'étude de la présence des métaux lourds dans les cheveux archéologiques, et de leurs interactions avec les protéines capillaires.

Les analyses protéomiques des échantillons de cheveux irradiés par les analyses PIXE ont montré que cette méthode, dite non-destructive, n'est pas sans effet sur la conservation moléculaire des échantillons biologiques. Les résultats ont de plus montré des différences de comportement des

échantillons testés face à l'irradiation, ce qui pourrait être dû à des différences de traitement funéraire. Sur ce point, il n'y a pas eu assez d'échantillons analysés pour pouvoir réellement en tirer des conclusions quant à l'influence de tel ou tel traitement funéraire sur l'état de conservation des cheveux.

Les travaux présentés ici constituent donc des débuts prometteurs ayant permis pour la première fois de mettre en évidence des indicateurs moléculaires de dégradation des cheveux archéologiques grâce à la caractérisation élémentaire et moléculaire. Ces résultats offrent de nouvelles perspectives dans la recherche de biomarqueurs de dégradation des protéines, spécifiques au contexte archéologique, et dans l'étude des voies de dégradations des cheveux, qui sont désormais à approfondir.

Chapitre D

-

Etude de systèmes complexes

précieux :

Développement du couplage TLC-
MALDI-MS

Comme détaillé en introduction bibliographique, le couplage direct TLC-MALDI-MS a vu le jour dans les années 1990 et a fait depuis l'objet de nombreux travaux de recherche, majoritairement axés sur l'étude de systèmes peu complexes, composés d'analytes de natures similaires (structure, polarité, masse moléculaire, etc.). Ces travaux ont tout d'abord été dévolus aux peptides (800-1 300 Da) et petites protéines (3 000-19 000 Da)^{89,90}, puis aux composés pharmaceutiques et autres petites molécules organiques (500 Da)^{118,122}, aux lipides et phospholipides (300-1 500 Da)¹⁰², et plus récemment, aux dendrimères (500-2 000 Da)¹⁰⁶.

L'approche développée dans ce chapitre est cependant différente de ces études. En effet, le challenge analytique de cette partie des travaux de recherche a été d'appliquer le couplage direct TLC-MALDI-MS à des systèmes complexes présentant des composés de nature différente, ainsi que de tester les limites de cette technique, notamment en terme de quantité d'échantillon à mettre en jeu. Le développement a été mis en place spécifiquement pour des systèmes complexes pour lesquels il existe un questionnement réel et un besoin de caractérisation structurale par spectrométrie de masse important : les archéomatériaux organiques et biologiques. Ces systèmes possèdent une composition chimique extrêmement complexe ayant été modifiée au cours des siècles ou des millénaires par des altérations anthropiques ou environnementales⁸.

L'approche classique pour l'analyse organique de matériaux anciens est la GC-MS, mais celle-ci ne donne accès qu'à une seule classe de composés : les lipides de bas poids moléculaire. Dans cette optique, il est donc intéressant d'utiliser le couplage direct TLC-MALDI-MS pour l'analyse de ces matériaux. Cela permet ainsi d'avoir accès à des composés non analysables en GC-MS qui peuvent tout de même être présents, comme par exemple les lipides de plus haut poids moléculaire, les peptides et les protéines. L'utilisation d'une méthode séparative simplifie également l'interprétation des données MALDI-MS.

Ce chapitre décrit donc :

1. la mise en place au sein du laboratoire du couplage direct chromatographie sur couche mince – spectrométrie de masse par ionisation/désorption laser assistée par une matrice (TLC-MALDI-MS) sur des composés modernes de référence,
2. son implémentation pour l'étude des archéomatériaux organiques et biologiques.

1. Développements méthodologiques

Avant de pouvoir être appliqué aux échantillons archéologiques, le couplage direct TLC-MALDI-MS a nécessité un réel travail de mise en place qui a été réalisé sur des composés de référence modernes de nature chimique différente. Il a fallu résoudre pas à pas les difficultés qui sont apparues, non seulement en ce qui concerne l'optimisation des paramètres de préparation des plaques TLC adaptés au couplage direct avec la MS, mais aussi celle des paramètres instrumentaux pour les analyses MALDI-MS.

1.1. Optimisation du couplage TLC-MALDI-MS en mode « *spotting* »

1.1.1. Choix des composés de références et conditions de dépôt

Le protocole de préparation des plaques TLC en phase normale (cf. Chapitre B – Partie 2.1.3) et les conditions d'analyse ont été mis en place et optimisés sur des composés de référence. Les expériences pour cette optimisation ont été menées en premier lieu avec des dépôts en *spotting*, avant de passer au mode « élution » classique de la TLC (cf. Chapitre B – Partie 2.1.3).

De plus, avant toute analyse par TLC-MALDI-MS, chaque solution de composés de référence a été systématiquement analysée en MALDI-MS sur cible en acier inoxydable (cf. Chapitre B – Partie 2), afin d'une part, de vérifier la préparation des solutions, et d'autre part, afin de pouvoir comparer les résultats obtenus sur cible classique avec ceux obtenus sur TLC.

▣ Molécules organiques de bas poids moléculaire

Pour les composés de bas poids moléculaires analysés en mode réflectron ($m/z < 3\ 000$), trois phospholipides (PL) de référence bien décrits dans la littérature^{128,129,288,289} ont été sélectionnés (Figure D.1.A) : la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE) et la sphingomyéline (SM). Un certain nombre de travaux s'intéressent également à l'analyse d'extrait organique de jaune d'œuf par TLC-MALDI-MS^{102,113}. L'extrait organique de jaune d'œuf étant constitué en majeure partie des phospholipides mentionnés ici (près de 26 % de PC, 3,8 % de PE et 0,6 % de SM²⁹⁰), ces travaux ont permis d'apporter un certain nombre de données de référence sur lesquelles s'appuyer pour l'optimisation du couplage au laboratoire. De plus, leurs poids moléculaires (entre 700 et 900 Da) font de ces composés des références adaptées pour l'étude de certaines molécules organiques de moins de 5 000 Da présentes dans les archéomatériaux, à l'image des acides gras ou des di- et triglycérides. Pour la mise au point, des solutions-mères de phospholipides à 1000 μM ont été préparées (cf. 202

Chapitre B – Partie 2.1.1). Les rapports m/z attendus pour ces références (tirés de la littérature¹⁰²) sont donnés en Annexe 3, Tableau S.3.

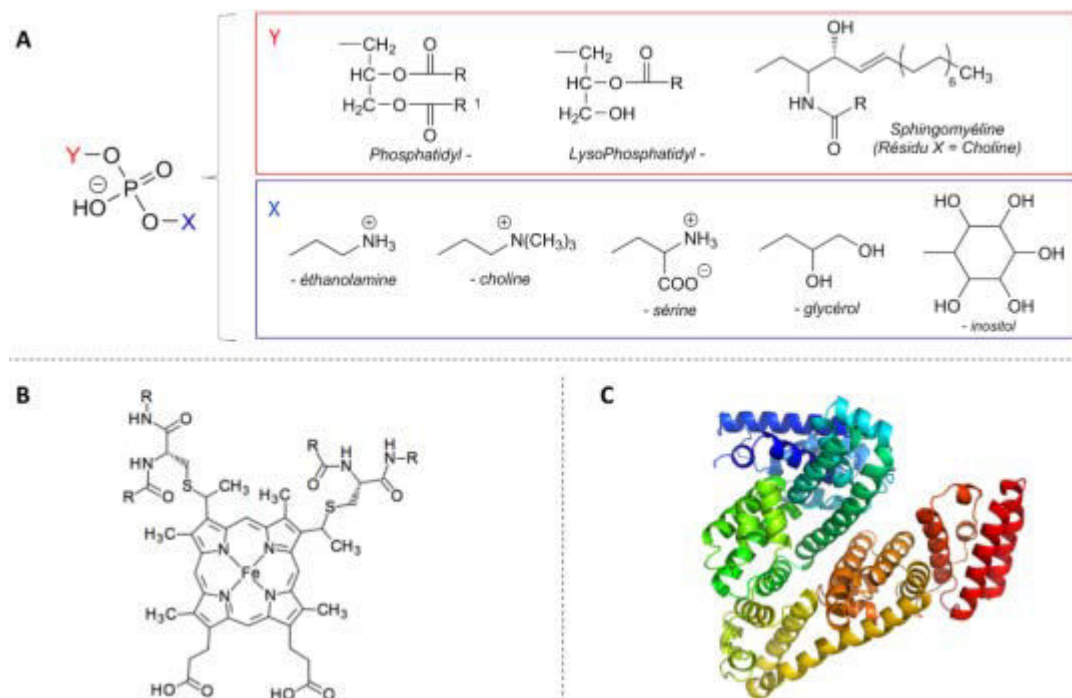


Figure D. 1 – Schémas structurels des composés de référence utilisés pour l’optimisation des paramètres du couplage TLC-MALDI-MS. A : les différentes classes de phospholipides, B : le cytochrome C, et C : l’albumine de sérum bovin (structure tertiaire, Source : Small Angle Scattering Biological Data Bank).

Peptides

Le choix du composé de référence pour l’étude des peptides et petites protéines en mode linéaire (m/z 1 500 à 10 000), s’est tourné vers le digest de cytochrome C bovin (Digest CC - peptides de masses comprises entre 600 et 2 500 Da, Figure D.1.B – cf. masses monoisotopiques théoriques d’intérêt en Annexe 3, Tableau S.4). Ce digest a été préparé à une concentration de 8 μ M (cf. Chapitre B - Partie 2.1.1).

Protéines entières

Pour l’optimisation des paramètres TLC-MALDI-MS relatifs à l’étude de protéines intactes de haut poids moléculaire à l’aide du détecteur CovalX ($m/z > 10\,000$), l’albumine de sérum bovin (BSA – 66 430 Da, Figure D.1.C) a été sélectionnée. Pour la conduite des expériences d’optimisation, des solutions mères de BSA à 500 μ M ont été préparées (cf. Chapitre B - Partie 2.1.1).

Volume et mode de dépôt des échantillons

Afin de pouvoir choisir le volume d’échantillon déposé le plus adapté pour une analyse sur un minimum de matière, les tests réalisés en *spotting* pour le choix de la matrice et de son mode de

dépôt, ainsi que pour la mise au point des paramètres d'analyse en MS, ont été mis en œuvre sur plusieurs volumes, à savoir 2,5, 5, 10 ou 15 μL d'échantillon. Les volumes optimisés seront déterminés dans la suite de ce chapitre.

Egalement, s'est posée la question de la méthode de dépôt. L'échantillon doit-il être déposé en une ou en plusieurs fois? Le dépôt doit-il être concentré sur un petit spot ou réalisé sur une ligne d'environ 1 cm par la méthode du « pinceau », une pipette pasteur à l'intérieur de laquelle est insérée une boule de coton constituant le pinceau. (Figure D.2)

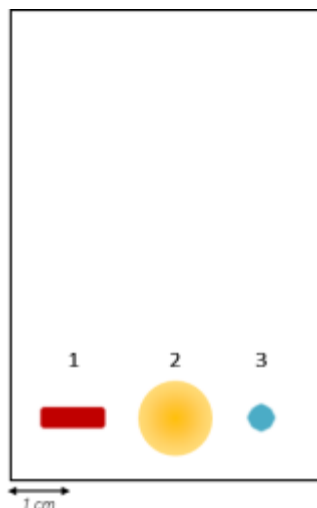


Figure D. 2 – Modes de dépôts envisagés pour la préparation des plaques TLC. 1 : Dépôt au pinceau sur une bande de 1 cm ; 2 : Dépôt sur un spot en une seule fois ; 3 : Dépôt sur un spot en plusieurs fois (succession d'ajouts de 2,5 μL de la solution d'intérêt et de temps de séchage).

Le choix final s'est porté sur un dépôt permettant de concentrer les analytes sur un spot de taille minimale, dans le but de minimiser les quantités déposées. Dans cette optique, il a été choisi d'effectuer plusieurs ajouts successifs de 2 μL à l'aide d'une micropipette, en laissant la solution d'intérêt pénétrer complètement dans la phase stationnaire entre chaque dépôt, jusqu'à atteindre le volume souhaité, dans le but de limiter la taille du dépôt et donc la dispersion spatiale des analytes.

1.1.2. Mode de dépôt de la matrice

Avant toute autre étape d'optimisation, les conditions optimales de dépôt de la matrice ont dû être déterminées. Cette étape est cruciale pour permettre l'analyse MALDI-MS directement sur la plaque TLC et l'obtention de spectres MS de bonne qualité, à partir d'une quantité minimum d'échantillon.

▣ Dépôt de la matrice

Comme détaillé dans le Chapitre A, Partie 2.2.2, plusieurs modes de dépôt ont été décrits dans la littérature, tels que i) le dépôt direct sur les spots d'intérêt, ii) l'immersion verticale de la plaque dans une cuve étroite remplie de solution de matrice saturée et iii) la pulvérisation de la matrice sur la plaque.

Dans notre cas, le couplage TLC-MALDI-MS est destiné à une utilisation principalement en mode « élution », dans le but d'analyser de manière continue les lignes de migration des différents échantillons. Le dépôt de la matrice devant donc être réalisé sur la totalité de la plaque, le dépôt direct sur les spots d'intérêt n'est pas applicable ici.

Des tests d'immersion de la plaque dans une solution de matrice ont été réalisés. Comme expliqué dans le Chapitre A, l'immersion de la plaque verticalement dans la solution de matrice présente cependant une faible reproductibilité et homogénéité quant à l'épaisseur de la couche de matrice entre autres. De plus, cela demande des volumes importants de solution de matrice (plus de 10 mL pour une plaque) et favorise la formation de cristaux hétérogènes à la surface de la silice. Cette méthode ne semble donc pas être le mode de dépôt le plus adapté. Des expérimentations d'immersion horizontale, avec une application de la plaque TLC à la surface d'une solution de matrice saturée (phase stationnaire en contact avec la surface de la solution) ont également été mises en œuvre, dans le but de limiter les phénomènes de dispersion spatiales des analytes au cours de l'application de la matrice. Cette approche s'est révélée fastidieuse, avec des résultats relativement similaires à l'immersion verticale.

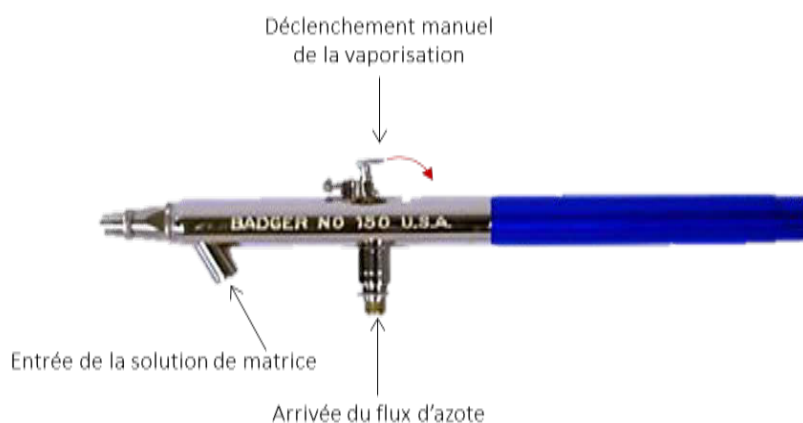


Figure D. 3 – Photo de l'aérographe Badger 150™ choisi pour le dépôt de la matrice.

La pulvérisation de la matrice a donc été choisie comme mode de dépôt final et ce point a fait l'objet de plus amples expériences pour l'optimisation de la mise en œuvre technique. Ne disposant pas au laboratoire des appareils de pulvérisation commerciaux utilisés pour les dépôts de matrice en imagerie MALDI, nous avons testé deux techniques.

La première consistait en l'utilisation d'un vaporisateur de parfum. La mise en œuvre de cette méthode s'est cependant révélée trop lente pour réussir à obtenir un dépôt et une cristallisation homogène de la matrice.

La seconde solution s'appuyait sur l'utilisation de l'aérographe Badger 150™ (Figure D.3), originellement destiné à la réalisation de peintures. La mise en œuvre technique de cette méthode, basée sur la vaporisation semi-automatique de la solution de matrice à l'aide d'une mise sous pression du système via un flux d'azote, s'est révélée extrêmement simple, permettant un dépôt rapide et relativement homogène de la matrice à la surface de la plaque TLC, à partir d'1 mL de solution saturée. Ce volume de 1 mL permet d'assurer un recouvrement complet et relativement uniforme de la phase stationnaire tout en appliquant une couche suffisante de solution de matrice. Cette technique permet également un nettoyage rapide et simple du système, en faisant passer le solvant de rinçage deux à trois fois dans le système, ce qui favorise les changements de solvant ou de matrice à déposer. L'aérographe a donc été choisi pour le dépôt de la matrice.

Les indications techniques fournies par Bruker Daltonics, pour l'application de la matrice recommandent l'application de deux couches de matrice, afin de pouvoir obtenir des spectres interprétables. Par ailleurs, au cours des manipulations, le signal de la matrice après seulement une couche appliquée n'était pas détecté, alors qu'il apparaît clairement pour deux couches déposées. Le choix de l'application de deux couches de matrice sur les plaques TLC a donc été fait.

▣ Séchage de la matrice

A la suite du dépôt de chaque couche de matrice à l'aérographe, une étape de séchage est nécessaire à la cristallisation de la matrice. La matrice déposée ne peut pas être séchée à l'air libre, le processus serait alors trop lent, ce qui favoriserait la formation de gros cristaux hétérogènes et diminuerait les performances de l'analyse.

L'utilisation d'un sèche-cheveux a donc été choisie, avec un mode de séchage à froid, afin de ne pas risquer l'altération de composés thermosensibles et un flux d'air minimum (vitesse 1). Le séchage est réalisé avec la plaque en position horizontale et en déplaçant le sèche-cheveux de manière à obtenir un séchage homogène de la surface avec un flux vertical. Après différents tests, la durée de séchage de chaque couche de matrice a été fixée à 10 minutes, temps pour lequel l'introduction dans le spectromètre se déroule sans problème. En dessous de ces 10 minutes par couche déposée, l'évaporation des solvants n'est pas suffisante. Dans la source, la présence de solvants dans la phase stationnaire empêche le vide d'atteindre la valeur-seuil fixée (10^{-6} – 10^{-7} mbar) sur une durée acceptable, pouvant augmenter considérablement le temps d'introduction de la plaque dans la source du spectromètre, voire l'empêcher.

Même pour un séchage complet de la TLC, il faut noter que le temps nécessaire au spectromètre pour atteindre la valeur définie pour le vide est malgré tout plus long que dans le cas de l'introduction d'une cible en acier inoxydable (10 à 15 minutes contre moins de 5 min).

De plus, il est important d'analyser la plaque préparée immédiatement après le dépôt et le séchage de la matrice, afin de ne pas observer de pertes de sensibilité.

1.1.3. Préparation de la solution de matrice

☞ Choix de la matrice

En premier lieu, le choix de la matrice doit favoriser la détection des différentes classes de composés recherchés. Ceci implique de sélectionner une matrice interférant le moins possible avec les pics des analytes, pour le mode réflectron plus particulièrement. Ainsi, la matrice choisie doit produire peu d'ions dans la source, et générer un signal sur une gamme de m/z idéalement la plus basse et étroite possible, ou tout au moins sur une gamme de m/z différente de celle des analytes recherchés.

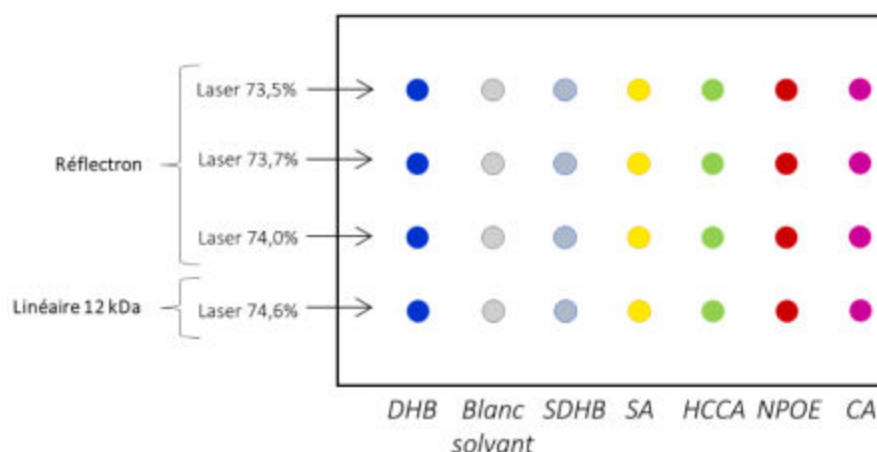


Figure D. 4 – Plaque TLC préparée en mode spotting pour le choix des matrices qui seront utilisées dans le cadre du couplage direct TLC-MALDI-MS. Dépôts de 5 μL (NPOE) et 10 μL (autres matrices); mode d'ionisation positif ; détecteurs réflectron et linéaire.

Des tests préliminaires pour les matrices utilisées couramment au laboratoire dans le cadre des analyses MALDI d'échantillons archéologiques (DHB, SA et DIT) ont montré l'incompatibilité de la matrice DIT avec le couplage TLC-MALDI-MS. Celle-ci produit en effet une couche « vitrifiée » en surface de la plaque lors du séchage, qui ne permet pas l'évaporation des solvants ayant pénétré dans la silice, ce qui empêche le vide de la source d'atteindre la valeur-seuil fixée et provoque l'éjection automatique de la TLC.

Pour choisir la matrice, une plaque TLC a été préparée en *spotting* avec des dépôts de 10 μL des matrices DHB, SDHB (50 mg/mL), SA, HCCA (20 mg/mL) et CA (30 mg/mL) (solubilisation décrite au

Chapitre B, Partie 2.1.3 – Tableau B.2, solvant avec acide fort) et 5 μL de la matrice liquide NPOE. Plusieurs dépôts ont été réalisés pour chacune des matrices de façon à obtenir quatre lignes de dépôts identiques (Figure D.4), afin de tester différentes conditions d'analyse en MS. Plus particulièrement, trois lignes de matrices ont été analysées en utilisant le mode d'ionisation positif et le détecteur réflectron, à 73,5 %, 73,7 % et 74,0 % de la puissance du laser, et la dernière ligne a été analysée à l'aide du mode d'ionisation positif à 74,6 % de la puissance laser et en détection linéaire.

D'après les résultats obtenus (Figure D.5), la NPOE et la DHB sont les matrices qui semblent produire le moins de pics sur les spectres de masse, en particulier pour les m/z supérieurs à 300.

La NPOE a cependant montré un phénomène de « vitrification » similaire à celui observé dans le cas du DIT. La taille du dépôt, limitée à un spot de matrice, n'était pas suffisamment importante pour empêcher l'évaporation des solvants et l'introduction dans le spectromètre de masse. Malgré tout, cette observation semble mettre en évidence l'incompatibilité d'un dépôt de la NPOE sur la surface totale de la plaque avec le couplage. Cette matrice a donc été mise de côté.

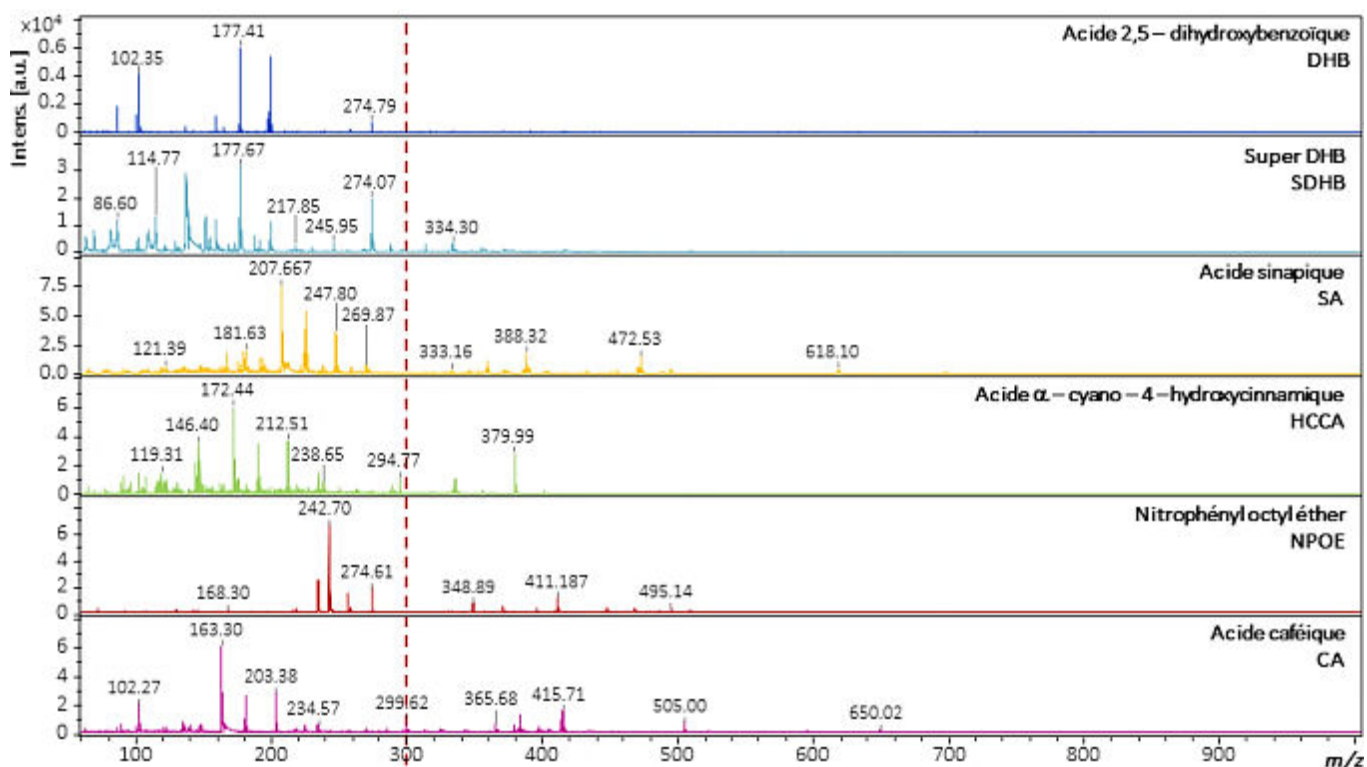


Figure D.5 – Spectres MALDI-MS des matrices déposées sur plaque TLC. Dépôts de 5 μL (NPOE) et 10 μL (autres matrices) ;
Méthode d'analyse RP et 74,0 % de la puissance totale du laser.

La DHB respecte tout à fait les critères demandés pour la matrice, soit un nombre de pics limité et distribué sur une gamme de m/z basse. Notamment, comme indiqué sur la Figure D.5, la majeure partie des ions détectés pour la DHB ont des masses inférieures à 300 Da, masse au-dessus de laquelle est attendue la majorité des petites molécules organiques d'intérêt dans les échantillons qui seront

étudiés. La DHB est donc sélectionnée pour la suite des optimisations de la TLC-MALDI-MS au laboratoire. Ce résultat est en accord avec les travaux décrits dans la littérature qui utilisent majoritairement la DHB pour ce couplage.

Cependant, la DHB n'est pas la matrice la plus adaptée pour l'analyse des peptides et protéines, contrairement à la SA par exemple. Les ions produits dans la source pour cette matrice SA ($m/z < 1\ 000$), n'interféreront pas avec les composés d'intérêt mesurés à l'aide des détecteurs linéaire et CovalX. La SA est donc sélectionnée avec la DHB pour la suite de la mise au point.

▣ Préparation des solutions de matrice

Après avoir choisi les matrices qui seront utilisées dans le cadre du couplage TLC-MALDI-MS et la technique mise en œuvre pour les déposer sur les plaques TLC de manière homogène, il a fallu déterminer les conditions de solubilisation des matrices (concentration et présence ou non de TFA). Pour cet aspect, différentes concentrations de matrice et l'utilisation du solvant (ACN/Eau UP 1:1, v/v) acidifié ou non, ont été testées afin d'obtenir les meilleures performances d'analyse en MALDI-MS – résolution, rapport signal/bruit (S/N – *signal-to-noise ratio*), etc. Le solvant utilisé pour le couplage TLC-MALDI-MS (ACN/Eau UP 1:1, v/v) a été choisi sur la base des résultats présentés dans la littérature puisqu'il permet de minimiser un maximum la diffusion spatiale des analytes dans la phase stationnaire au moment du dépôt de la solution de matrice¹⁰².

Les concentrations mises en jeu sur cible sont de l'ordre de 10 mg/mL dans le cas de la DHB et de la SA. Cependant, dans la littérature, les travaux présentés utilisent des concentrations de DHB bien plus élevées, généralement de l'ordre de 50 à 100 mg/mL dans 50 % ACN^{102,105,109,113}. Des premiers tests avec une couche de DHB à 100 mg/mL ont montré les difficultés pour obtenir une surface homogène et sans cristaux hétérogènes en surface. Les premières concentrations de DHB testées ont donc été choisies de manière à être intermédiaires entre la concentration utilisée pour une cible classique et celles décrites dans la littérature, soit 25 et 50 mg/mL. Concernant la SA, la solution à 10 mg/mL étant à saturation, seule une concentration à 20 mg/mL a été testée.

Etude de l'influence de la concentration en DHB

La comparaison des performances d'analyse obtenues pour les différentes concentrations de DHB a été réalisée sur un extrait organique de jaune d'œuf et sur une solution de BSA. Deux plaques identiques ont donc été préparées, sur lesquelles l'extrait de jaune d'œuf et la BSA ont été déposés sur deux lignes. Les conditions de dépôt des échantillons de référence (protocoles de préparation des solutions, Chapitre B – Partie 2.1.1) sont détaillées ci-dessous :

- i) Extrait de jaune d'œuf à 8,4 mg/mL, soit de l'ordre de 10 mM en PL : 1 spot de 10 μ L (environ 100 nmol déposés) et 1 spots de 5 μ L (environ 50 nmol déposés).

ii) Solution de BSA entière à différentes concentrations : 500 μ M, 250 μ M, 150 μ M, 100 μ M, 50 μ M et 25 μ M. Spots de 5 μ L, soit une quantité déposée allant de 2,5 nmol à 125 pmol. Après le séchage des dépôts, deux couches de 1 mL d'une solution de DHB à 25 mg/mL ont été vaporisées sur la première plaque (TLC_DHB25) et deux couches de 1 mL d'une solution de DHB à 50 mg/mL ont été déposées sur la seconde plaque (TLC_DHB50). Les deux lignes ont été analysées en utilisant le mode d'ionisation positif, à l'aide du réflectron pour l'extrait de jaune d'œuf et à l'aide du CovalX pour la BSA entière. La puissance du laser a été fixée à 75 % pour l'analyse de la BSA et à 74 % pour l'extrait de jaune d'œuf. Les analyses de la BSA à l'aide du détecteur CovalX n'ont pas permis d'observer de signal sur les spectres MS. Davantage de mise au point a été nécessaire pour la détection de la BSA entière sur plaque TLC (Partie 1.1.5).

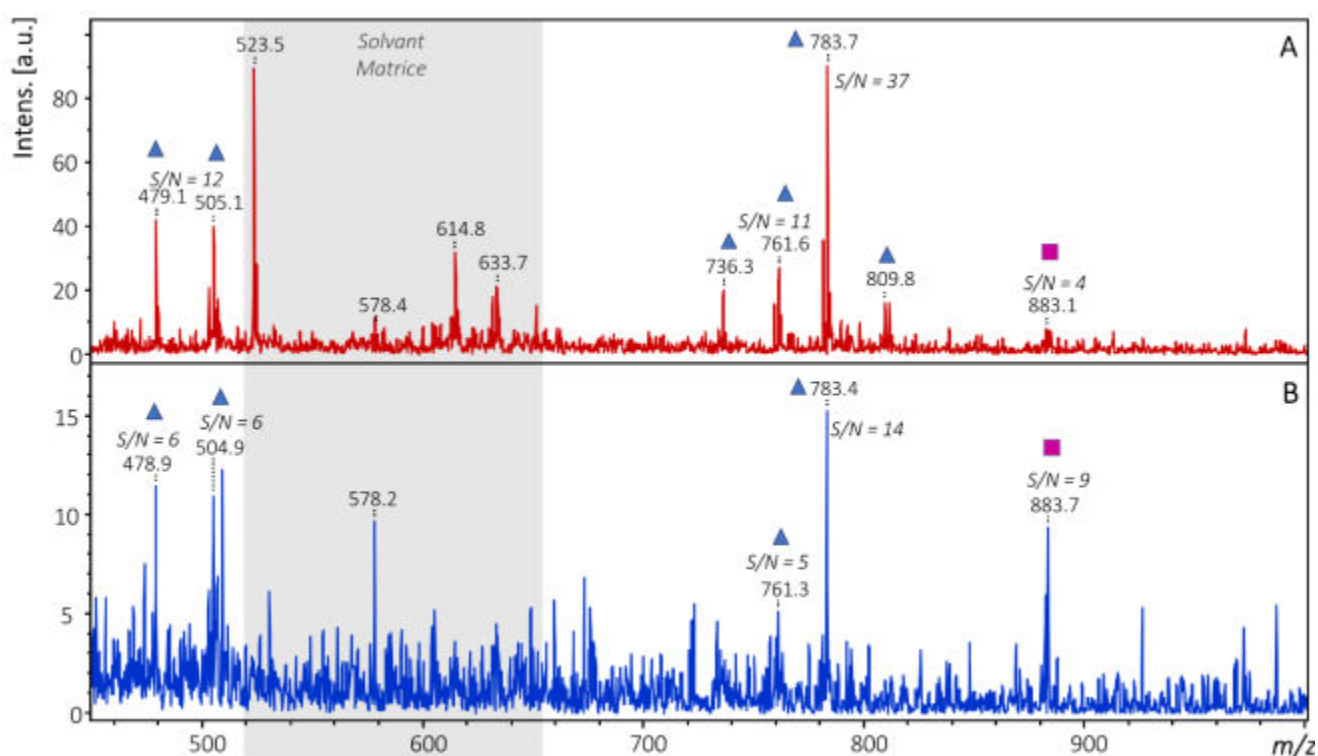


Figure D. 6 – Spectres MALDI-MS obtenus pour l'extrait de jaune d'œuf avec un dépôt de deux couches de solution de DHB à 50 mg/mL (TLC_DHB50 - A) et à 25 mg/mL (TLC_DHB25 - B) dans ACN/Eau UP 1:1 (v/v) 0,1 % TFA. Méthode d'analyse RP ; 74 % de la puissance laser. Détection des PC (Δ), SM (\circ) et PI (\square).

Les analyses des spots d'extrait de jaune d'œuf ont permis la détection de l'une des classes de PL majoritaires du jaune d'œuf, la PC, et de deux autres PL, la SM et la phosphatidylinositol (PI), dans le cas de TLC_DHB25 et TLC_DHB50 (Figure D.6). Cependant, comme observé sur les spectres, pour les ions majoritaires de la PC, les rapports S/N obtenus sont deux fois plus faibles avec une concentration de 25 mg/mL, par rapport à une concentration de 50 mg/mL (Figure D.6), et le bruit de fond observé est plus important, et ce pour une même quantité d'extrait de jaune d'œuf déposée.

Compte tenu des meilleures performances atteintes pour l'analyse en MS, la concentration de 50 mg/mL a donc été retenue pour la préparation des solutions de DHB dans le cadre du couplage TLC-MALDI-MS.

1.1.4. Optimisation des paramètres d'analyse MALDI-MS

Après avoir déterminé les conditions optimales de dépôt des échantillons et de la matrice, les paramètres expérimentaux en MS ont été mis au point. Dans cette partie, il s'agira donc de décrire la mise en place des réglages sur le logiciel pour les analyses, l'optimisation de la puissance laser appliquée pour l'ionisation, puis le problème de la calibration sera abordé.

☒ Mise au point des paramètres via le logiciel de couplage TLC-MALDI

Comme détaillé dans le Chapitre A – Partie 2.2.2, la mise en œuvre automatique du couplage direct TLC-MALDI d'un point de vue instrumental est possible grâce au logiciel dédié développé par Bruker Daltonics. Seuls quelques paramètres doivent être optimisés (Figure D.7).

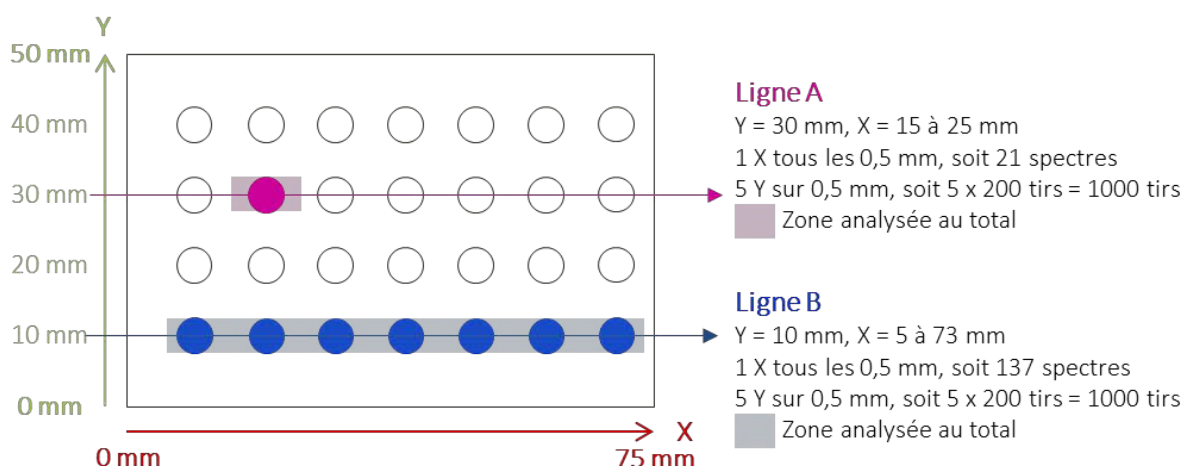


Figure D. 7 – Schéma explicatif de la sélection des zones analysées sur une plaque TLC préparée en mode « *spotting* ». Chaque couleur de spot correspond aux dépôts analysés selon une même méthode d'analyse en masse.

Choix des coordonnées X et Y

Dans le cas de cette partie de la mise au point sur des plaques préparées en *spotting*, les différents spots sont déposés sur des marquages bien définis (trace fine au crayon à papier), qui ont permis de repérer les différents dépôts précisément, afin de faciliter le choix des coordonnées Y et X.

Pour une seule plaque TLC, quatre lignes peuvent être analysées. Pour cela, la sélection de la coordonnée Y (Y pouvant être fixé sur un point entre 0 et 50 mm, ce qui correspond à la largeur de la plaque) permet de sélectionner la ligne sur laquelle se trouve l'échantillon d'intérêt.

Une fois la ligne Y choisie, la longueur de ligne doit être fixée en sélectionnant une coordonnée X initiale et une coordonnée X finale (entre 0 et 75 mm, soit la longueur de la plaque).

Résolution spatiale en X et nombre de spectres

Le réglage par défaut du logiciel fixe un écart de 1 mm entre chaque point X de la ligne d'analyse, soit une résolution spatiale de 1 mm pour l'acquisition des spectres successifs. Un écart plus grand entre chaque spectre pourrait conduire à des pertes d'information du fait de la baisse de résolution spatiale. Le couplage TLC-MALDI-MS étant destiné à l'étude d'échantillons de composition inconnue, il est ici important d'obtenir un maximum d'informations sur la totalité de la ligne d'analyse et donc une résolution spatiale élevée. Pour nos analyses, le pas d'analyse en X a été fixé à 0,5 mm afin d'obtenir un bon rapport résolution spatiale / temps d'analyse.

Nombre de tirs laser et somme en Y

La question s'est finalement posée du nombre de tirs à sommer pour un spectre et sur quelle largeur de ligne. Pour une acquisition sur cible, le nombre de tirs laser sommés est en général de 1 000, en déplaçant la cible sous les tirs laser, de manière à obtenir un spectre plus représentatif de la totalité du dépôt. En TLC, les dépôts ont un diamètre d'environ 0,5 cm et effectuer des tirs laser sur un unique point pour un X donné, ne permettrait pas d'obtenir un spectre suffisamment représentatif de l'échantillon en ce point X.

Le logiciel de couplage donne la possibilité, pour une même coordonnée X, de sommer les tirs laser sur plusieurs points en Y, de part et d'autre de la ligne Y sélectionnée initialement. Le nombre de tirs par défaut du logiciel, fixé à 200, a été conservé et pour chaque spectre, 5 points Y sont analysés sur une largeur de bande de 0,5 cm, représentative de l'échantillon en un X donné. Pour un spectre, 1 000 tirs sont donc accumulés au total.

Analyse d'un même dépôt par des méthodes MS différentes

Au début de ce travail d'optimisation, un même dépôt était analysé plusieurs fois avec des méthodes MS différentes. Il a rapidement été observé que des spectres satisfaisants, en terme de rapport S/N, n'étaient obtenus que pour la première analyse, ce qui pourrait s'expliquer par une désorption de la majeure partie des analytes d'intérêt et de la matrice lors du premier passage du laser.

La zone d'analyse sélectionnée selon les paramètres déterminés ci-dessus recouvrant une grande partie du spot, un dépôt ne peut donc servir qu'à une seule analyse par une méthode MS. Dans le cas où un dépôt devrait être analysé par différentes méthodes pour une plaque TLC, il faudra prévoir un nombre de dépôt adapté.

☒ Mise au point de la méthode en MS

Une fois la zone d'analyse sélectionnée, le logiciel de couplage TLC-MALDI se connecte directement au logiciel d'acquisition *FlexControl 3.4*, qui permet de choisir la méthode MS pour l'analyse.

Mode d'ionisation et détection

Le mode d'ionisation et le détecteur utilisés sont sélectionnés au préalable en fonction de l'application et de l'échantillon étudié. Comme détaillé dans les paragraphes précédents, selon les composés d'intérêt, la préparation de la plaque sera différente (plus particulièrement pour le choix de la matrice) et adaptée à la méthode MS qui sera mise en œuvre.

Ainsi, selon la nature des composés d'intérêt, les méthodes suivantes sont utilisées :

- i) Petites molécules organiques (composés de référence : PC, PE et SM) : Matrice DHB à 50 mg/mL, mode d'ionisation positif, détection à l'aide du réflectron (cf. Chapitre B – Partie 2.2. Tableau B.3 : méthode RP),
- ii) Peptides et molécules de moins de 20 kDa (composé de référence : Digest de cytochrome C) : matrice SA à 20 mg/mL, mode d'ionisation positif, détecteur linéaire (cf. Chapitre B – Partie 2.2. Tableau B.3 : méthode LP12),
- iii) Protéines de plus de 20 kDa (composé de référence : BSA) : Matrice SA à 20 mg/mL, mode d'ionisation positif, détecteur CovalX (cf. Chapitre B – Partie 2.2. Tableau B.3 : méthode CVX).

Optimisation de la puissance du laser

La désorption des analytes de la surface de silice pour leur ionisation est plus difficile que pour une analyse sur cible en acier inoxydable. La puissance du laser doit donc être augmentée en conséquence, afin de permettre le processus de désorption/ionisation des composés, sans provoquer leur fragmentation dans la source. Plusieurs dépôts de 10 µL ont donc été réalisés pour chacun des composés de référence, afin de tester l'application de différents pourcentages de puissance laser.

Les premiers tests mis en œuvre ont montré qu'aucun signal, y compris pour un blanc de matrice, n'était obtenu en dessous de 73 % de puissance laser pour la méthode RP, en-dessous de 73,5 % pour LP12, et en-dessous de 74 % pour la méthode CVX. Les tests suivants se sont donc attachés à analyser les dépôts des différents composés de référence, à l'aide de pourcentages de puissance laser variant entre 73 et 74 % pour la méthode RP, entre 73,5 et 74,5 % pour la méthode LP12 et entre 74 et 75 % pour la méthode CVX^a.

Les résultats (Figure D.8) ont permis de fixer la puissance laser optimale pour l'analyse des molécules organiques de moins de 5 000 Da (méthode RP) à 73,7 % et celle pour l'analyse des peptides et

^a Les expériences sur cible en acier inoxydable ont montré que même une faible variation de la puissance laser (à partir de 0,2 %) peut apporter une différence importante au spectre MALDI-MS.

protéines de moins de 20 000 Da (méthode LP12) à 74,5 %. Ces puissances ont été choisies sur la base des rapports S/N plus élevés qu'elles permettent d'atteindre pour les différents ions majoritaires détectés, en tenant compte de la reproductibilité des expériences sur les différents dépôts analysés, ainsi que de la diminution du bruit de fond pour ces puissances.

Concernant l'analyse des protéines de plus de 20 000 Da par la méthode CVX, la mise au point s'est effectuée en tirant directement sur un dépôt de BSA, sans passer par le logiciel de couplage *TLCMALDI Wizard*. Il n'a été possible de détecter la BSA que par cette méthode et pour une puissance supérieure ou égale à 74,8 %.

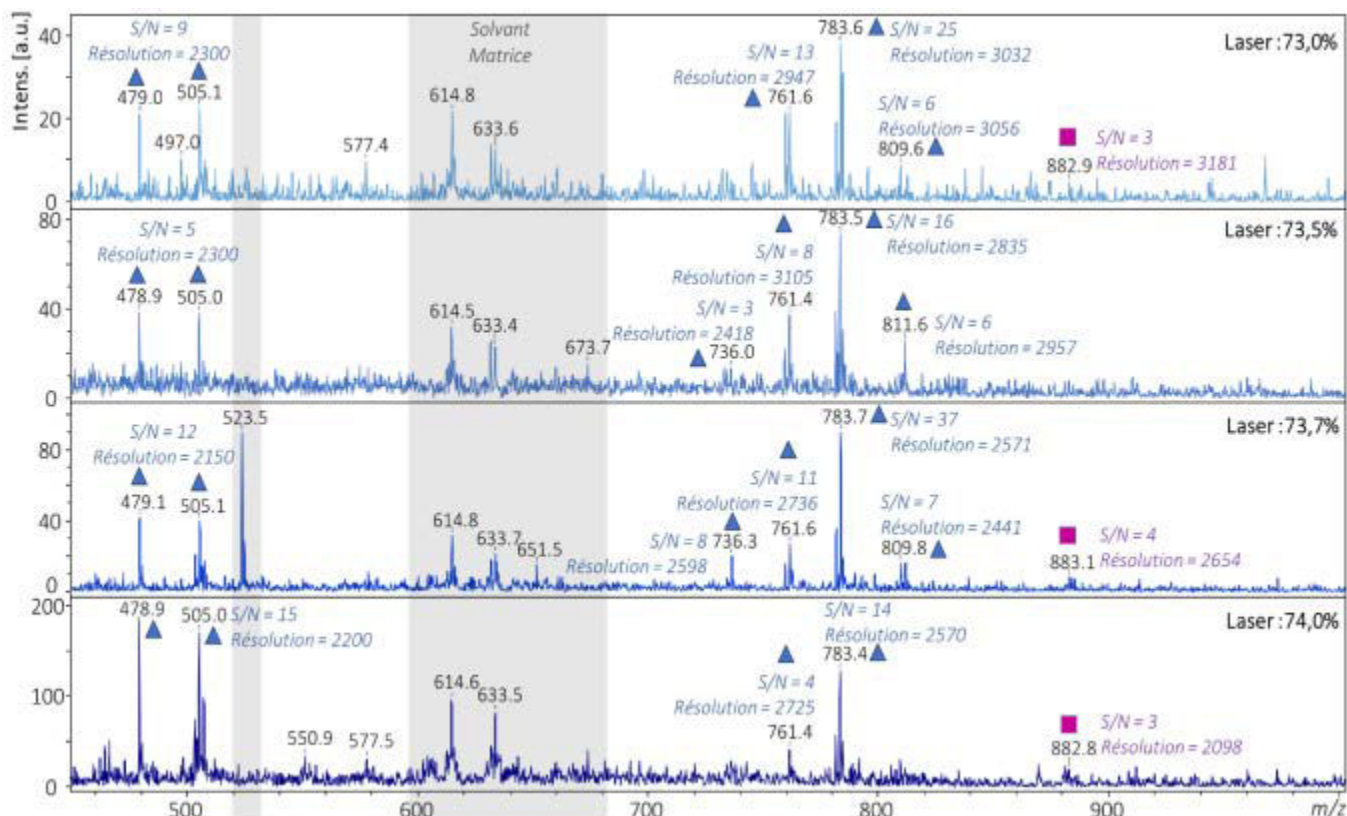


Figure D. 8 – Spectres MALDI-MS obtenus pour des dépôts de 10 µL d'extrait de jaune d'œuf à 8 mg/mL, avec plusieurs puissances laser : de 73,0 % à 74,0 %. Matrice : DHB 50mg/mL dans ACN/Eau UP 1:1 (v/v) 0,1 % TFA, 2 couches de 1 mL.

Méthode d'analyse RP. Détection des PC (Δ), SM (O) et PI (□).

▣ Calibration

Pour les analyses en spectrométrie de masse, la calibration est un point crucial, afin de s'assurer de la justesse des m/z obtenus, permettant d'identifier les composés présents. Pour les analyses sur cible, les calibrants utilisés sont le Pepmix II (PII) et le Protein Standard I (P1) (cf. Chapitre B – Partie 2.2.). Le dépôt du mélange calibrant/matrice 1:1 (v/v) est effectué à proximité des dépôts d'échantillon et le processus de calibration est réalisé à l'aide du logiciel *FlexControl 3.4* avant chaque série d'analyses, pour une méthode MS donnée. Dans le cas des analyses sur TLC, la question de la calibration est une problématique à part entière.

Calibration externe sur cible MALDI en amont de l'analyse sur TLC

Parmi les solutions mises en œuvre, se retrouve la calibration réalisée à l'aide d'un dépôt de calibrant sur cible en acier inoxydable, en amont de l'analyse sur TLC¹⁰⁵. L'application de cette méthode pose cependant le problème de la validité de la calibration, puisqu'elle n'est pas effectuée sur le même support et ne prend donc pas en compte les effets de surface pouvant intervenir.

Pour notre mise au point, ce type de calibration a malgré tout été utilisé systématiquement avant les analyses sur TLC, afin d'assurer un minimum de calibration et plus particulièrement pour les phases de mise en place d'une stratégie plus adaptée.

Calibration externe sur TLC

Une autre stratégie a consisté à déposer plusieurs spots de calibrants sur la plaque TLC, à proximité des dépôts d'analytes¹¹⁵. Seuls des dépôts de 10 μ L permettent de détecter les deux calibrants PII et P1 systématiquement. Les capacités de détection sont cependant peu reproductibles, puisque les pics des calibrants ne sont généralement pas tous détectés et avec des intensités différentes, selon les conditions de préparation des plaques TLC appliquées. Cette méthode permet cependant d'effectuer une calibration externe en amont de l'analyse en utilisant le logiciel *FlexControl 3.4*, comme pour une cible classique et sans passer par le logiciel de couplage. Le laser est pour cela tiré directement sur le dépôt de calibrant et les tirs accumulés, jusqu'à obtenir un spectre permettant la calibration.

Calibration interne par la matrice

Dans le cas des analyses par la méthode RP, une stratégie de calibration interne des différents spectres a également été mise en place pour le traitement des données, en utilisant les pics de la matrice^{112,113}. En effet, les pics à m/z 137,02, 154,02, 155,02, 177,01 et 273,04 de la DHB et ceux à m/z 207,67, 225,07, 247,87, 358,17, 387,13 et 471,13 de la SA étant systématiquement visibles sur les spectres enregistrés en RP, ils constituent d'excellents pics de référence pour une calibration interne. Cette méthode n'a bien entendu pas pu être mise en œuvre pour les méthodes LP12 et CVX, compte tenu de l'absence de pics des matrices sur les gammes de m/z couvertes.

Écarts entre la théorie et l'expérience

Malgré les différentes étapes de calibration, un écart avec les ratios m/z donnés par la littérature (cf. Annexe 3 – Tableaux S.3 et S.4), ou obtenus sur cible en acier inoxydable pour les différentes références, est parfois observé dans le cas des analyses TLC-MALDI-MS. Celui-ci correspond à une différence de masse de $m/z \pm 2$ dans le cas des molécules de moins de 5 000 Da, et une différence variable pouvant aller jusqu'à $m/z +5$ pour les peptides.

Les écarts observés pourraient être dus à des irrégularités de surface propres à la phase stationnaire ou provoquées par le dépôt de la matrice, ou encore à la gamme de m/z de la matrice qui est trop

faible ($m/z < 300$) pour permettre une bonne calibration interne sur toute la gamme analysée en RP (jusqu'à m/z 5 000). Ceci met également en lumière, l'insuffisance d'une calibration externe, à l'aide de dépôts discrets sur la plaque, seule.

De plus, des différences de profils, par rapport aux analyses sur cible en acier inoxydable, sont visibles pour les expériences en TLC-MALDI-MS (Figure D.11.A à C), ce qui pourrait être le signe d'interactions avec la phase stationnaire, qui favoriseraient ou défavoriseraient l'ionisation de certains composés par rapport à d'autres.

1.1.5. Optimisation des performances

L'optimisation de la préparation des plaques ne concerne pas seulement le dépôt des échantillons ou le dépôt de la matrice. Des étapes supplémentaires peuvent être nécessaires en amont de ces étapes, ou encore entre le dépôt de l'échantillon et l'application de la matrice. Le type de plaques utilisé peut également se révéler important pour ce couplage.

▣ Séchage de la plaque

Comme indiqué au paragraphe 1.1.2. « *Séchage de la matrice* », l'introduction de la plaque dans la source du spectromètre de masse induit la libération des gaz et solvants piégés dans la phase stationnaire poreuse. Sans séchage préalable : le vide dans la source ne parvient pas à atteindre la valeur-seuil fixée et empêchant ainsi l'introduction de la plaque TLC dans l'appareil.

Un séchage systématique des plaques TLC en amont de toute préparation, en les plaçant au dessiccateur pendant un minimum de 24 heures, permet de limiter ce problème.

▣ Nettoyage de la plaque

Lors des optimisations du dépôt de la matrice présentées dans la Partie 1.1.2 de ce chapitre, la formation de cristaux visibles à l'œil nu a été observée sur une grande partie de la surface des plaques préparée en mode « *spotting* » (Figure D.9.A), ce qui produit un signal de matrice trop important pour pouvoir détecter les composés d'intérêt déposés sur la plaque.

La première hypothèse pouvant expliquer ce phénomène concerne le mode de séchage des plaques, qui peut être soit trop lent (formation de gros cristaux de tailles hétérogènes), soit trop rapide (la matrice n'a pas le temps de pénétrer à l'intérieur de la phase et la cristallisation s'effectue en surface). Une seconde hypothèse consiste à supposer que la phase de silice n'est pas tout à fait propre et que la présence de poussières en surface de la silice favoriserait la formation de cristaux de matrice. Dans ce cas, un nettoyage de la plaque à l'aide d'un solvant permettrait de minimiser l'apparition de ces

cristaux hétérogènes en surface. Un test de nettoyage d'une plaque a donc été réalisé en faisant migrer du DCM jusqu'en haut de la plaque. Les observations ont permis d'appuyer la seconde hypothèse, puisqu'aucune cristallisation en surface de la matrice n'a été observée sur cette plaque nettoyée (Figure D.9.B).

Ainsi, pour la préparation des plaques en *spotting*, une première étape de conditionnement a été mise en place, grâce à une migration au DCM jusqu'en haut de plaque. Une certaine contribution de la première hypothèse ne peut cependant pas être complètement écartée, il a donc également fallu être attentif à la vitesse de séchage pour chacune des plaques préparées.

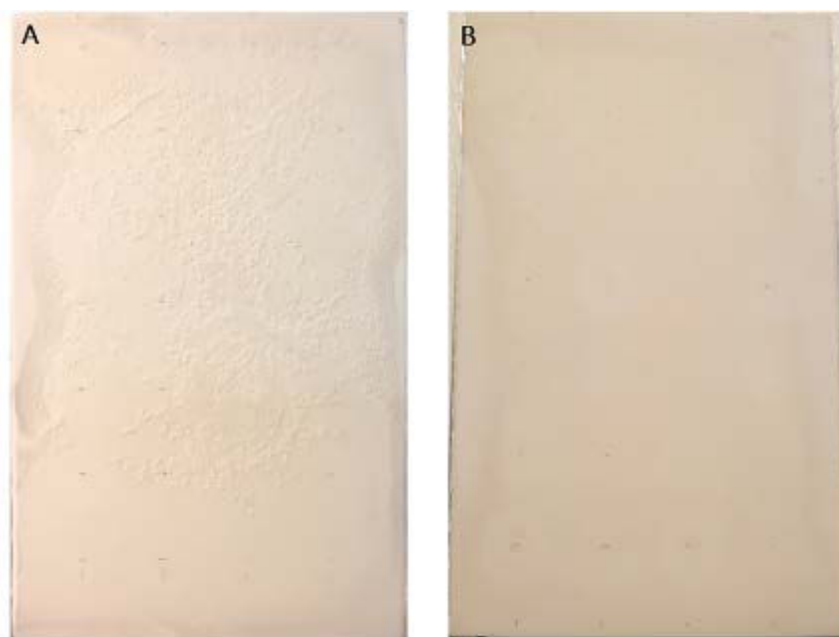


Figure D. 9 – Plaques TLC préparées en « *spotting* » sans étape de conditionnement de la plaque (A) et avec une étape de conditionnement par migration de dichlorométhane jusqu'en haut de la plaque (B). Photographies prises après le séchage de la matrice montrant la formation de cristaux hétérogènes à la surface de la silice pour la plaque non conditionnée (A).

☞ « Extraction » par un solvant

Avec les conditions de préparation décrites précédemment, la détection sur plaque TLC de certains composés s'est révélée infructueuse, et ce même à fortes concentrations, comme dans le cas de la BSA. Il semblerait que les composés comme les protéines de haut poids moléculaire pénètrent plus profondément dans la phase que les composés de plus faible poids moléculaire, à l'image des phospholipides. Ce phénomène pourrait aussi être dû à des interactions supplémentaires entre les composés d'intérêt et la phase stationnaire, qui favoriseraient une adsorption plus profonde. Ainsi, le laser arrivant à la surface de la silice atteindra difficilement les couches inférieures de la silice où se trouvent les protéines, ce qui rend leur désorption de la phase et leur ionisation difficile.

Pour pallier à cela, une étape de désorption par un solvant (Figure D.10) peut être ajoutée juste avant le dépôt de la matrice, afin d'amener les composés d'intérêt vers la surface de la silice^{89,90,122,123}. Différents solvants d'extraction ont été testés, tels qu'un mélange Eau UP/MeOH, ou encore la solution de matrice, pour finalement sélectionner un solvant composé de MeOH.

La plaque TLC est placée horizontalement sur un support sec dans une cuve fermée, saturée en MeOH, puis 1 mL de MeOH est vaporisé sur la surface de la silice à l'aide de l'aérographe. La cuve est immédiatement refermée et la pellicule de MeOH est maintenue pendant 2 min. La plaque est ensuite sortie de la cuve pour procéder immédiatement au dépôt des deux couches de 1 mL de solution de matrice sans séchage intermédiaire.

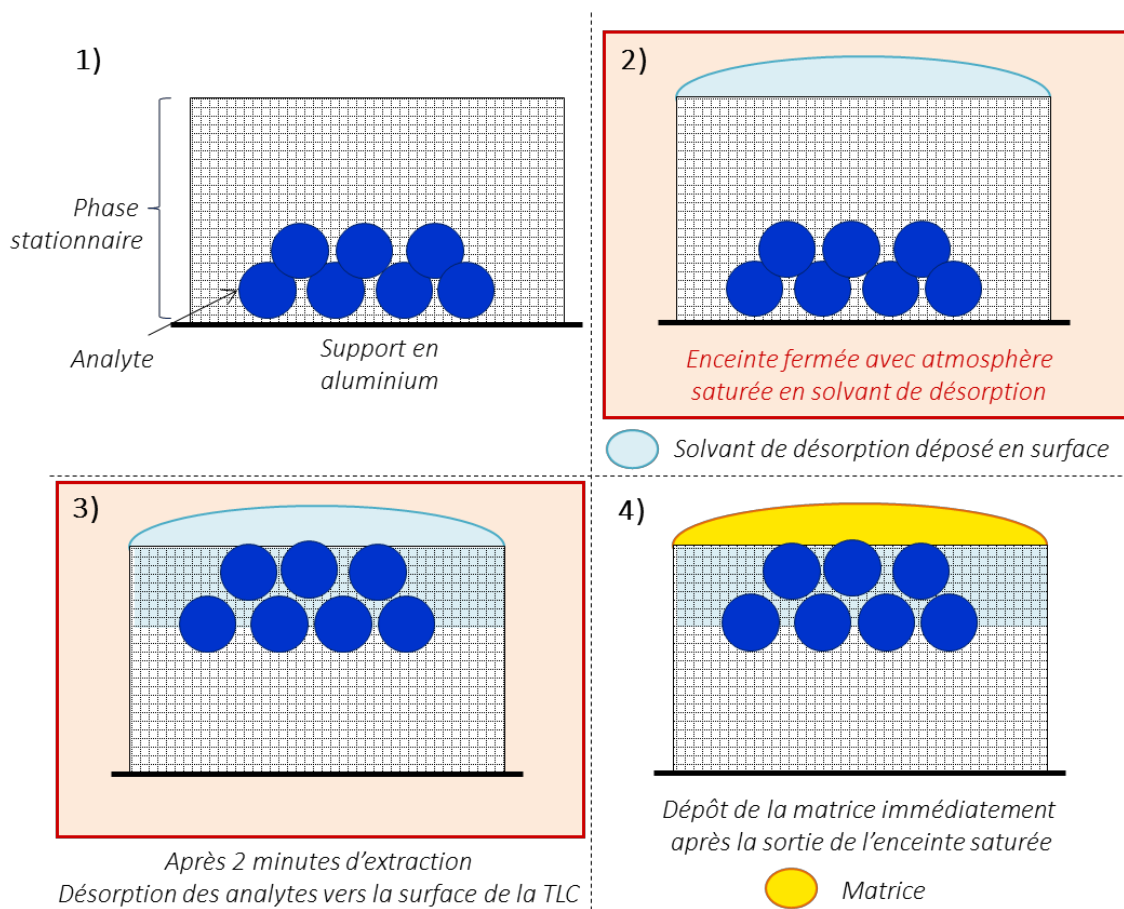


Figure D. 10 – Procédure pour la désorption par un solvant des composés cibles vers la surface de la phase stationnaire.

Dans le cas de l'extrait organique de jaune d'œuf, les performances atteintes sont nettement inférieures (Figure D.11.A à C). Cette observation est probablement due à la nature de l'échantillon – phospholipides en partie solubles dans MeOH – ce qui favoriserait la dispersion spatiale des analytes dans la phase stationnaire au moment de l'extraction et produirait donc l'effet inverse de celui attendu.

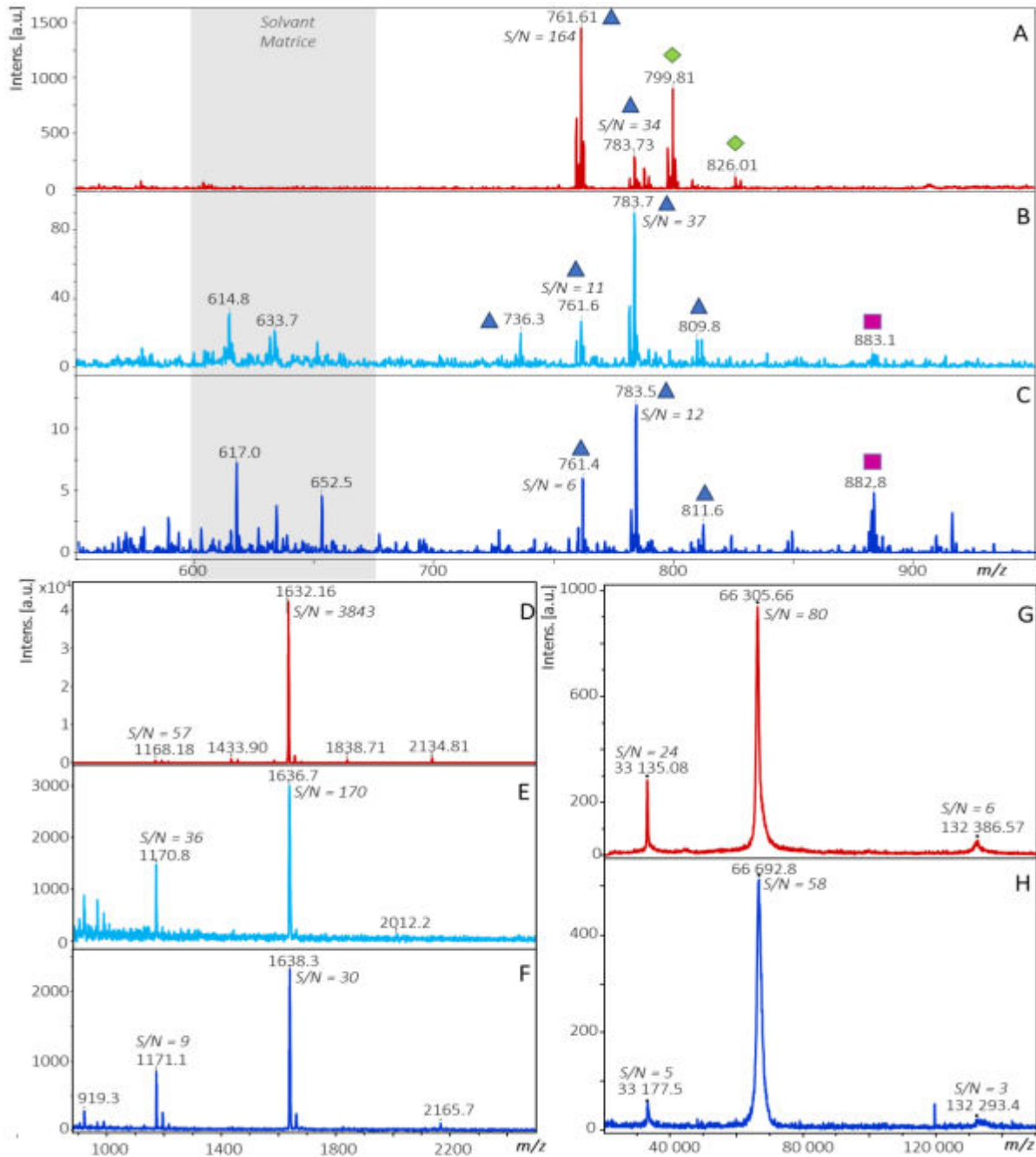


Figure D. 11 – Spectres MALDI-MS sur cible en acier inoxydable et sur plaque TLC avec et sans étape d'extraction par MeOH (2 minutes). Extrait organique de jaune d'œuf à 10 mM (Méthode RP) : A) dépôt sur cible, DHB 10 mg/mL (Eau UP/ACN 1:1 0,1 % TFA), 69,5 % de puissance laser ; B) dépôt sur plaque TLC de 10 μ L (100 nmol déposées), pas d'extraction, DHB 50 mg/mL (Eau UP/ACN 1 : 1 0,1 % TFA), 73,7 % de puissance laser ; C) dépôt sur plaque TLC de 10 μ L (100 nmol déposées), 2 min d'extraction par MeOH, DHB 50 mg/mL (Eau UP/ACN 1 : 1 0,1 % TFA), 73,7 % de puissance laser. Digest de cytochrome C à 8 μ M (Méthode RP) : D) dépôt sur cible, SA 10 mg/mL (Eau UP/ACN 1:1 0,1 % TFA), 69,5 % de puissance laser ; E) dépôt sur plaque TLC de 5 μ L (40 pmol déposées), pas d'extraction, SA 20 mg/mL (Eau UP/ACN 1 : 1 0,1 % TFA), 73,7 % de puissance laser ; F) dépôt sur plaque TLC de 5 μ L (40 pmol déposées), 2 min d'extraction par MeOH, SA 20 mg/mL (Eau UP/ACN 1 : 1 0,1 % TFA), 73,7 % de puissance laser. BSA entière à 500 μ M (Méthode CVX) : G) dépôt sur cible, SA 10 mg/mL (Eau UP/ACN 1:1 0,1 % TFA), 71 % de puissance laser ; H) dépôt sur plaque TLC de 10 μ L (5 nmol déposées), 2 min d'extraction par MeOH, SA 20 mg/mL (Eau UP/ACN 1:1 0,1 % TFA), 75,0 % de puissance laser.

Concernant le digest de cytochrome C, l'étape d'extraction au MeOH n'apporte pas d'amélioration et semble même induire une diminution du rapport S/N (Figure D.11.D à F). Malgré tout, avec ou sans extraction, le digest de cytochrome C est détecté avec une bonne sensibilité. Par la suite, l'une ou l'autre approche pourra donc être appliquée.

La BSA (500 μ M, 10 μ L déposés), pour laquelle aucun signal n'avait pu être obtenu sur plaque TLC, a pu être détectée, grâce à l'étape supplémentaire d'extraction par MeOH (Figure D.11.G et H).

Ainsi, dans le cas de la recherche de protéines entières dans un échantillon, cette étape d'extraction au MeOH sera primordiale et les peptides pourront être analysés avec ou sans extraction. Au contraire, dans le cas de l'analyse de composés organiques solubles à l'aide du détecteur réflectron, cette étape sera à proscrire.

▮ Détermination des limites de détection

Afin d'évaluer les limites de détection (LOD) pouvant être atteintes par ce couplage, ainsi que les volumes d'échantillon minimaux pouvant être déposés, des spots de différentes quantités de matière déposées pour chaque composé de référence ont été réalisés. Les conditions de préparation des différentes plaques TLC et les résultats obtenus pour ces expériences sont donnés ci-dessous.

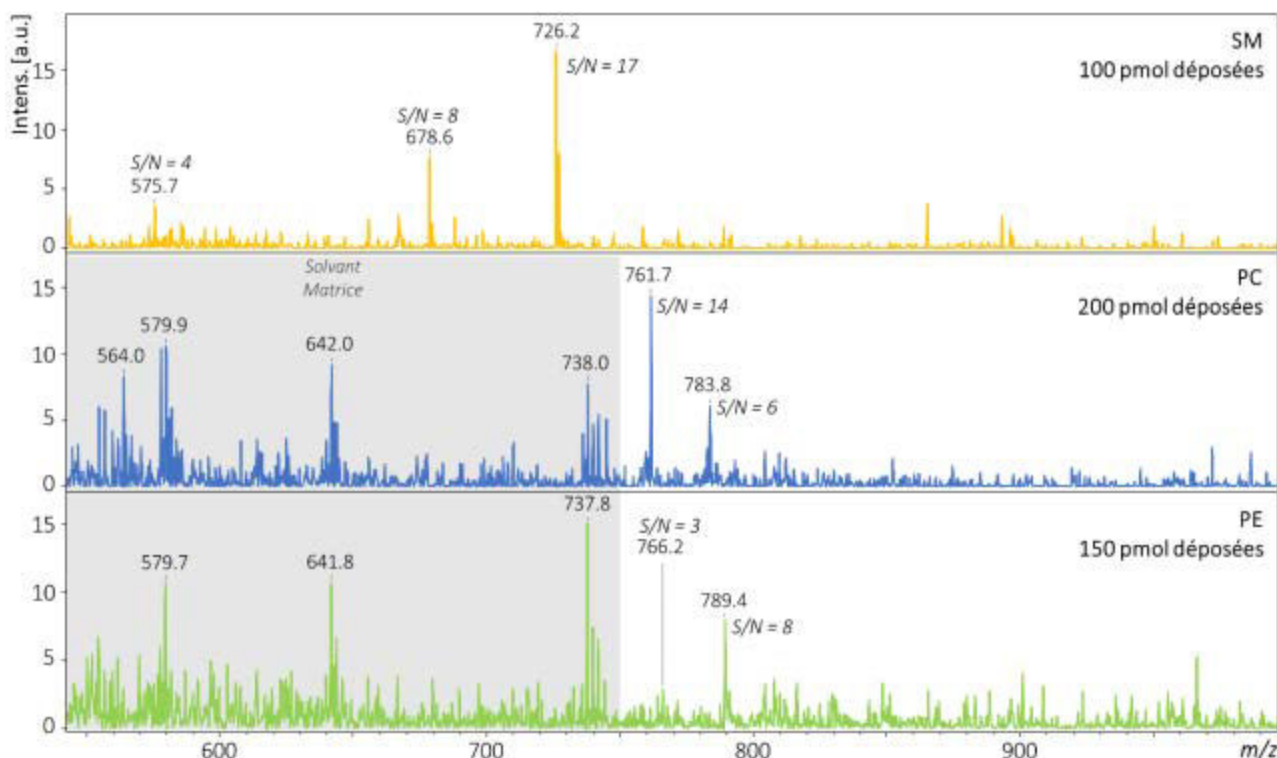


Figure D. 12 – Spectres MALDI-MS de la sphingomyéline (SM), la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) obtenus pour les plus petites quantités détectées. Matrice : DHB 50 mg/mL (Eau UP/ACN 1:1 0.1 % TFA) ; Méthode d'analyse RP ; 73,7 % de la puissance du laser.

Phospholipides PC, PE et SM

- Dépôts de 10 et 5 μL sur plaque TLC avec des solutions de concentrations allant de 500 μM à 20 μM , soit entre 5 nmol et 100 pmol déposées.
- Matrice DHB à 50 mg/mL, dépôt à l'aérographe, 2 couches de 1 mL
- Méthode RP et 73,7 % de la puissance laser.

La SM est le composé présentant les meilleures capacités de détection avec une limite de détection à 100 pmol déposées. La PC a pu être détectée jusqu'à 200 pmol déposées et la PE, jusqu'à 150 pmol (Figure D.12).

Par ailleurs, les résultats obtenus au cours des expériences pour la détermination des LOD pour les dépôts de 5 μL sont moins reproductibles que pour des dépôts de 10 μL . Pour la suite de ces travaux, le volume à déposer a donc été fixé à 10 μL et les dépôts ont été réalisés selon la méthode mise au point dans le paragraphe 1.1.1 « *Volume et mode de dépôt des échantillons* ».

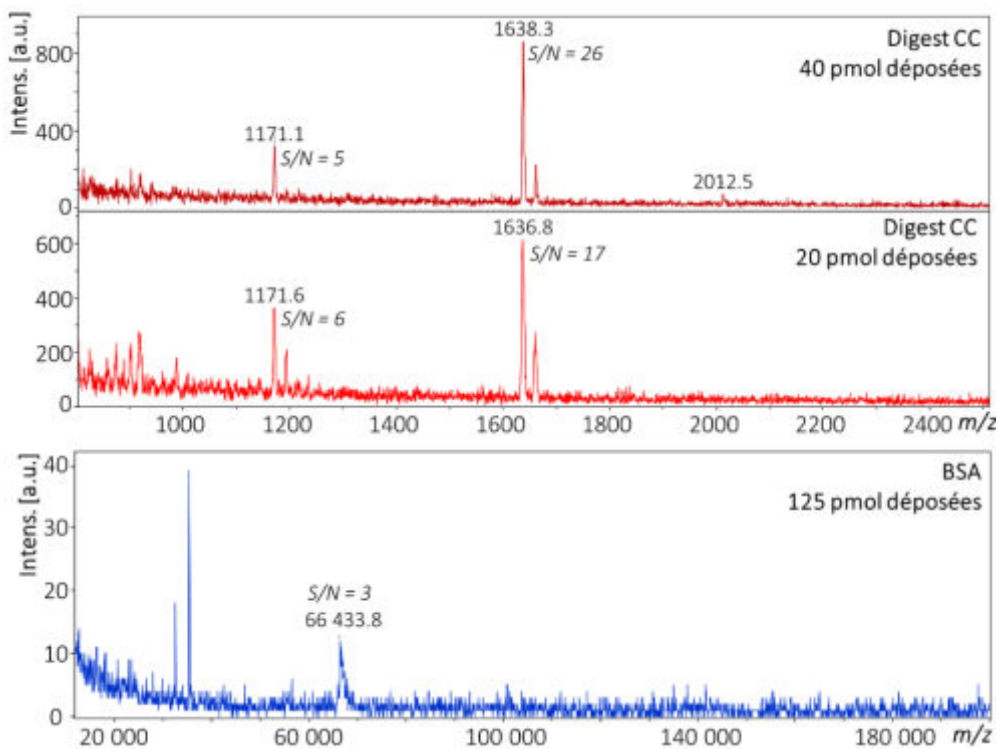


Figure D. 13 – Spectres MALDI-MS du digest de cytochrome C (Digest CC) obtenus pour les plus petites quantités détectées. Matrice : SA 20 mg/mL (Eau UP/ACN 1:1 0.1 % TFA). Méthode d'analyse RP ; 73,7 % de la puissance du laser. Spectre MALDI-MS du sérum d'albumine bovin (BSA) obtenu pour les plus petites quantités détectées. Etape d'extraction au MeOH ; Matrice : SA 20 mg/mL (Eau UP/ACN 1:1 0.1 % TFA). Méthode d'analyse CVX ; 75,0 % de la puissance du laser.

Digest de cytochrome C

- Dépôts de 10 à 2,5 μL d'une solution à 8 μM , soit entre 80 et 20 pmol déposées.

- Avec ou sans extraction de 2 min par 1 mL de MeOH, matrice DHB à 50 mg/mL ou SA 20 mg/mL, dépôt à l'aérographe, 2 couches de 1 mL
- Méthode RP et 73,7 % de la puissance laser ou, méthode LP12 et 74,5 % de la puissance laser.

Les spectres obtenus montrent la grande facilité de détection des peptides du cytochrome C. En effet, ce composé est détecté systématiquement pour une quantité déposée de 20 pmol (volume de 2,5 μ L), que ce soit avec l'utilisation de la DHB ou de la SA, en mode RP ou LP12, et également, avec ou sans étape d'extraction par le MeOH.

Compte tenu des résultats obtenus pour le digest de référence, le volume de 10 μ L fixé précédemment, devrait permettre l'analyse de faibles quantités de peptides et petites protéines.

Albumine de sérum bovin

- Dépôts de 5 et 10 μ L de solutions de concentrations allant de 500 μ M à 25 μ M, soit entre 5 et 125 pmol déposées.
- Avec extraction de 2 min par 1 mL de MeOH, matrice DHB à 50 mg/mL ou SA 20 mg/mL, dépôt à l'aérographe, 2 couches de 1 mL
- Méthode CVX et 74,8 % de la puissance laser.

Les tests réalisés ont cependant mis en évidence un manque de reproductibilité pour la détection de la BSA, qui serait probablement dû à l'étape d'extraction par MeOH. Pour la première plaque réalisée, les spots de 10 μ L de BSA ont été détectés pour 500 μ M, 300 μ M et 150 μ M, soit jusqu'à 1,5 nmol déposées. Dans le cas de la seconde plaque, les spots de 10 μ L de BSA ont cette fois-ci été détectés pour 160 μ M et 25 μ M, soit jusqu'à 250 pmol déposés. Enfin, pour la dernière plaque analysée, sur laquelle ont été déposés des spots de 5 μ L de BSA, il a été possible de détecter la présence de la protéine pour des concentrations de 55 et 25 μ M seulement, soit pour 275 et 125 pmol déposées (Figure D.13). Avec les conditions mises en place, il semble ainsi possible de détecter la présence de BSA entière jusqu'à 125 pmol déposées.

Malgré ce manque de reproductibilité et l'obtention de rapports S/N bas (à l'image de la Figure D.13), ces expériences ont montré la possibilité de détecter de faibles quantités de protéines de plus de 20 kDa, jusqu'à 125 pmol déposées. De la même manière que pour les phospholipides, dans la suite de cette partie, les dépôts d'échantillons destinés aux analyses par la méthode CVX seront faits à partir de 10 μ L.

▣ Choix du type de plaque TLC

Une grande partie de l'optimisation des conditions de préparation des plaques et des paramètres d'analyse a été réalisée sur des plaques TLC classiques (cf. Chapitre B – Partie 1.2.1). Des plaques

haute performance (HPTLC – cf. Chapitre B – Partie 1.2.1) et des plaques dédiées au couplage avec la MS (MTLC – cf. Chapitre B – Partie 1.2.1) ont également été testées sur les trois PL de référence.

Les plaques HPTLC ne semblent pas permettre d'atteindre de meilleurs rapports S/N que les plaques TLC classiques. En revanche, elles permettent l'obtention d'une meilleure reproductibilité pour la détection des différents composés et de meilleures intensités relatives et résolution de pics en MS (Figure D.14.A et B). Leur phase stationnaire plus fine et plus régulière pourrait défavoriser la diffusion des analytes (latéralement ou en profondeur) et favoriser la reproductibilité des expériences.

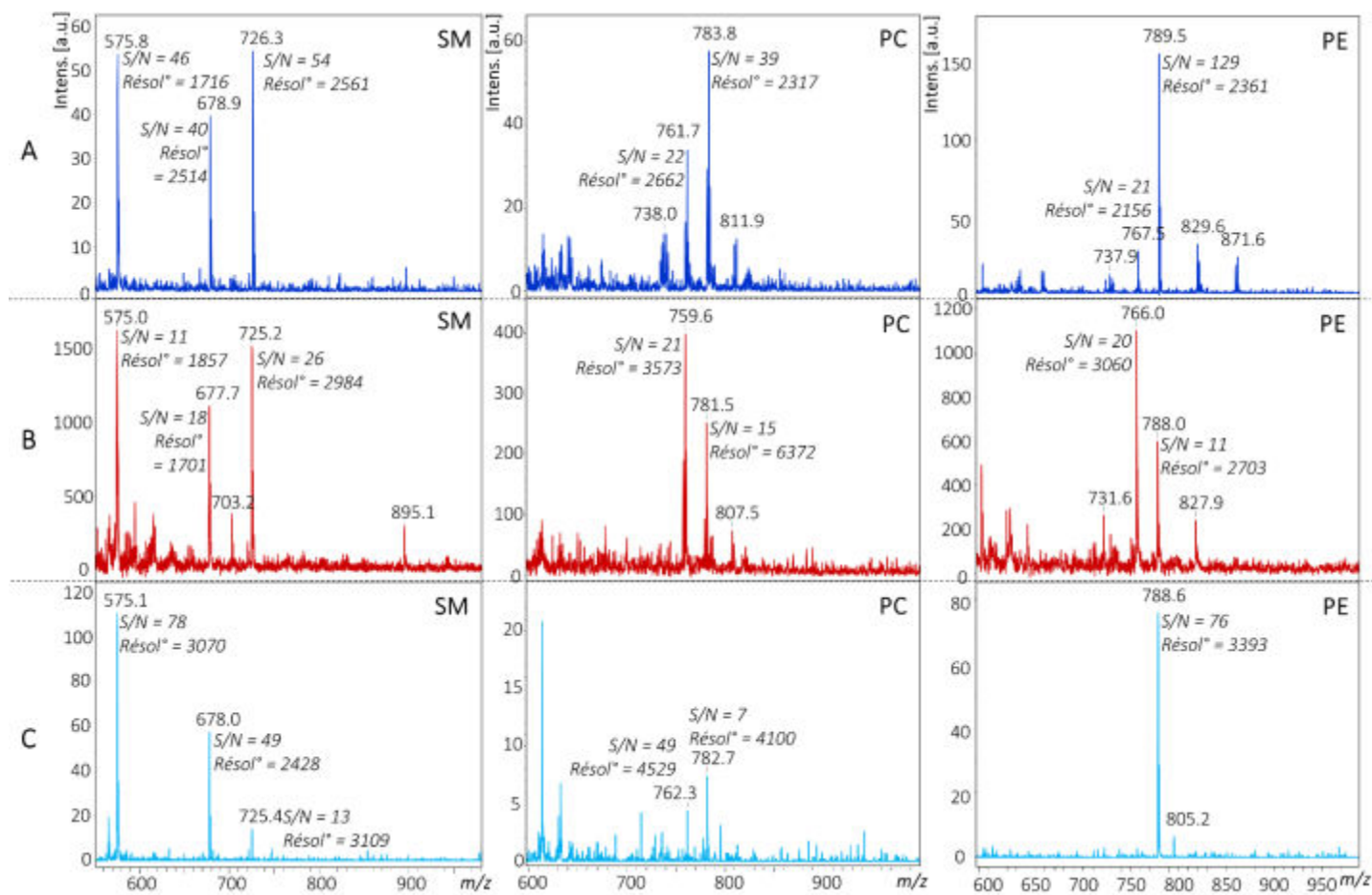


Figure D. 14 – Comparaison des spectres MALDI-MS obtenus pour les trois références de phospholipides (SM, PC et PE), déposés sur un support TLC (A), HPTLC (B) ou MTLC (C). Dépôts 10 μ L à 100 μ M (1 nmol déposées), Matrice : DHB 50 mg/mL (Eau UP/ACN 1:1 0.1 % TFA) ; Méthode d'analyse RP ; 73,7 % de la puissance du laser.

Les plaques MTLC, spécialement conçues pour le couplage avec la MS, ne montrent pas de meilleures performances, en termes de reproductibilité et de sensibilité que les plaques classiques (Figure D.14.A et C). Les plaques MTLC possèdent une phase de silice similaire aux plaques HPTLC, mais avec une épaisseur plus régulière et la particularité de produire un bruit de fond plus faible, ce qui est supposé permettre l'obtention de meilleures sensibilités et résolutions de pic. Ce n'est cependant pas ce qui a été observé à l'occasion des différents tests, notamment pour les ions majoritaires des différents PL,

avec une diminution du rapport S/N visible pour certains, quand d'autres ne sont plus détectés (Figure D.14.B et C). De plus, sur les 5 plaques qui ont été préparées pour les tests effectués sur les PL de référence, les résultats ont montré une faible reproductibilité des analyses.

Compte tenu de la meilleure reproductibilité, des meilleures intensités relatives et des meilleures résolutions obtenues avec les plaques HPTLC par rapport aux plaques TLC, ce sont donc celles-ci qui ont été sélectionnées pour la suite de la mise au point.

1.2. Optimisation du couplage TLC-MALDI-MS en mode « élution »

Comme expliqué en introduction de ce chapitre, la mise en place du couplage TLC-MALDI-MS au laboratoire est destinée à la caractérisation de la composition d'échantillons complexes, grâce à la séparation des composés par TLC en fonction de leur nature chimique et à leur analyse par MALDI-MS. Dans cette optique, la partie précédente a permis de mettre au point les conditions de préparation des plaques TLC et les paramètres expérimentaux principaux du couplage avec la MS. Il s'agit à présent de décrire la dernière phase de la mise au point du couplage TLC-MALDI-MS, en incluant l'étape d'élution des analytes sur la plaque TLC.

1.2.1. Préparation des plaques TLC

☒ Choix et dépôts des composés de référence

Petites molécules organiques

Un mélange équimolaire des trois phospholipides de référence utilisés pour le mode « *spotting* » – PC, PE et SM – a été utilisé pour l'optimisation de la préparation des plaques TLC avec étape de développement, dans le cadre de l'analyse de composés de bas poids moléculaires en mode réflectron ($m/z < 3\ 000$).

Peptides et protéines

Comme pour la partie précédente, la mise en place des conditions de préparation et d'analyse des plaques de TLC en mode « élution » pour les peptides et protéines s'est appuyée sur le digest de cytochrome C à 8 μM et sur la BSA entière comme composés de référence.

Dépôt des références

Les conditions de dépôts des différents échantillons sont celles mises en place précédemment, à savoir des dépôts de 10 µL réalisés par ajouts successifs de 2 µL de solution, avec un temps d'attente entre chaque ajout pour permettre la pénétration de la solution dans la phase stationnaire. Pour la mise en œuvre du mode « élution », les dépôts sont réalisés sur une ligne située à 1 cm du bas de plaque (cf. Chapitre B – Partie 2.1.3. Figure B.1). Pour chaque plaque, 4 dépôts au maximum sont possibles avec un écart de 1 cm séparant les échantillons, et ce afin d'éviter tout chevauchement des dépôts.

▣ Développement des plaques TLC

Pour le développement des plaques TLC, les analytes d'intérêt, déposés en bas de plaque, sont séparés en fonction de leur polarité, grâce à l'action d'un éluant – solvant ou mélange de solvants – migrant par capillarité dans la phase stationnaire vers le haut de plaque, et choisi en fonction de l'application souhaitée. Le front de migration est ensuite arrêté à environ 1 cm du haut de plaque afin d'éviter tout risque de rétrodiffusion des analytes qui fausserait la séparation. Avant le dépôt de la matrice, afin de prévenir tout problème d'introduction dans le spectromètre de masse, la plaque développée est placée au dessiccateur pendant un minimum de 1 heure.

L'éluant utilisé pour la séparation des phospholipides de référence a été adapté à partir des différents travaux de la littérature concernant les analyses TLC-MALDI-MS de jaune d'œuf^{102,113}, c'est-à-dire un mélange DCM/MeOH/Eau UP/Triéthylamine (Et₃N) en proportions 35:35:7:35 (v/v/v/v).

Pour le développement de plaques TLC de BSA ou de digest de cytochrome C, plusieurs éluants ont été testés. L'éluant utilisé pour les PL (DCM/MeOH/Eau UP/Et₃N, 35:35:7:35), du DCM ou encore un éluant dédié à la séparation de peptides²⁹¹ : BuOH/Eau UP/AcOH, 4:1:1 (v/v/v).

▣ « Extraction » par MeOH

Dans la partie précédente, l'intérêt d'une étape d'« extraction » des analytes des couches internes vers la surface de la silice, afin de favoriser la détection des protéines, a été démontrée (Partie 1.1.5. « *Extraction par un solvant* »). Cette étape ne sera donc appliquée que dans le cas particulier de la recherche de protéines de plus de 20 kDa dans l'échantillon étudié, à l'image de la BSA.

▣ Dépôt de la matrice

Les conditions mises en œuvre dans cette partie pour le dépôt de la matrice à la surface de la phase de silice sont identiques aux conditions optimisées dans les Parties 1.1.2 et 1.1.3. Pour rappel, les matrices choisies pour le couplage TLC-MALDI-MS sont la DHB, à une concentration de 50 mg/mL

dans Eau UP/ACN 1:1 (v/v) 0,1 % TFA, matrice particulièrement adaptée à l'analyse des petites molécules organiques par la méthode RP, et la SA à 20 mg/mL dans Eau UP/ACN 1:1 (v/v) 0,1 % TFA, qui est plus particulièrement dédiée à l'analyse des peptides et protéines par les méthodes LP12 et CVX.

Le dépôt est effectué par pulvérisation de la matrice sur la surface de la plaque TLC, à l'aide d'un aérographe. Deux couches de 1 mL de matrice sont nécessaires, chacune suivie d'un séchage à froid de 10 min.

☒ Couplage avec la MS

Sélection de la zone d'analyse

Le paramétrage de l'acquisition des spectres MS sur une ligne d'analyses par le logiciel de couplage TLC-MALDI est mis en place comme expliqué précédemment.

Le choix de la coordonnée Y permet de sélectionner une ligne de migration précise, et donc un échantillon d'intérêt. Les coordonnées en X sont choisies afin d'obtenir une analyse depuis le dépôt initial, jusqu'au front de migration. X_i est ainsi systématiquement fixé à 7 mm et X_f à 68 mm. Le pas d'analyse en X est réglé comme précédemment sur 0,5 mm, soit 123 spectres au total, et pour chaque spectre, 5 Y dispersés sur une largeur de bande de 5 mm sont sommés (200 tirs laser par Y), de manière à accumuler 1000 tirs par spectre. (Figure D.15)

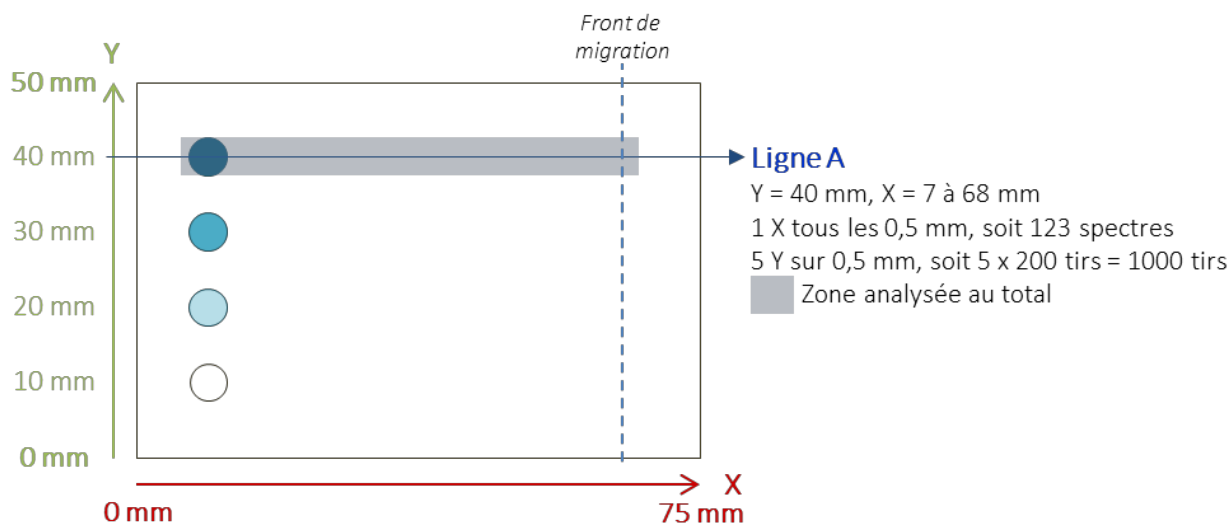


Figure D. 15 – Schéma explicatif de la sélection des zones analysées sur une plaque TLC préparée en mode « élution ».

Méthode d'analyse en MS

Les méthodes d'analyse en MS appliquées dans cette partie sont les mêmes que précédemment : RP, LP12 et CVX (cf. Chapitre B – Partie 1.2. Tableau B.3). Egalement, les pourcentages de puissance laser optimisés en mode « spotting » ont été appliqués dans cette partie : 73,7 % pour la méthode RP, 74,5 % pour LP12 et 74,8 % pour CVX.

Calibration

La stratégie de calibration mise en place pour les plaques TLC en mode « spotting » a également été appliquée pour le mode « élution ». Ainsi, une première calibration externe est réalisée sur cible en amont des analyses sur TLC, puis une seconde est effectuée à l'aide de dépôts de 10 μL de calibrants sur le côté de la TLC, en bas et en milieu de plaque. Les dépôts sont réalisés entre les étapes d'élution et d'application de la matrice. Enfin, dans le cas des analyses en RP, une calibration interne par les pics de matrice a été appliquée.

▣ Détermination des limites de détection

Les limites de détection pouvant être atteintes sur plaque HPTLC en mode élution ont été étudiées sur le mélange équimolaire des trois PL de référence et sur la solution de BSA.

Dans le cas du mélange PC/PE/SM (Figure D.16), les composés ont été séparés sur plaque par le système DCM/MeOH/Eau UP/Et₃N, 35:35:7:35 (v/v/v/v). Les paramètres du couplage définis précédemment ont permis la caractérisation des trois PL de référence jusqu'à une concentration en PL de 25 μM pour un dépôt de 10 μL (250 pmol déposées).

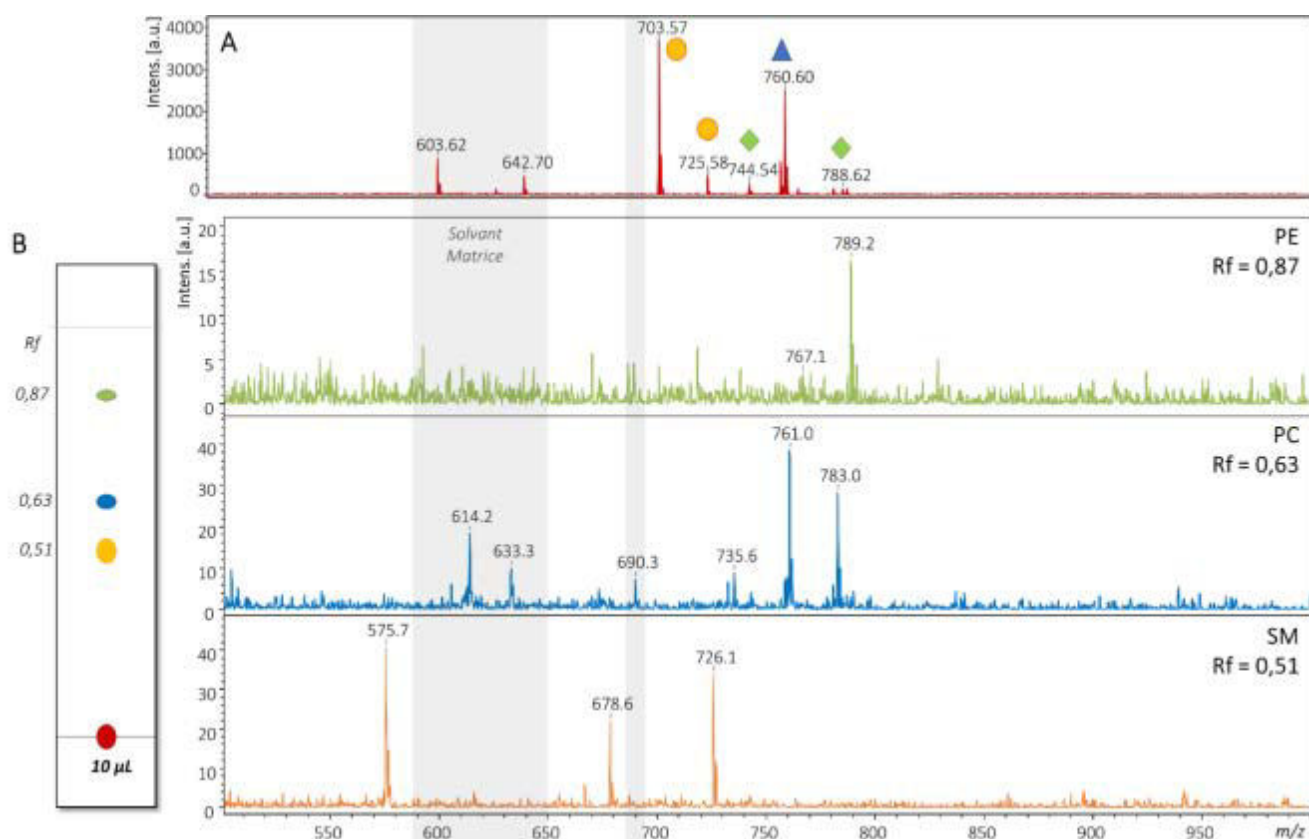


Figure D. 16 – A) Spectre MALDI-MS du mélange PC/PE/SM déposé sur cible en acier inoxydable. Matrice DHB à 10 mg/mL (Eau UP/ACN 1:1 0.1% TFA) ; Méthode RP; 70% de la puissance laser. B) Séparation, rapports frontaux et spectres MALDI-MS des composés du mélange équimolaire de phospholipides de référence PC, PE et SM sur HPTLC par l'éluant DCM/MeOH/Eau/Et₃N 35:35:7:35 (v/v/v/v), 250 pmol déposés ; Méthode RP ; 73,7% de la puissance laser. Détection des PC (Δ), SM (O) et PE (\blacklozenge).

1.2.2. Application des conditions mises au point à l'analyse de mélanges de référence

▣ Extrait organique de jaune d'œuf

Comme précisé au début de ce chapitre, l'analyse par TLC-MALDI-MS *on-line* d'extrait organique de jaune d'œuf a fait l'objet d'un certain nombre de travaux dans la littérature^{102,113}. Ce système a donc constitué un premier choix évident pour l'application des paramètres de mise en œuvre du couplage en mode « élution » sur des mélanges de référence.

Les différentes conditions de préparation de la plaque HPTLC et d'analyse en MS pour un extrait organique de jaune d'œuf à 10 mg/mL (cf. Chapitre B – Partie 2.1.1) sont données ci-dessous :

- Dépôts de 10 µL au total par ajouts successifs de 2 µL,
- Elution DCM/MeOH/Eau/Et₃N 35:35:7:35 (v/v/v/v), puis 5 min au sèche-cheveux à froid (vitesse 1) et 3h au dessiccateur,

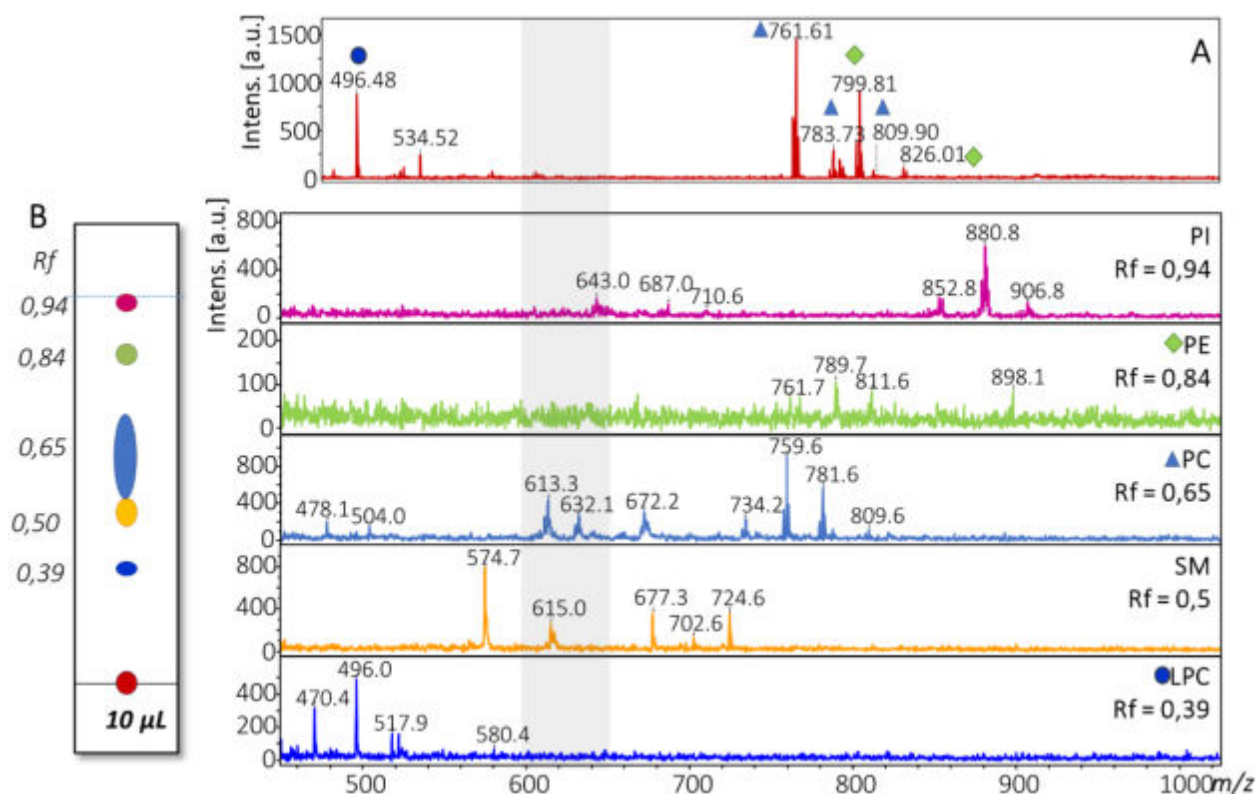


Figure D. 17 – A) Spectre MALDI-MS d'un extrait organique de jaune d'œuf à 10 mg/mL déposé sur cible en acier inoxydable.

DHB 10 mg/mL (ACN/Eau 1:1 0,1 % TFA) ; RP ; 70 % de la puissance laser. B) Séparation des phospholipides de l'extrait organique de jaune d'œuf à 10 mg/mL sur plaque HPTLC par le mélange DCM/MeOH/Eau/Et₃N 35:35:7:35 (v/v/v/v) pour un dépôt de 10 µL. Spectres MALDI-MS des différents phospholipides visibles ; DHB 50 mg/mL (ACN/Eau 1:1, 0,1 % TFA) ; Méthode RP ; 73,7 % de la puissance laser. (PI = Phosphatidylinositol, PE = Phosphatidyléthanolamine, PC = Phosphatidylcholine, SM = Sphingomyéline, LPC = Lyso-phosphatidylcholine).

- Matrice DHB à 50 mg/mL, dépôt à l'aérographe, 2 couches de 1 mL,
- Logiciel TLC-MALDI : Zone analysée de 61 x 5 mm, depuis le dépôt initial jusqu'au front de migration. 1 spectre tous les 0,5 mm, soit 123 spectres pour la ligne entière. 5 points Y par spectre (sur la largeur de la zone – 5 mm), pour un nombre total de tirs laser de 1 000.
- Analyse par la méthode RP, 73,7 % de la puissance laser.

Dans le cas d'une analyse sur cible de l'extrait de jaune d'œuf sans séparation des différentes classes de composés, seuls 3 phospholipides sont visibles : PC et PE, composés majoritaires, et la lysoPC (LPC). La mise en œuvre du couplage direct TLC-MALDI-MS sur des plaques HPTLC d'extrait de jaune d'œuf, développées à l'aide du mélange DCM/MeOH/Eau UP/Et₃N, a permis d'obtenir la détection en MS, et l'identification de cinq phospholipides constitutifs de l'extrait organique de jaune d'œuf (PC, PE, SM, LPC et le phosphatidylinositol PI – Figure D.17), et ce pour une quantité de matière totale déposée pouvant descendre jusqu'à environ 50 nmol, soit une quantité en PI (le moins abondant des PL détectés) d'environ 300 pmol, ce qui correspond aux valeurs données par la littérature¹⁰².

▣ Mélange complexe de référence

L'éluant dédié à la séparation des phospholipides (DCM/MeOH/Eau/Et₃N, 35:35:7:35) a également été utilisé dans le cadre des expériences d'application du couplage TLC-MALDI-MS à un système complexe de référence, composé de BSA entière, de digest de cytochrome C et des phospholipides PC, PE et SM. Les différentes conditions de préparation de la plaque TLC et d'analyse en MS sont données ci-dessous :

- Préparation du mélange complexe : 50 µL de BSA à 1000 µM, 30 µL d'un mélange équimolaire de PC, PE et SM à 1000 µM chacun, et 20 µL de digest de cytochrome C à 8 µM. Le mélange obtenu est donc le suivant : BSA 500 µM / PC 300 µM / PE 300 µM / SM 300 µM / Digest CC 1,6 µM
- 3 dépôts de 10 µL au total par ajouts successifs de 2 µL,
- Elution DCM/MeOH/Eau/Et₃N, 35:35:7:35 (v/v/v/v), puis 5 min au sèche-cheveux à froid (vitesse 1) et 4 h au dessiccateur,
- 2 min de désorption de la BSA par 1 mL de MeOH,
- Matrice SA à 20 mg/mL afin de favoriser la détection de la BSA, dépôt à l'aérographe, 2 couches de 1 mL,
- Logiciel TLC-MALDI : Zone analysée de 61 x 5 mm, depuis le dépôt initial jusqu'au front de migration. 1 spectre tous les 0,5 mm, soit 123 spectres pour la ligne entière. 5 points Y par spectre (sur la largeur de la zone – 5 mm), pour un nombre total de tirs laser de 1000.
- Analyse par les méthodes RP à 73,7 % de la puissance laser, LP12 à 74,5 % de la puissance laser, et CVX à 74,8 % de la puissance laser.

Les analyses ont montré d'une part la possibilité, grâce à cette méthode, de séparer les petites molécules organiques, tels que les phospholipides, des peptides et d'obtenir en une analyse les différents spectres pouvant aider à l'identification de ces composés (Figure D.18). Il n'a cependant pas été possible de détecter la présence de BSA dans le mélange, malgré sa présence en quantités non négligeables (500 μM , soit 5 nmol déposées), et malgré l'application des conditions de préparation adaptées à ce type de composé (extraction de 2 min par 1 mL de MeOH ou utilisation de la matrice SA).

Malgré cela, les premiers résultats obtenus ici, sont prometteurs puisqu'ils ont mis en évidence la possibilité, grâce au couplage TLC-MALDI-MS, de séparer, détecter et identifier des composés de natures différentes dans un mélange complexe.

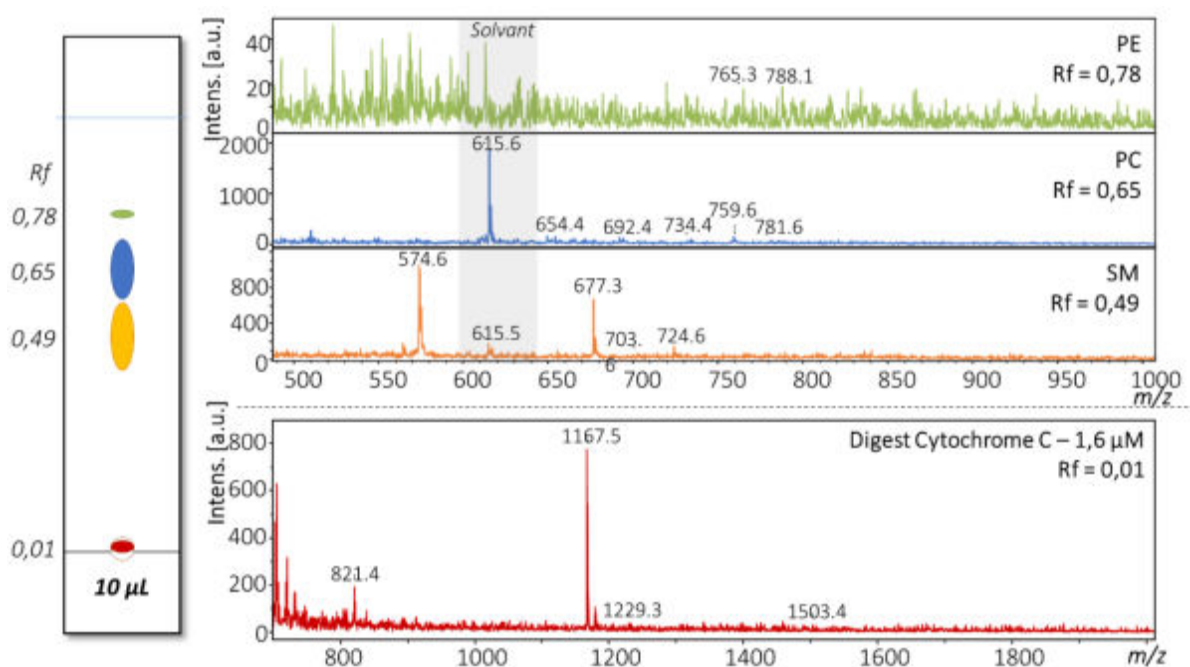


Figure D. 18 – Séparation sur plaque HPTLC des composants du mélange complexe de référence (BSA 500 μM /Digest CC 1,6 μM /PC 300 μM /PE 300 μM /SM 300 μM) par le mélange DCM/MeOH/Eau UP/Et₃N 35:35:7:35 (v/v/v/v) pour un dépôt de 10 μL . Spectres MALDI-MS des différents composés détectés ; 2 min d'extraction par MeOH ; SA 20 mg/mL (ACN/Eau 1:1, 0,1 % TFA) ; RP ; 73,7 % de la puissance laser.

Dans cette première partie du Chapitre pour la mise en place du couplage TLC-MALDI-MS pour l'étude de systèmes complexes précieux, les conditions de préparation des plaques TLC dans l'optique du couplage avec la MALDI-MS ont été optimisées, ainsi que les paramètres instrumentaux pour la mise en œuvre des analyses MS directement sur la plaque TLC. Cette partie a ainsi abouti à la mise en place d'une méthode d'analyse rapide et sensible de systèmes complexes, qui permet également la minimisation des quantités d'échantillon engagées.

2. Application à l'étude de systèmes archéologiques

Après son optimisation sur des composés de référence modernes, la TLC-MALDI-MS *on-line* a finalement été appliquée à l'étude de systèmes archéologiques et biologiques. Dans un premier temps, le couplage a été mis en œuvre, afin de caractériser des matériaux organiques solubles extraits de divers artefacts anciens, puis de nouvelles conditions expérimentales ont été étudiées dans le but d'appliquer le couplage TLC-MALDI-MS direct à l'analyse de digests peptidiques capillaires.

2.1. Matériaux organiques solubles

L'objectif principal de l'implémentation du couplage direct TLC-MALDI-MS au laboratoire était la caractérisation des archéomatériaux organiques solubles. Comme mentionné en introduction de ce chapitre, l'utilisation de ce couplage permettrait d'accéder à une plus large gamme de composés que dans le cas des analyses par GC-MS.

Divers archéomatériaux peuvent ainsi être analysés par cette approche, comme des composés extraits de tessons de poteries anciennes, des baumes de momies ou encore des extraits organiques de cheveux archéologiques.

Dans cette partie, nous nous focaliserons sur une étude, réalisée conjointement avec Alice Ameline dans le cadre d'un stage de Master 1²⁹².

2.1.1. Etude de cas

📄 Description de l'échantillon

L'étude de cas exposée dans cette partie concerne un échantillon archéologique de composition inconnue (E16420), prélevé dans une poterie égyptienne d'une nécropole de la XVIII^{ème} dynastie, mis à disposition par G. Pierrat-Bonnefois, Conservatrice au Département des Antiquités Egyptiennes du Musée du Louvre. Des analyses par GC-MS ont été effectuées dans le cadre des travaux de thèse de Claire Bastien²⁹³. Ils ont révélé la présence de corps gras (acides gras, triglycérides) et de cires épicuticulaires de végétaux (distribution régulière d'esters d'acides gras à longues chaînes), mais la nature exacte de cet archéomatériau n'a pas pu être définie avec précision.

▣ MALDI-MS sur cible

Les analyses de l'archéomatériau organique d'intérêt par MALDI-MS sur cible classique (cf. Chapitre B – Partie 2.2.1), sans séparation préalable, ont montré la présence d'une distribution régulière d'ions non identifiés, en dessous de m/z 1 500. Celle-ci fait penser à un polymère à motif régulier (Figure D.19), qui pourrait correspondre aux cires épicuticulaires mises en évidence par GC-MS. Les analyses par GC-MS avaient aussi montré la présence de triglycérides, qui ne sont plus visibles ici sur le spectre MALDI-MS, et sont donc probablement masqués par cette distribution régulière. Afin de pouvoir caractériser au mieux la composition de cet archéomatériau par MALDI-MS, le couplage direct avec la TLC a donc été utilisé.

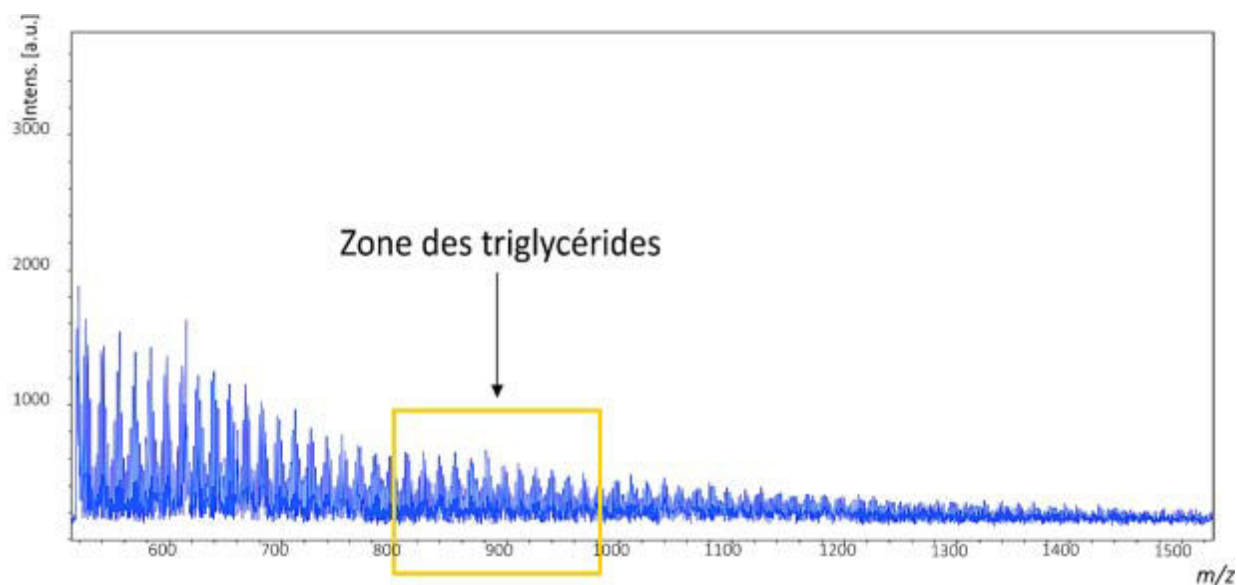


Figure D. 19 – Spectre MALDI-TOF-MS d'un échantillon archéologique de composition inconnue prélevé dans une poterie égyptienne d'une nécropole de la XVIII^{ème} dynastie mettant en évidence la présence d'une distribution régulière non identifiée masquant tout autre composé qui pourrait être présent dans l'échantillon. Matrice : DHB 10 mg/mL dans ACN/H₂O 0.1 % TFA (1:1, v/v), dépôt : goutte séchée, méthode d'analyse RP.

▣ Mise en œuvre du couplage

- Préparation de l'échantillon : Solubilisation de 8 mg de matériau dans 150 μ L de DCM, 10 min au bain à ultra-sons,
- Plaque HPTLC
- Dépôts de 30 μ L,
- Elution au DCM, puis 1 h au dessiccateur,
- Matrice DHB à 50 mg/mL, dépôt à l'aérographe, 2 couches de 1 mL,
- Logiciel *TLCMALDI* : Zone analysée de 60 x 5 mm, depuis le dépôt initial jusqu'au front de migration. 1 spectre tous les 0,5 mm, soit 121 spectres pour la ligne entière. 5 points Y par spectre (sur la largeur de la zone – 5 mm), pour un nombre total de tirs laser de 1000.
- Analyse par les méthodes RP, à 73,7 % de la puissance laser, et LP12, à 74,5 % de la puissance laser.

▣ Résultats

La mise en œuvre du couplage a permis la séparation sur plaque HPTLC des différentes classes de composés de l'archéomatériau, ainsi que leur détection par spectrométrie de masse. La distribution régulièrement observée précédemment sur les analyses MALDI-MS sur cible classique est toujours visible par cette approche (Figure D.20). Il faut noter que l'absence de migration pour cette classe de composés ($R_f=0,05$) semble indiquer un caractère hydrophile ou polaire de ceux-ci. Ils ne correspondent donc pas aux cires, comme nous l'avions supposé dans un premier temps avec uniquement l'analyse sur cible en acier inoxydable, les esters caractéristiques étant plutôt apolaires.

De plus, les différentes classes de triglycérides sont à présent détectées de manière distincte par MALDI-MS, grâce à leur migration à un R_f de 0,70. Pour cette classe de composés, différents spectres sont obtenus (Figure D.20), donnant chacun un aperçu partiel de la composition globale en triglycérides. Pour obtenir le spectre global d'une seule et même classe de composés, il faudrait pouvoir sommer les différents spectres obtenus le long de l'axe X (Figure D.15), ce qui n'est pas proposé par le logiciel de couplage *TLCMALDI Wizard*.

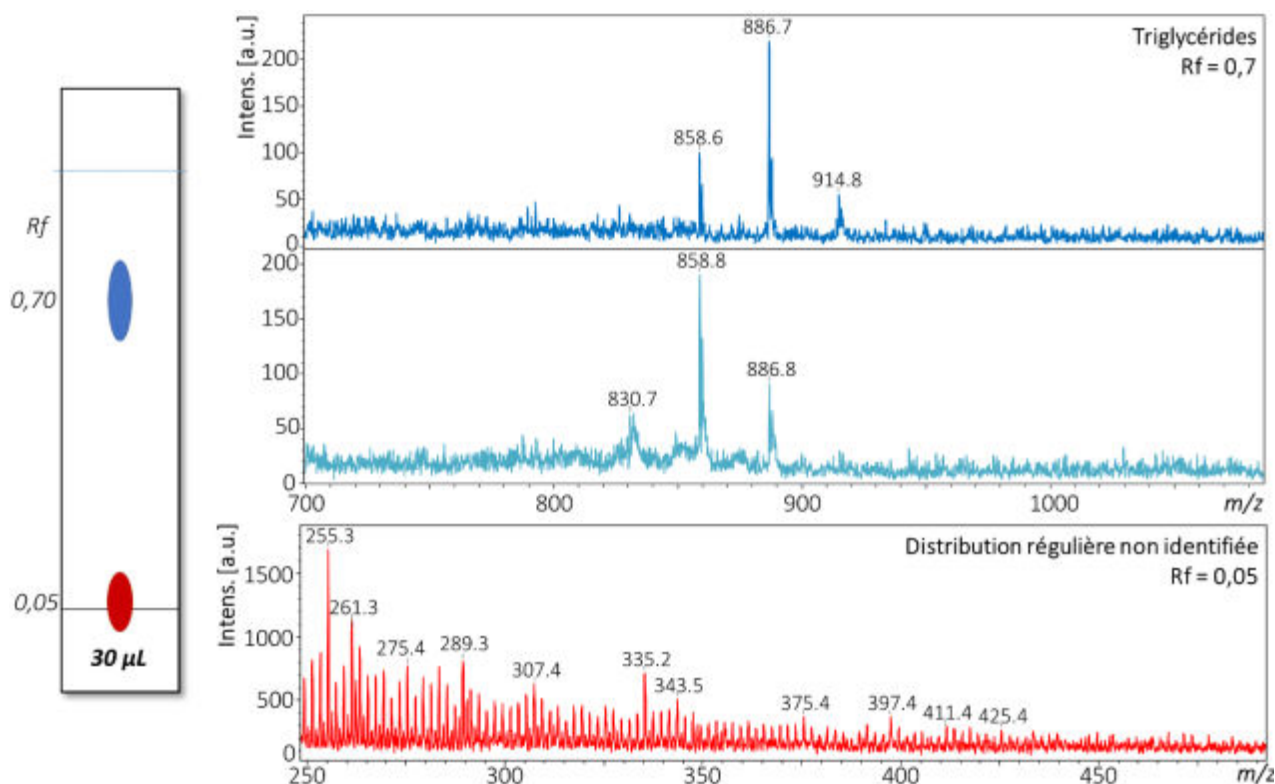


Figure D. 20 – Schéma de la zone de migration sur plaque TLC de l'échantillon archéologique E16420 de composition inconnue, prélevé dans une poterie égyptienne d'une nécropole de la XVIII^{ème} dynastie. Spectres MALDI-TOF-MS des composés mis en évidence. Elution : DCM ; Matrice : DHB 50 mg/mL (ACN/Eau UP 0.1 % TFA) ; Méthode d'analyse RP ; 73,7 % de la puissance laser.

2.1.2. Conclusion

La mise en œuvre de la TLC avant l'analyse MALDI-MS de l'archéomatériau organique d'intérêt a permis la séparation des différentes familles de composés, ainsi que la détection et l'identification des espèces minoritaires qui étaient masquées par les composés majoritaires.

Ces analyses montrent le besoin existant pour les archéomatériaux organiques, échantillons complexes de composition inconnue, d'être soumis à une technique séparative en amont des analyses, afin d'obtenir un aperçu le plus complet possible de la composition de ce matériau.

2.2. Digests de cheveux de momies

2.2.1. Avant-propos

Dans le cadre de la caractérisation des cheveux de momies, l'approche par TLC-MALDI-MS directe a été appliquée à l'étude des digests capillaires. Cette stratégie pourrait apporter des informations complémentaires sur les peptides constituant les échantillons, et sur certaines PTMs présentes, comme par exemple les déamidations, modifications largement étudiées par MALDI-MS pour la datation d'échantillons archéologiques kératinisés^{280,294}.

Par ailleurs, la mise en œuvre de la TLC pourrait simplifier la préparation de l'échantillon, en permettant la séparation, directement sur la plaque, des peptides par rapport aux sels du tampon d'extraction et de digestion, ou par rapport à certains composés non protéiques, comme les lipides ou les mélanines.

Avant de pouvoir s'assurer de la possibilité d'atteindre ces objectifs, il a tout d'abord fallu adapter le protocole mis en place dans la Partie 1 de ce chapitre, pour optimiser la séparation des peptides sur la plaque et les performances de l'analyse. Pour cela, les différents paramètres de préparation des plaques TLC ont été mis en place sur des digests de cheveux modernes, avant d'appliquer les conditions sélectionnées à un échantillon archéologique, les cheveux de la momie PLM7_T119 (cf. Chapitre C – Partie 1.1.1. Tableau C.1).

Les travaux présentés dans cette partie ont fait l'objet du stage de Master 1 de Florian Maennling²⁹⁵ et ont fourni les premiers résultats pour cette application.

2.2.2. Développements préliminaires sur des digests de cheveux modernes

L'optimisation des paramètres du couplage s'est donc concentrée sur un échantillon de cheveux modernes européens (EuropeM), préparé selon le protocole de protéomique mis en place dans le Chapitre C, Partie 2.

▣ Préparation de la plaque et paramètres d'analyse

Les analyses présentées dans cette partie ont été préparées et exécutées selon les paramètres suivants :

- Dépôts de 10 μ L de digest de cheveux modernes européens (soit environ 50 pg de digest déposé pour une quantité initiale de cheveux de 1 mg), par 5 dépôts de 2 μ L. Les premiers tests et la comparaison du type de plaque ont été effectués en mode « *spotting* », avant de s'intéresser aux conditions de l'élution.
- Matrice SA à 20 mg/mL, dépôt à l'aérographe, 2 couches de 1 mL,
- Logiciel *TLCMALDI* : Zones analysées correspondant aux dépôts ou à une ligne de migration, dans le cas du mode élution. 1 spectre tous les 0,5 mm, 5 points Y par spectre (sur la largeur de la zone – 5 mm), pour un nombre total de tirs laser de 1000.
- Analyse par la méthode LP12 à 74,5 % de la puissance laser.

▣ Comparaison des types de plaque

Le couplage direct TLC-MALDI-MS avait été initialement développé pour l'analyse de peptides et de petites protéines^{89,90}. Depuis, un certain nombre de travaux ont été menés, se basant sur des plaques TLC en phase directe^{107,291}, mais aussi sur des plaques TLC en phase inverse²⁹⁶. Pour l'application de cette approche TLC-MS aux digests capillaires, ces deux types de plaques ont donc été testés. Les conditions de préparation des plaques avant analyse, qui ont été mises au point sur les plaques en phase directe, ont également été appliquées à la préparation des plaques TLC en phase inverse. Les résultats d'analyse par TLC-MALDI-MS ont été confrontés aux spectres obtenus pour une analyse de l'échantillon d'intérêt sur cible en acier inoxydable.

Sur les deux types de plaque, il est ainsi possible de détecter la présence des peptides capillaires pour un dépôt de 10 μ L. De plus, les deux spectres obtenus sur plaque TLC présentent un signal important de la matrice, pouvant induire une perte de sensibilité, qui n'est pas visible sur cible en acier inoxydable (Figure D.21).

En TLC en phase inverse, la comparaison avec les analyses sur cible a mis en évidence deux différences majeures (Figure D.21.A et B). Tout d'abord, une perte des peptides les plus lourds ($m/z > 5\ 000$) est observée, ce qui pourrait être dû à l'adsorption de ces peptides lourds plus en profondeur dans la phase stationnaire, les rendant ainsi peu accessibles au laser. Une étape d'« extraction » par un

solvant (Partie 1.1.5) pourrait être bénéfique, afin de permettre une meilleure capacité de détection de ces composés. En revanche, les peptides de bas m/z (< 3000) sont mieux détectés sur plaque TLC que sur cible. La perte des peptides les plus lourds, peptides majoritaires, au moment du processus de désorption/ionisation, pourrait avoir favorisé la détection des peptides minoritaires de bas poids moléculaire, qui seraient plus proches de la surface de la plaque et donc plus accessibles au laser.

En TLC en phase directe, globalement tous les peptides détectés sur cible sont présents sur les spectres TLC-MALDI, et ce malgré le signal important de la matrice (Figure D.21.A et C).

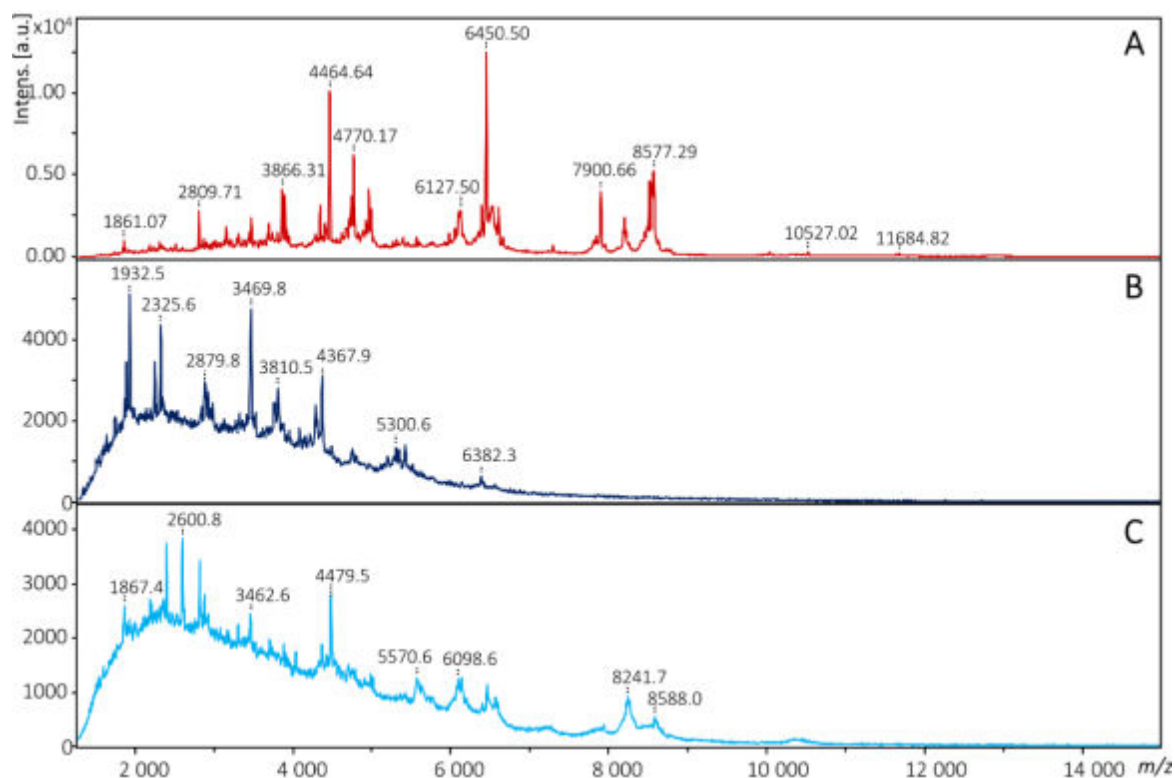


Figure D. 21 – (A) Spectre MALDI MS du digest de cheveux européens modernes (EuropeM) sur cible en acier inoxydable. Matrice : SA 10 mg/mL (Eau UP/ACN 1:1 0.1% TFA) ; Méthode LP12 ; 69,4 % de la puissance laser. Spectres MALDI-MS de digests de cheveux de EuropeM, déposés en « *spotting* » sur une plaque TLC en phase inverse (B) et une plaque TLC en phase normale (C). Matrice SA 20 mg/mL (Eau UP/ACN 1:1 0.1% TFA) ; Méthode LP12 ; 74,5 % de la puissance laser.

Il semblerait donc, d’après ces résultats, que les plaques TLC en phase directe soient les mieux adaptées, dans ces conditions, pour l’analyse par TLC-MALDI-MS de digests de kératines.

☒ Choix de l’éluant

Trois éluants décrits dans la littérature pour la séparation de peptides ont été testés.

Développement par un mélange ACN/TFA/Eau UP

Le premier éluant était constitué d’un mélange ACN/TFA/Eau UP (60:3:37, v/v/v)²⁹⁶ qui a été appliqué à la séparation d’un digest peptidique non dessalé en TLC en phase inverse. L’absence de dessalage

pour cette expérience visait à déterminer la possibilité de séparer, directement sur la plaque, les peptides, des sels du tampon d'extraction ou de digestion, et ce sans étape de dessalage sur SPE.

Malgré des résultats prometteurs, avec la détection de peptides à des R_f compris entre 0,81 et 0,96, le dépôt de matrice n'était pas suffisamment homogène et des cristaux se sont donc formés en surface, ce qui a gêné l'analyse de la totalité de la ligne de migration. De même, le digest n'ayant pas été dessalé, les sels de l'échantillon ont rendu le dépôt difficile (échantillon hétérogène) et formés des cristaux sur la plaque, qui ont aussi gêné l'analyse. Cette expérience devra donc être répétée, avec un dépôt de matrice homogène et un échantillon dessalé au préalable.

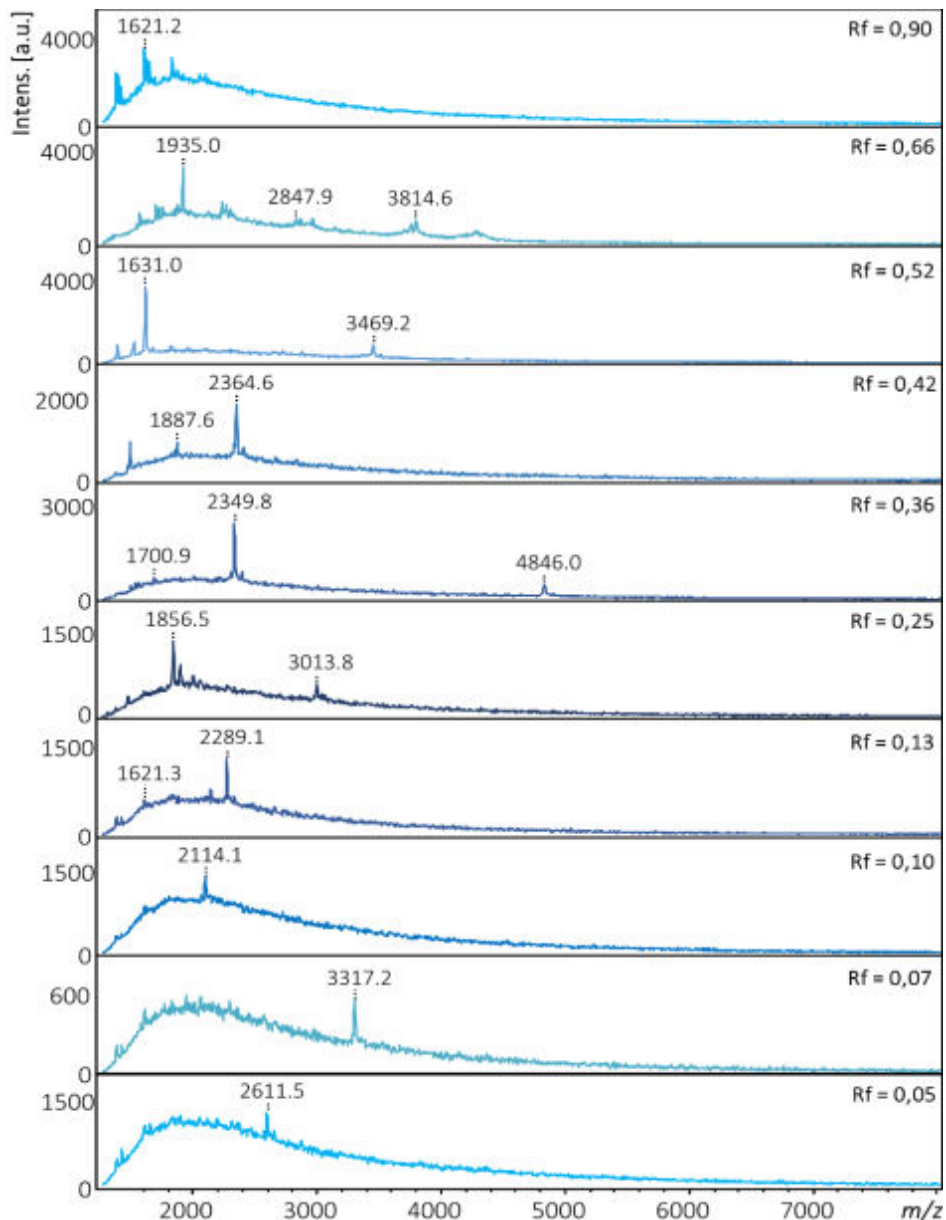


Figure D. 22 – Spectres MALDI-MS de peptides de cheveux modernes (EuropeM), séparés par TLC en phase inverse à l'aide de l'éluant n PrOH/TFA/Eau UP (40:5:55). 10 μ L de digest déposés ; Matrice : SA 20 mg/mL (Eau UP/ACN 1:1 0,1% TFA) ; Méthode LP12 ; 74,5 % de puissance laser.

Développement par un mélange DCM/MeOH

Le deuxième éluant testé était un mélange DCM/MeOH (3:1, v/v)⁷⁹, pour la séparation en TLC en phase directe d'un digest de kératines, dessalé sur SPE. Cet éluant n'a cependant pas permis la séparation des peptides, qui sont restés au niveau du dépôt initial.

Développement par un mélange iPrOH/TFA/Eau UP

Le dernier éluant qui a pu être testé jusqu'à présent était constitué d'un mélange iPrOH/TFA/Eau UP (40:5:55, v/v/v)²⁹⁶, pour la séparation en TLC en phase inverse d'un digest de kératines, dessalé sur SPE. Cet éluant a permis l'obtention d'une bonne séparation des peptides d'intérêt. Ainsi, le long de la ligne de migration, différents peptides capillaires ont pu être détectés (Figure D.22).

2.2.3. Premiers résultats pour un digest de cheveux archéologiques

Dans la partie précédente, un éluant efficace a pu être appliqué à la séparation sur phase inverse d'un digest peptidique de cheveux modernes européens, en vue de l'analyse par MALDI-MS, dans le cadre du couplage direct TLC-MALDI-MS. Les conditions de préparation de la plaque TLC ont ensuite été appliquées à un digest de cheveux archéologiques, pour son analyse par TLC-MALDI-MS.

▣ Description de l'échantillon

L'échantillon d'intérêt pour cette partie était les cheveux de la momie PLM7_T119 (2 123 - 1 777 cal. BC – Chapitre C, Partie 1.1. Tableau C.1), retrouvée sur le site archéologique Playa Miller 7 sur la côte Pacifique dans la région d'Arica-Parinacota.

La réalisation du protocole d'extraction-digestion a mis en évidence une faiblesse de la structure des fibres, compte tenu de la facilité de solubilisation de l'échantillon en comparaison aux cheveux modernes. De plus, les analyses protéomiques ont mis en évidence une dégradation avancée des protéines capillaires (cf. Chapitre C - Partie 3).

▣ Mise en œuvre du couplage

- Préparation de l'échantillon : Protocole de protéomique P3 (cf. Chapitre C – Partie 2.2.2) appliqué à 1 mg de cheveux
- TLC en phase inverse
- Dépôts de 10 µL, en % dépôts successifs de 2 µL,
- Elution par un mélange iPrOH/TFA/Eau UP (40:5:55, v/v/v), puis 4 h au dessiccateur,
- Matrice SA à 20 mg/mL, dépôt à l'aérographe, 2 couches de 1 mL,

- Logiciel *TLCMALDI* : Zone analysée de 61 x 5 mm, depuis le dépôt initial jusqu'au front de migration. 1 spectre tous les 0,5 mm, soit 123 spectres pour la ligne entière. 5 points Y par spectre (sur la largeur de la zone – 5 mm), pour un nombre total de tirs laser de 1000.
- Analyse par la méthode LP12 à 74,5 % de la puissance laser.

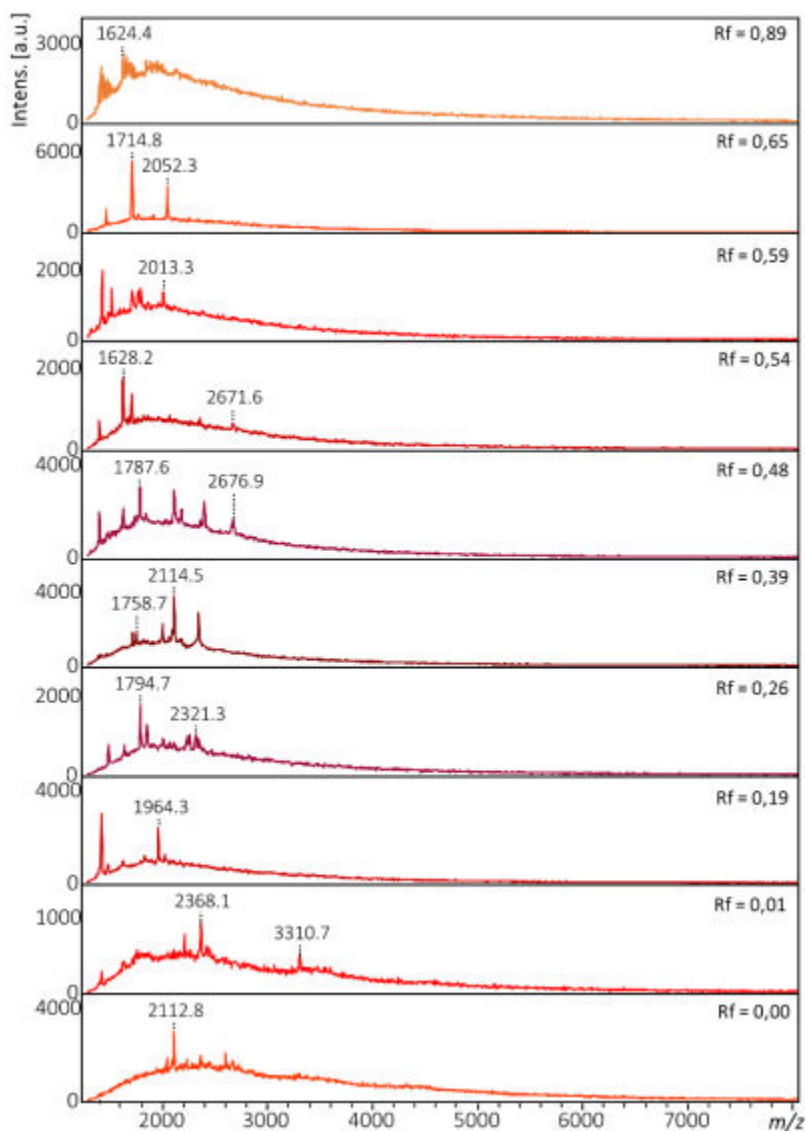


Figure D. 23 – Spectres MALDI-MS de peptides des cheveux de la momie PLM7_T119, séparés par TLC en phase inverse à l'aide de l'éluant *n*PrOH/TFA/Eau UP (40:5:55). 10 μ L de digest déposés ; Matrice : SA 20 mg/mL (Eau UP/ACN 1:1 0,1% TFA) ; Méthode LP12 ; 74.5 % de puissance laser.

📄 Résultats

Les analyses MALDI-MS en continu sur la ligne de migration ont montré la présence de peptides séparés, sur toute longueur de cette ligne (Figure D.23). Certains de ces peptides étaient bien visibles sur le spectre MALDI-MS de PLM7_T119, et d'autres peptides, qui étaient probablement masqués par les composés majoritaires sur cible classique, sont désormais détectés. Il faut cependant noter que les

peptides des cheveux archéologiques semblent être moins nombreux, et distribués sur une gamme de m/z plus basse que pour des cheveux modernes.

2.2.4. Conclusion

L'approche TLC-MALDI-MS, développée dans cette partie des travaux, a donc été optimisée sur des digests de cheveux modernes et a pu être appliquée à l'étude d'un digest de cheveux de momies.

Les différents tests mis en œuvre ont permis de démontrer l'obtention de meilleures performances en *spotting*, dans le cas de plaques TLC en phase normale. Cependant, les éluants mentionnés dans cette partie ayant été adaptés de la littérature, ils ont été appliqués aux digests d'intérêt suivant les mêmes conditions de séparation et selon le même type de plaque. De fait, nous avons pu séparer les peptides de cheveux modernes, à l'aide du mélange *i*PrOH/TFA/Eau UP (40:5:55, v/v/v), sur une plaque TLC en phase inverse.

Ces conditions de séparation des peptides ont donné des résultats prometteurs pour la séparation et l'analyse de digests de cheveux archéologiques par TLC-MALDI-MS.

Cette dernière partie concernait ainsi les premiers résultats obtenus pour la mise au point du couplage direct TLC-MALDI-MS, dans le cadre de l'analyse de digests de cheveux anciens. Les expériences réalisées doivent bien sûr être approfondies. Notamment, il s'agira de choisir un bon éluant pour la séparation des peptides de kératines sur phase directe, qui donne accès à une meilleure détection que sur phase inverse. Il faudra également s'attacher à optimiser les quantités engagées.

3. Conclusion et perspectives

Dans cette partie, nous avons mis en place au laboratoire le couplage direct TLC-MALDI-MS. Une première phase a consisté à optimiser les différentes conditions de préparation des plaques TLC et à mettre au point les paramètres instrumentaux pour la mise en œuvre de l'analyse MALDI-MS, directement sur la plaque chromatographique. Ce long travail de développement était primordial et a dû être mené de façon rigoureuse, puisqu'il conditionne la suite des analyses. Il s'est appuyé sur les résultats de différents tests réalisés sur des composés de référence, représentant différentes familles chimiques d'intérêt (phospholipides, peptides, protéines).

Ainsi, afin d'obtenir de meilleures capacités de détection, les plaques sélectionnées sont des plaques TLC haute performance (HPTLC), qui sont placées au dessiccateur pendant un minimum de 24 heures avant tout autre traitement. Pour la conduite d'analyses en mode « *spotting* », une étape de conditionnement est nécessaire, en faisant migrer un solvant de nettoyage sur la totalité de la plaque, et ce afin de minimiser les risques de formation de cristaux hétérogènes de matrice à la surface de la silice.

Le volume d'échantillon à déposer a été fixé à 10 μL , par ajouts successifs de dépôts de 2 μL , avec un temps d'attente entre chaque ajout, afin de laisser l'échantillon pénétrer dans la silice. En mode élution, la plaque HPTLC est alors développée par un système de solvants adapté à l'application souhaitée, puis séchée 5 min sous un flux d'air froid et placée au dessiccateur pendant un minimum de 3 heures. Ces étapes de séchage sont un point crucial de la préparation de la plaque, puisqu'elles permettent la réduction du taux d'humidité de la phase stationnaire, ce qui facilite l'introduction dans le spectromètre de masse.

La matrice peut alors être déposée (DHB à 50 mg/mL ou SA à 20 mg/mL dans Eau/ACN 1:1, v/v), par l'action d'un aérographe. Deux couches de 1 mL de matrice sont appliquées et 10 min de séchage sous un flux d'air froid vertical sont effectuées après chaque application. Une étape de 2 min de désorption par une pellicule de MeOH peut être nécessaire préalablement au dépôt de la matrice. Celle-ci a pour but de permettre aux analytes adsorbés en profondeur de remonter vers la surface de la plaque, et ce afin de faciliter leur ionisation dans la source MALDI.

Finalement, la zone d'analyse est sélectionnée à l'aide du logiciel de couplage TLC-MALDI de Bruker Daltonics et les analyses sont effectuées à l'aide des méthodes MS : RP à 73,7 % de la puissance laser, LP12 à 74,5 % de la puissance laser et CVX à 74,8 % de la puissance laser.

Les paramètres du couplage TLC-MALDI-MS ainsi optimisés, il a été possible pour la première fois de détecter des protéines de plus de 20 kDa par cette approche et la technique peut désormais être mise

en application de façon efficace et reproductible sur des phospholipides présents à faible concentration, puisque la LOD déterminé pour cette classe de composés en mode « élution » est de 250 pm déposées, soit une concentration de 25 μM .

Concernant les peptides et protéines de moins de 20 kDa, les résultats obtenus sur le digest de cytochrome C ont montré qu'il était possible de détecter et identifier ce composé de manière sensible et reproductible, pour une quantité déposée pouvant descendre en dessous de 20 pmol, soit une concentration inférieure à 1,6 μM .

En revanche, bien que la BSA ait pu être détectée en mode « *spotting* » jusqu'à une quantité déposée de 125 pmol, les résultats en mode « élution » ont mis en évidence un manque de reproductibilité pour les protéines de plus de 20 kDa, et seules des quantités déposées de 5 nmol ont pu être détectées pour ces expériences.

Cette approche donne également une idée de la polarité des analytes, par rapport aux rapports frontaux observés, ce qui peut aider à confirmer ou réfuter les hypothèses concernant l'identification des analytes.

Finalement, le couplage a été appliqué à l'étude de deux systèmes archéologiques: un matériau organique soluble et un digest de cheveux de momie. Les résultats ont d'ores et déjà pu montrer l'intérêt de séparer les composés d'un échantillon en amont de leur analyse MALDI, comme dans le cas de l'extrait organique de poterie archéologique, pour lequel cette approche a permis l'identification de composés minoritaires qui n'étaient pas visibles en MALDI-MS sur cible classique. Dans ce cas de l'analyse du digest capillaire, les premiers résultats prometteurs ont permis la séparation des peptides du digest et leur détection en MS. Cette application doit être étudiée davantage, afin d'optimiser les performances de l'analyse (sensibilité notamment).

Ces applications ont démontré la possibilité de caractériser des systèmes archéologiques complexes, et ce, même en utilisant un minimum de matière brute.

Le couplage a cependant montré des points délicats qu'il faudra par la suite approfondir, afin de pouvoir appliquer cette technique sans difficultés. Notamment, la calibration pour ces analyses s'avère extrêmement délicate et ne permet pas une calibration correcte pour tous les composés étudiés. De plus, des écarts de masse et de profils sont observés par rapport à la littérature et aux analyses sur cible.

Enfin, à l'image de l'archéomatériau organique soluble étudié dans ce chapitre, certains composés d'une même famille peuvent être répartis sur une zone d'analyse assez longue et ne sont pas tous visibles sur un même spectre du fait de cette dispersion. Il pourrait être utile de disposer d'un outil permettant de sommer les spectres en X, afin de pouvoir obtenir un spectre global correspondant à une seule et même famille de composés.

Chapitre E

-

Traitement, interprétation et gestion des données dans le cadre de projets interdisciplinaires

La conduite de projets interdisciplinaires génère des données expérimentales propres à des disciplines très différentes, tels que des informations archéologiques, des résultats d'analyses physico-chimiques, des données géographiques, etc. Pouvoir gérer, structurer, associer ou encore intégrer ces différentes informations, afin d'en favoriser d'une part la diffusion, mais surtout l'interprétation, constitue pour les chercheurs un enjeu crucial.

Dans ce dernier chapitre, deux travaux réalisés dans le cadre de mes recherches sont abordés selon deux objectifs distincts :

1. La mise en place d'une étude statistique, dans le but d'interpréter les données expérimentales générées par les études protéomiques, et l'influence des paramètres archéologiques sur celles-ci,
2. Le développement d'une base de données archéométrique interne au groupe de recherche, pour favoriser la gestion, la mise en disposition des informations et l'interprétation des résultats des analyses.

1. Statistiques et interprétation des données de protéomique

Les méthodes statistiques permettent, de manière générale, d'analyser, puis de regrouper un ensemble de données numériques, caractéristiques d'un groupe, pour un sujet d'étude donné. Ces approches permettent ainsi de décrire et d'expliquer les résultats obtenus, afin d'aider à leur interprétation, de mettre en évidence les relations pouvant exister entre eux, ou encore de valider des hypothèses formulées.

Dans le cadre des recherches en contexte archéométrique, ces techniques statistiques sont de plus en plus utilisées, puisqu'elles permettent d'appréhender, de la manière la plus globale possible, les différents résultats d'analyses physico-chimiques obtenus. Il est ainsi possible, pour un corpus d'étude regroupant des artefacts d'époques ou de sites archéologiques différents, d'établir des interprétations ne s'appuyant pas seulement sur une observation des données relatives à chacun de ces artefacts, mais sur une observation globale, prenant en compte les interactions pouvant exister entre les différentes variables (individu, site, âge, etc.).

Dans le cas de notre projet d'étude de cheveux de momies, une telle technique permettrait de mettre en évidence des interactions significatives entre les différentes variables (par exemple, si l'état de conservation d'un échantillon de cheveux est plutôt influencé par le site d'origine ou par son âge) ou encore de regrouper les échantillons présentant des données similaires, grâce au modèle final mis en place. Ce deuxième point pourrait aider à identifier une momie d'origine inconnue (époque, site d'origine, type de momification, etc.), grâce à l'attribution de celle-ci à l'un des groupes formés par la méthode statistique, et ce, sur la base des données expérimentales recueillies en analysant ses cheveux.

Dans le cadre de ces travaux de recherche, un modèle statistique, pour l'interprétation des données d'analyses physico-chimiques propres à notre projet, est actuellement en cours, en collaboration avec Myriam Maumy-Bertrand, membre de l'équipe de Modélisation et Contrôle de l'Institut de Recherche Mathématique Avancée (IRMA, Université de Strasbourg). La mise en place du modèle final est actuellement en cours, mais il a malgré tout été possible, à partir des résultats présentés dans le Chapitre C, Partie 3, de réaliser les premières analyses statistiques, grâce au logiciel XLSTAT (Addinsoft), combiné à Microsoft Excel.

1.1. Analyse de la variance pour plans à mesures répétées

La variance permet de caractériser la dispersion des mesures d'intérêt autour de leur moyenne. Cependant, lorsqu'une valeur est mesurée plusieurs fois de suite avec un paramètre qui varie (mesures répétées), l'analyse de la variance classique n'est plus applicable, car la condition d'indépendance des mesures n'est plus vérifiée et la variabilité « inter-sujets » doit maintenant être prise en compte. Dans ce cas, l'utilisation de l'analyse de la variance (ANOVA – *ANalysis Of VAriance*) pour des plans à mesures répétées est recommandée. Lorsque l'une des variables est représentée par des données quantitatives, c'est une analyse de co-variance qui doit être effectuée (ANCOVA – *ANalysis of COVAriance*).²⁹⁷

1.2. Première application de l'ANCOVA pour l'approche protéomique

1.2.1. Théorie appliquée au projet de caractérisation des cheveux de momies

Pour ce projet, une ANCOVA est plus adaptée qu'une analyse de variance classique. En effet, chaque mesure étudiée sur un échantillon de cheveux (pourcentage de peptides modifiés par exemple) est répétée pour chacune des six kératines capillaires majoritaires d'intérêt. De plus, l'une des variables de notre modèle représente l'âge des échantillons, et est donc une variable quantitative. Dans ce contexte, les premières analyses statistiques ont alors été basées sur une ANCOVA.

Les variables d'intérêt pour notre étude sont soit qualitatives : les individus ou les momies, les sites d'origine, et les kératines d'intérêt – facteur pour lequel les mesures sont répétées, soit quantitatives : l'âge des individus. La variable à représenter correspond, pour cette première application, au pourcentage de peptides modifiés. Nous avons ensuite fixé trois interactions à étudier : les interactions Kératine*Age, Kératine*Site et Kératine*Individu, afin d'observer l'influence de ces facteurs sur les modifications observées sur les kératines.

Une fois ces différents critères définis, l'analyse de la covariance peut être lancée. Les résultats sont générés sous forme de tableaux et de graphes, permettant d'une part de vérifier la bonne corrélation des données au modèle et d'autre part, de visualiser les différentes relations entre les variables d'intérêt.

Cette application ne constitue qu'un premier aperçu des résultats pouvant être obtenus par une analyse statistique des données. Elle a été mise en œuvre pour la modélisation des pourcentages de peptides modifiés, calculés pour chacune des six kératines d'intérêt, dans chacun des 16 échantillons de cheveux archéologiques du corpus.

1.2.2. Résultats de l'ANCOVA

▣ Validité du modèle

Pour les paramètres fixés, plusieurs points permettent de vérifier la validation du modèle : i) le coefficient de détermination (R^2) des données au modèle, qui est supérieur à 0,95 pour cette analyse, ii) le graphe de répartition des résidus normalisés (résidus générés par l'équation du modèle), en fonction du pourcentage de peptides modifiés. Pour ce dernier point, 95% des résidus doivent être situés entre -2 et +2, ce qui est bien le cas pour notre analyse (Figure E.1), puisque seuls deux points sur 192 au total sont situés hors de cet intervalle, soit 99 % des résidus normalisés.

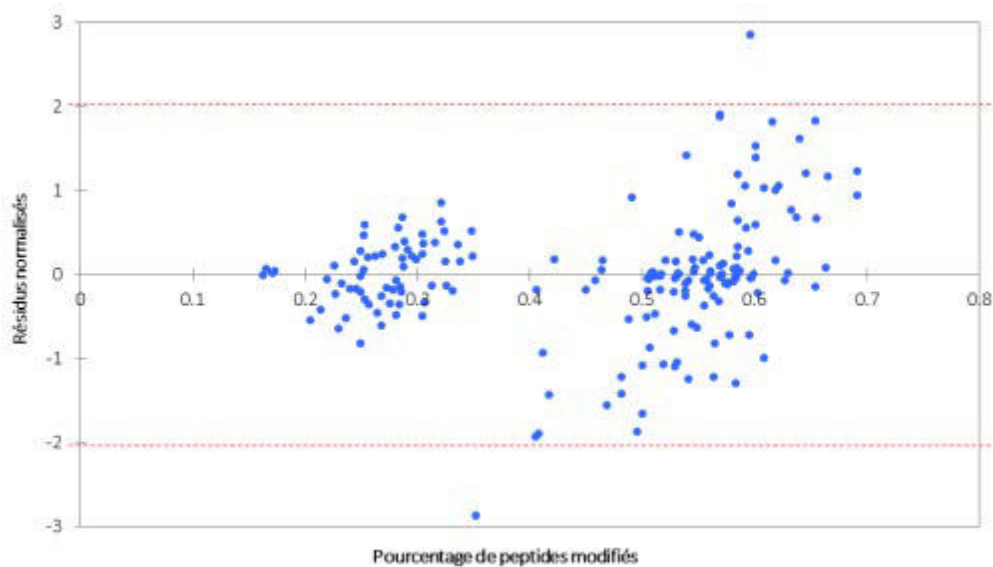


Figure E. 1 – Graphe présentant la dispersion des résidus normalisés en fonction du pourcentage de peptides modifiés.

▣ Effets des différents paramètres sur le pourcentage de peptides modifiés

Les p-valeurs calculées montrent que l'influence des facteurs principaux est significative pour les pourcentages de peptides modifiés ($p < 0,05$).

Selon les résultats représentés pour les moyennes des pourcentages, le site d'origine des momies étudiées aurait ainsi un impact sur la conservation des kératines, et plus particulièrement la conservation de la kératine K33b. En effet, sur le graphe représentant l'évolution des pourcentages moyens de peptides modifiés en fonction du site (Figure E.2.A), la variation d'un site à l'autre est clairement visible et, notamment pour le site QUI7 (site 2) par rapport aux sites PLM7 (site 1) et CAM15 (site3). Plus précisément, l'évolution du pourcentage de peptides modifiés est globalement similaire pour la majorité des kératines, à l'exception de la kératine K33b associée au site 2 (site QUI7), pour laquelle la variation de celui-ci se distingue clairement des autres (Figure E.2.B). De plus, les différents pourcentages moyens associés à chaque kératine sont plus dispersés pour QUI7, que pour PLM7 et CAM15.

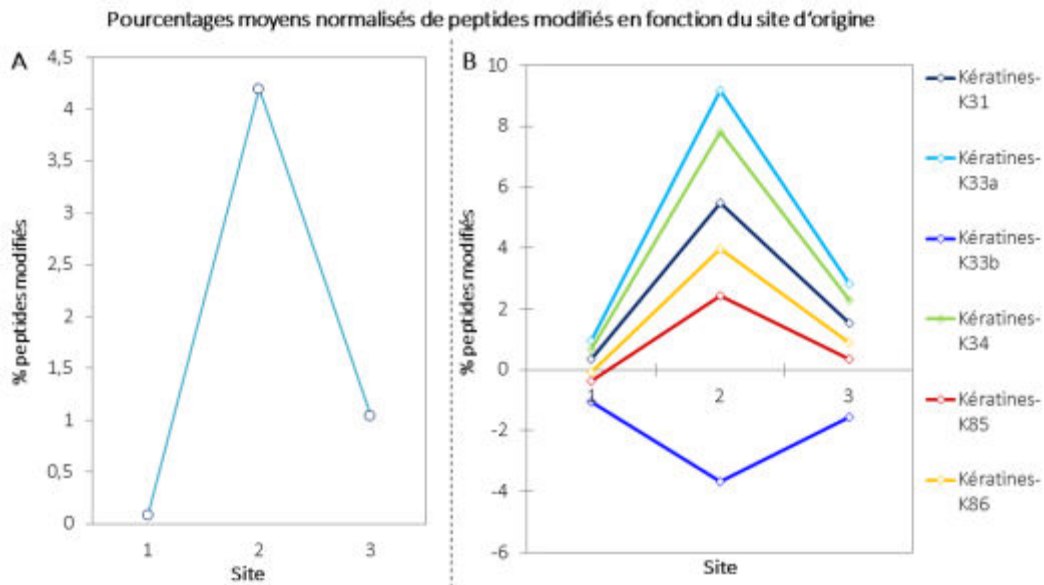


Figure E. 2 – A) Evolution du pourcentage moyen de peptides modifiés en fonction du site d'origine des échantillons. B) Evolution du pourcentage moyen de peptides modifiés pour chacune des six kératines d'intérêt, en fonction du site d'origine des échantillons. 1 : PLM7 ; 2 : QUI7 ; 3 : CAM15.

Par ailleurs, l'évolution du pourcentage de peptides modifiés moyen, en fonction de l'échantillon de cheveux de momies considéré, met en avant une légère augmentation globale de cette moyenne avec l'âge de l'échantillon (Figure E.3), ce qui est cohérent avec une dégradation moléculaire progressive de la fibre capillaire au cours du temps. De plus, il semble également que l'influence du site soit visible lorsque l'on s'intéresse de plus près aux différents points. En effet, les trois points s'écartant de cette augmentation progressive correspondent aux trois momies découvertes sur des sites différents de PLM7 (points blancs) : QUI7_T13 pour le site QUI7 (point jaune), et CAM15D_C19 et CAM15C_C3 pour le site CAM15 (points rouges). Plus particulièrement, comme observé précédemment, le site QUI7 semble avoir un impact important sur la conservation moléculaire des cheveux anciens, compte tenu de l'écart significatif entre la moyenne correspondant à QUI7_T13 et celles des autres échantillons.

Enfin, les différents pourcentages moyens de peptides modifiés pour chaque kératine ont été comparés deux à deux, selon le test de Bonferroni²⁹⁸. Celui-ci a mis en évidence une différence significative (p -valeur < 0,05) systématique entre le pourcentage moyen obtenu pour K33b et celui obtenu pour les cinq autres kératines. De plus, le test a permis de classer les kératines en deux groupes se recoupant : le groupe A, dans lequel se trouvent les protéines K31, K33a, K34, K85 et K86, et le groupe B, où sont placés K31, K33a et K33b. Ce classement montre une fois encore le comportement particulier de K33b, seule kératine non classée dans le groupe A.

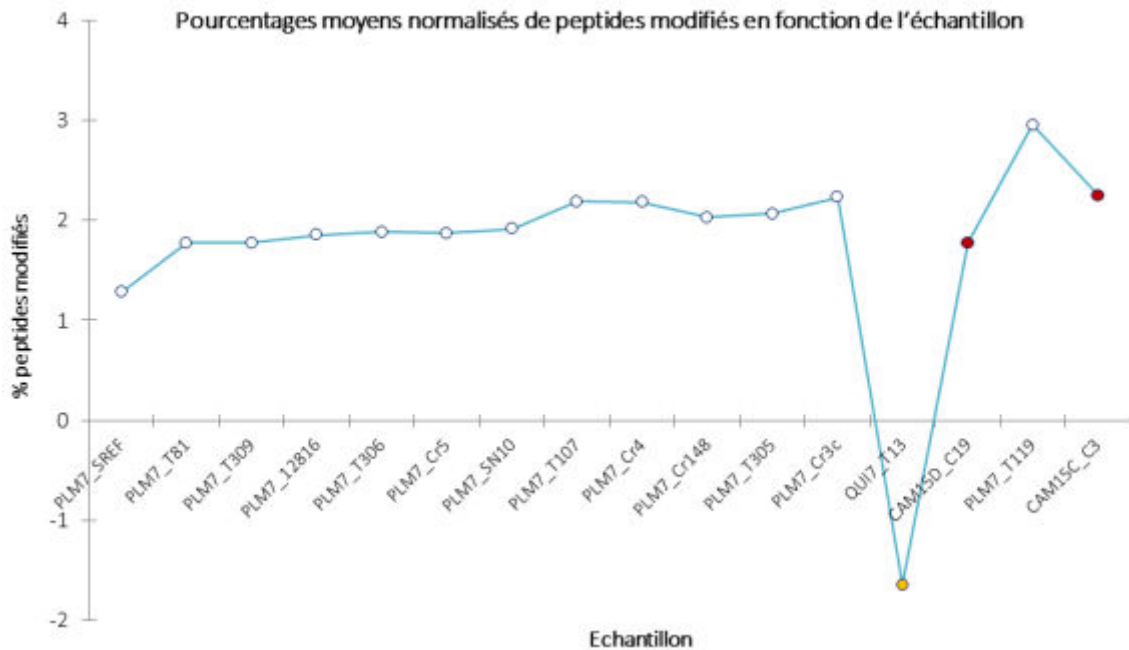


Figure E. 3 – Evolution du pourcentage moyen de peptides modifiés en fonction de l'échantillon d'intérêt (parmi les 16 échantillons de cheveux de momies du corpus). Les échantillons sont placés sur le graphe du plus récent au plus ancien (de gauche à droite). Le point jaune, correspondant à la momie QUI7_T13, est apparenté au site QUI7 ; les points rouges, associés aux momies CAM15D_C19 et CAM15C_C3, correspondent au site CAM15 ; les points blancs correspondent au site PLM7, site d'origine des 13 autres momies.

1.2.3. Conclusion sur les prémices de l'approche statistique

Cette première ANCOVA, sur les pourcentages de peptides modifiés obtenus pour chacune des six kératines majeures identifiées dans les différents échantillons du corpus, a mis en avant de premiers résultats prometteurs.

Par cette analyse, il semblerait que le site d'origine d'une momie d'intérêt ait une influence non négligeable sur la conservation moléculaire des protéines capillaires, et plus particulièrement sur la conservation de la protéine K33b. Cette hypothèse doit cependant être approfondie car elle s'appuie sur les résultats obtenus pour une seule (QUI7) ou deux momie(s) (CAM15). Il faudra donc élargir le corpus pour étudier plus de momies de ces mêmes sites, et de sites supplémentaires, afin d'étoffer le modèle et de confirmer ou réfuter cette hypothèse. De plus, l'approche statistique confirme les conclusions tirées des analyses protéomiques dans le Chapitre C, Partie 3, à savoir que le pourcentage de peptides modifiés augmente avec l'âge de l'échantillon. Compte tenu de sa singularité, K33b pourrait représenter une cible idéale, pour le suivi des modifications moléculaires dans les cheveux anciens.

Par la suite, il s'agira de mettre en œuvre cette approche statistique pour d'autres grandeurs caractéristiques du vieillissement (déamidations des asparagines et glutamines, et oxydations des cystéines), mais aussi pour un plus grand nombre de momies.

2. Création d'une base de données archéométrique

La conduite de projets interdisciplinaires génère de nos jours d'importantes quantités de données provenant de sources multiples, qui constituent les « *big data* », dont la gestion représente un enjeu majeur. Cette problématique nécessite une réflexion nouvelle dans le but de favoriser l'interdisciplinarité et le partage des connaissances, et ce afin d'aller plus loin dans l'interprétation des données.

Dans le cas de projets archéométriques, domaine interdisciplinaire combinant des études archéologiques, ethnologiques, anthropologiques, géologiques et physico-chimiques entre autres, ces données peuvent être des rapports de fouilles archéologiques et de prélèvements, des photographies des artefacts ou des sites étudiés, des données expérimentales, etc. Autant d'informations de formats variés qu'il faut pouvoir mettre en relation, afin d'en tirer les conclusions relatives aux questionnements sur les artefacts étudiés (âge, origine, composition, état de conservation, etc.) et de structurer au mieux ces connaissances. Ce regroupement et recoupement d'interprétations issues de disciplines multiples permettrait ainsi d'atteindre un impact plus large dans les publications scientifiques. A notre connaissance, aucune base de données archéométriques et plus particulièrement, de bases intégrant à la fois des données historiques et des données expérimentales physico-chimiques (analyses élémentaires, structurales et moléculaires) sont disponibles.

La problématique de cette dernière partie du travail de thèse était donc de créer un outil original, permettant de regrouper pour chaque échantillon, non seulement les données d'analyses chimiques réalisées au laboratoire, mais aussi celles des analyses effectuées à l'extérieur, les rapports de prélèvement, les données historiques et géographiques relatives à cet échantillon, les publications y faisant référence, etc. Cette base a pour vocation d'être utilisée en interne sur tous les projets relatifs à un contexte archéologique, et vise ainsi une meilleure mise en commun des informations. Plus particulièrement, il s'agit de regrouper les informations historiques et archéologiques, les résultats d'analyses relatifs aux différents échantillons archéologiques analysés, mais également des données relatives aux échantillons modernes servant de référence dans l'interprétation des données expérimentales. Notre outil permettra également de faciliter la reproduction des expériences par les membres impliqués dans ces projets, grâce à l'enregistrement des protocoles et paramètres d'analyse.

Il s'agit ici de décrire la conception de notre base de données archéométrique, depuis la mise en place du cahier des charges, jusqu'au développement de la base. Cette partie a été réalisée suite à l'ANF (Action Nationale de Formation) « Comment concevoir une base de données en

archéométrie ? », organisée conjointement par le réseau CAI-RN (Compétences Archéométriques Interdisciplinaires-Réseau National) et le réseau Base de Données²⁹⁹.

2.1. Phase d'audit

Cette première phase est nécessaire avant de commencer la conception de la base de données en elle-même. Elle permet d'établir le cahier des charges et se décompose en trois étapes principales : la définition des besoins, la définition du contenu, et la définition des outils de gestion et d'exploitation nécessaires.

2.1.1. Définition des besoins

La première question à se poser lors de la création d'une base de données concerne sa fonction : « A quoi va-t-elle servir ? », « Pour quoi va-t-on l'utiliser ? ». Dans le cadre de ce projet, cet outil sera utilisé dans plusieurs buts, comme gérer les données relatives aux échantillons, les structurer, les centraliser, les diffuser ou encore les sauvegarder.

Dans notre cas, il n'existe pas de base regroupant des données (spectres de masse et autres résultats d'analyse) relatifs à des références modernes ou archéologiques qui pourraient permettre des comparaisons avec les résultats d'analyse de nos échantillons. De plus, les données générées par les analyses internes sont très volumineuses (spectres MS et MS/MS, chromatogrammes, etc.), il était donc utile d'avoir un outil qui permette de les structurer et de les centraliser, afin de retrouver les informations souhaitées plus facilement. Pour faciliter le traitement et l'interprétation des résultats en termes physico-chimiques mais aussi historiques, toute autre information concernant les échantillons (prélèvement, analyses extérieures, publications, contexte, etc.) sera archivée dans cette même base.

Le second aspect majeur est de savoir qui sera concerné par la base : une seule personne ou bien un groupe de personnes ? Un seul laboratoire ou un groupe de laboratoire ? Des chercheurs du domaine ou bien le grand public ? Répondre à cette question oriente la conception vers une base plutôt locale ou plutôt publique, et permet d'adapter certains aspects, tels que le type de vocabulaire utilisé, de données mises à disposition ou encore le type d'accès fournis à l'utilisateur. Par exemple, une base de données destinée aux chercheurs et au grand public pourra offrir d'une part un accès réservé aux chercheurs pour saisir ou consulter des données et d'autre part, un accès plus limité pour le grand public qui ne pourra que consulter les types de données choisis par les concepteurs de la base.

Notre projet de base de données n'a, à l'heure actuelle, pas vocation à être diffusé. Plus particulièrement, la base s'adresse aux personnes (chercheurs, post-doctorants, doctorants et stagiaires) travaillant sur les projets internes au laboratoire et axés vers l'archéométrie.

2.1.2. Définition du contenu

Dans cette deuxième phase, il s'agit d'établir quels types de données seront nécessaires à la mise en forme de la base et surtout d'estimer le poids de celles-ci.

Le type des données mises à disposition dans une base est important pour son exploitation et son utilisation. Selon le but et le public visés, les différentes informations peuvent être des documents textuels (textes, fichiers pdf ou de la suite Office), des documents multimédias (audio, vidéo, photo), ou encore des données géométriques ou relatives à un système d'information géographique (SIG). Tous ces types de documents ayant un poids à prendre en compte dans la sauvegarde et le stockage de la base, il est utile, au préalable de la conception, d'effectuer une estimation de celui-ci.

Notre projet de base a pour but de simplifier le partage, le croisement des résultats d'analyse et la visualisation des différents projets effectués ou en cours, au sein d'un groupe de moins de 10 chercheurs du domaine. De ce fait, les types de documents à inclure n'ont aucun besoin d'être complexes, puisque tous utilisent le même langage et sont au fait des différents projets existants. Les diverses informations relatives aux échantillons seront donc simplement du texte ou des documents type Word, PowerPoint ou pdf pour tout ce qui concerne les protocoles expérimentaux, les récapitulatifs des résultats d'analyses, les fiches échantillons relatives aux analyses effectuées par des laboratoires collaborateurs ou les fiches descriptives des différents calibrants, matrices et références utilisés. Ce type de documents n'a pas une taille très importante (500 Ko maximum), ce qui nous permet de stocker cette base sur le serveur de sauvegarde du laboratoire.

Dans toute base de données, certaines informations doivent respecter un vocabulaire de référence défini par les thésaurus notamment ou par des dictionnaires de données de référence. Ce vocabulaire particulier permet, notamment pour les bases destinées à une diffusion assez large, de faciliter la recherche à l'intérieur celles-ci et d'éviter toute ambiguïté dans les informations mises à disposition, en particulier dans les échanges éventuels avec d'autres bases du domaine. Ainsi, des bases de données de référence existent déjà dans plusieurs domaines pour regrouper le vocabulaire contrôlé à utiliser selon les informations demandées, et il est possible, voire recommandé, de faire appel à celles-ci lors de la création de sa propre base.

Cette exigence facilite le travail de tous mais n'est absolument obligatoire que dans le cas de bases diffusées largement aux chercheurs du domaine ou au grand public. Dans notre cas, la base n'étant destiné qu'à une utilisation en interne, nous ne ferons pas appel à ces thésaurus et autres bases de

référence. En revanche, pour s’assurer que tous les acteurs utilisent le même langage, un vocabulaire contrôlé de recherche sera mis en place.

2.1.3. Définition des outils d’exploitation et de gestion

Le nombre important de composantes, données et documents qui constituent une base peuvent rendre sa gestion et son exploitation extrêmement complexe, ce qui risque de desservir l’intérêt principal de ce type de projet, à savoir faciliter la centralisation, la sauvegarde et le partage des informations. Pour rendre cette interface plus intuitive, il est donc nécessaire d’intégrer différents outils qui faciliteront la navigation dans la base. Par exemple, des formulaires de création d’un nouveau projet, d’un nouvel échantillon ou d’une nouvelle analyse peuvent être créés, ainsi que des outils de recherche (mono- ou multicritères) ou de filtrage, des outils de cartographie, de gestion des tâches à effectuer, d’exportation ou d’importation de documents, etc.

Pour développer sa base de données, il existe deux types de solutions : les solutions « Propriétaires » et les solutions « *Opensource* ».

▣ Solutions « *Opensource* »

Ce type de solution nécessite une interface d’administration et un système de gestion de la base de données (SGBD) qui permettent notamment la mise à jour des systèmes et la gestion de l’environnement des serveurs utilisés, et également une interface pour les utilisateurs comportant par exemple des formulaires de saisie, des outils de suppression, de recherche, etc. Ces logiciels ou SGBD en « *Opensource* » (MySQL, PostgreSQL, etc.) possèdent l’avantage d’utiliser les normes internationales, et notamment en ce qui concerne l’utilisation du langage SQL, langage de manipulation utilisé pour les bases de données. Cela peut faciliter la migration d’un SGBD à un autre si besoin, et fait des logiciels « *Opensource* » un outil très adapté pour le développement d’interfaces multi-utilisateurs. Cependant, l’utilisation de ces solutions « *Opensource* » nécessite une expertise en ce qui concerne l’utilisation du langage informatique et plus particulièrement du langage SQL, ce qui demande un temps et surtout un coût de développement non négligeables.

De ce fait, cette solution est en général choisie pour des projets à grande échelle avec accès décentralisé multi-utilisateurs, telles que celles destinées à la diffusion via une interface Web ou au partage réseau.

▣ Solutions « Propriétaires »

Ces solutions s’appuient sur un logiciel payant nécessitant une licence, tels que Access (Microsoft Windows), *FilemakerPro* ou encore Oracle. Ceux-ci possèdent de nombreux avantages, comme celui

d'intégrer en un logiciel les interfaces d'administration et d'utilisation, et le SGBD avec de nombreux outils d'aide au développement de la base de données (création des tables, création des relations, formulaires de saisie, recherche, exportation et importation de documents, etc.).

Ce type de solutions comporte cependant des points négatifs qui peuvent s'avérer extrêmement handicapants pour le futur de la base. Notamment, la plupart de ces logiciels utilisent un langage qui est soit du SQL non standard, soit un langage différent du SQL, ce qui peut empêcher une future migration de la base dans un autre SGBD. Ces solutions possèdent aussi des fonctionnalités qui s'avèrent très utiles à première vue mais qui, une fois de plus, seront gênantes lors d'une future migration, par exemple les listes à valeurs multiples de Access et FilemakerPro qui sont très différentes du langage SQL. L'utilisation de ces logiciels peut donc apporter un coût supplémentaire à la gestion de la base de données si une migration est nécessaire par la suite. Pour ce type de solutions se pose également les problèmes de compatibilité : compatibilité des nouvelles versions et des versions antérieures, ou compatibilité du logiciel en lui-même avec les différents systèmes informatiques. Access par exemple n'est compatible qu'avec Microsoft Windows, si certains des utilisateurs de la base ne travaillent pas sur ce système, choisir ce logiciel n'est pas judicieux.

Le choix des solutions « Propriétaires » pour le développement de sa base doit donc être très réfléchi, afin de ne pas avoir de mauvaises surprises dans le futur. De manière générale, ces solutions sont très attractives pour les novices et sont aussi souvent utilisées pour les projets de bases de données à petite échelle (mono-utilisateur ou interne à un petit groupe de personnes par exemple).

2.1.4. Cahier des charges pour le développement en interne de la base de données archéométrique

Le projet de conception de base de données réalisé dans ces travaux s'inscrit plus particulièrement dans une optique à petite échelle. Nous ne cherchons en effet pas à développer une base qui sera largement diffusée et utilisée par de nombreuses personnes hors du laboratoire. De plus, aucun des acteurs impliqués n'a de connaissances poussées en informatique, l'interface doit donc être simple et intuitive afin d'être utilisée facilement par tous, sans nécessiter un investissement de temps trop important. Tous les ordinateurs du laboratoire étant équipés des versions les plus récentes d'Access, nous avons donc opté pour cette solution « Propriétaire » qui permettait à un novice de développer la base de données, grâce aux différents modèles, outils et aides mis à disposition. Notamment, Access possède déjà toutes les fonctionnalités de recherche, de filtrage, d'exportation et d'importation de documents, et elles seront donc utilisables lors du développement de la base.

2.2. Développement de la base

Cette seconde phase ne peut être réalisée que lorsque le cahier des charges est clairement défini, ce qui permettra à toute personne déjà dans le projet ou intégrée après ces étapes de création de modifier la base facilement dans le futur. Trois étapes sont encore une fois nécessaires : la mise en place d'un dictionnaire de données, la réalisation des modèles conceptuel et relationnel de données (MCD et MRD), et finalement la construction de la base en elle-même.

2.2.1. Définition d'un dictionnaire de données

Le dictionnaire de données est un document Excel regroupant toutes les informations que l'on souhaite intégrer à sa base, leur type ainsi que le vocabulaire associé s'il existe. Les données sont listées, organisées en catégories et un nom spécifique et unique dans toute la base leur est donné.

Pour notre base, les différentes données ont été réparties dans cinq catégories bien distinctes :

- i) Echantillons : informations descriptives et relatives aux différents échantillons étudiés
- ii) Traitements : descriptif des traitements pré-analyse auxquels peuvent être soumis les échantillons
- iii) Méthode : descriptif des méthodes utilisées sur les différents appareils d'analyse du laboratoire (méthodes MS ou chromatographique)
- iv) Opérateur : informations relatives aux personnes effectuant les traitements et analyses
- v) Analyses : paramètres et informations descriptives du protocole analytique réalisé sur les échantillons et les résultats d'analyse qui en découlent.

Dans chacune de ces catégories sont listées toutes les informations, ou propriétés, nécessaires au suivi des projets auxquelles sont attribués des noms uniques.

Dans le dictionnaire de données, il est ensuite spécifié pour chacune de ces propriétés si elle constitue une information obligatoire ou non (valeur nulle possible ou non) et son type. En général, le type défini est une chaîne de caractères alphanumériques – VARCHAR ou CHAR(x) ou x est le nombre de caractères maximal, une date – jj/mm/aaaa – ou une pièce jointe. Egalement, avant toute étape de construction de la base, si une propriété est désignée comme possédant un vocabulaire contrôlé, les termes acceptés dans la base sont inclus dans le dictionnaire de données. Après la construction de la base dans Access, il sera possible de modifier cette liste de valeurs autorisées, qui devra alors être mise à jour dans le dictionnaire de données.

2.2.2. Réalisation des modèles conceptuel et relationnel de données

Les modèles conceptuel et relationnel de données (MCD et MRD), réalisés à l’aide du logiciel libre *OpenModelSphere version 3.2*, sont primordiaux pour la conception de la base de données puisqu’ils permettent de visualiser les informations contenues dans la base, ainsi que la manière dont les différentes catégories sont reliées entre elles. Egalement, la réalisation de ces modèles servira ensuite pour la mise à niveau de la base : une première étape consistera à mettre ces modèles à niveau, afin de bien comprendre les modifications à apporter dans la structure de la base avant de la modifier. Pour réaliser le MCD et le MRD, la connaissance de certaines notions est nécessaire.

📖 Entités et attributs

Les entités et attributs, plus simplement appelés tables et champs, correspondent aux catégories et propriétés répertoriées dans le dictionnaire de données : les cinq catégories sont les entités de la base et les propriétés qu’elles contiennent sont les attributs. Chaque entité sera ensuite constituée d’occurrences ou enregistrements qui seront décrits par les attributs : par exemple, l’entité « Opérateur » liste les différentes personnes impliquées dans la réalisation des analyses. Ce sont ces différents opérateurs qui sont appelés occurrences.

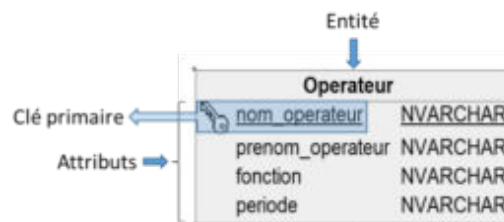


Figure E. 4 – Exemple d’entité et ses attributs.

Celles-ci constituent la base du MCD. Sa réalisation commence par la création des entités et de leurs attributs, et leur description en termes de valeur obligatoire ou non, de type de données, de valeur initiale, etc. (Figure E.4).

📖 Associations et cardinalités

Les associations et cardinalités décrivent les relations entre les différentes entités (Figure E.5). Les associations correspondent à la nature de cette relation, à ce qu’elle signifie. Une association peut, comme une entité, contenir des attributs. Par exemple sur la Figure E.5, l’entité « Analyse » est en relation avec l’entité « Opérateur » selon l’association « a été réalisée par », ce qui signifie que telle analyse a été réalisée par tel opérateur.

Les cardinalités quant à elles apportent une précision sur ces relations. Chaque cardinalité représente le nombre de participations des occurrences d’une entité donnée aux occurrences d’une association

donnée. Cette participation est représentée par un indicatif du type « x,y », où x est la cardinalité minimale et y la cardinalité maximale. X et y peuvent prendre trois valeurs :

- i) 0 : participation optionnelle
- ii) 1 : participation obligatoire
- iii) n : multiplicité de la participation.

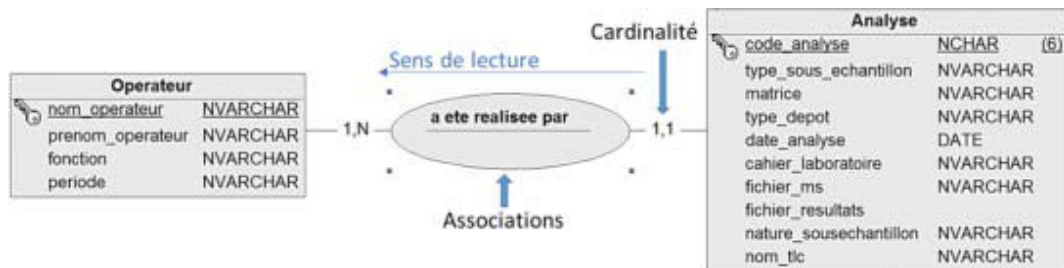


Figure E. 5 – Exemple de relation décrite par une association et des cardinalités.

Par exemple sur la Figure E.5, une et une seule occurrence de l’entité « Analyse » participe à l’association « a été réalisée par » et une ou plusieurs occurrences de l’entité « Opérateur » participent à l’association « a été réalisée par », ce qui veut dire qu’une analyse est réalisée par un seul opérateur mais qu’un opérateur peut réaliser une ou plusieurs analyses.

▣ Définition des clés primaires et étrangères

Les clés primaires sont des identifiants uniques à chaque occurrence d’une entité, ce qui permet d’éviter tout doublon lors de la saisie des données. Celui-ci peut être un identifiant existant – par exemple dans la Figure E.6, la clé primaire est le nom de famille de l’opérateur – ou est créé de façon automatique ou manuelle, lors de la saisie des informations relatives à l’occurrence dans la base de données – clé artificielle. Cette deuxième option est préférentiellement utilisée dans la plupart des bases puisqu’elle permet d’assurer l’unicité de chaque identifiant. Il faut noter que l’unicité d’une occurrence peut être définie par plusieurs attributs, dans ce cas ceux-ci sont appelés « clés candidates » et une clé candidate est alors choisie pour être la clé primaire.

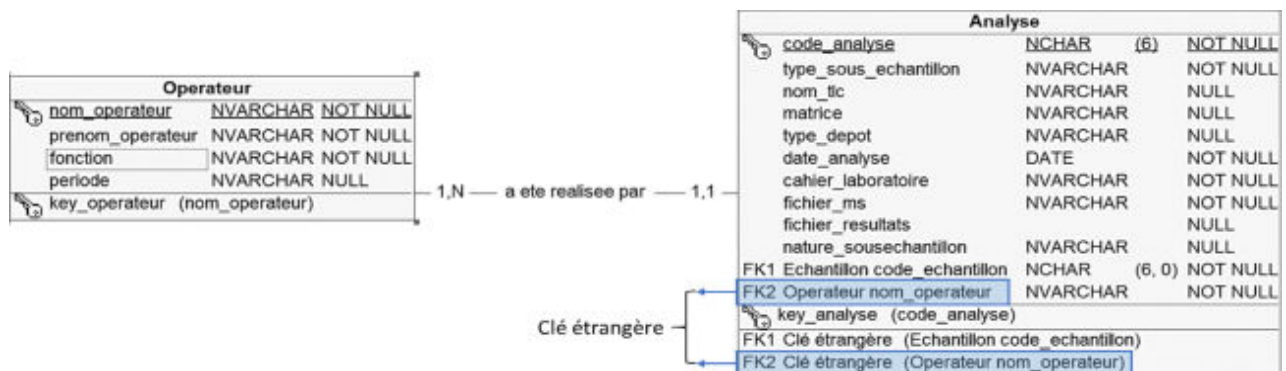


Figure E. 6 – Exemple d’intégration via des relations de clés étrangères dans une entité.

Ces clés primaires sont ensuite utilisées pour établir les relations entre les entités. Pour une relation établie entre les entités 1 et 2, la clé primaire de l'entité 1 devient alors un attribut de l'entité 2 et est appelée clé étrangère dans l'entité 2. Dans l'exemple de la Figure E.6, la clé primaire de l'entité « Opérateur » devient clé étrangère de l'entité « Analyse ». Cette dernière a donc un nouvel attribut : « nom_opérateur ». Les deux entités sont alors liées entre elles par cet attribut, ce qui assure la cohérence de la base.

☒ Conversion du modèle conceptuel en modèle relationnel

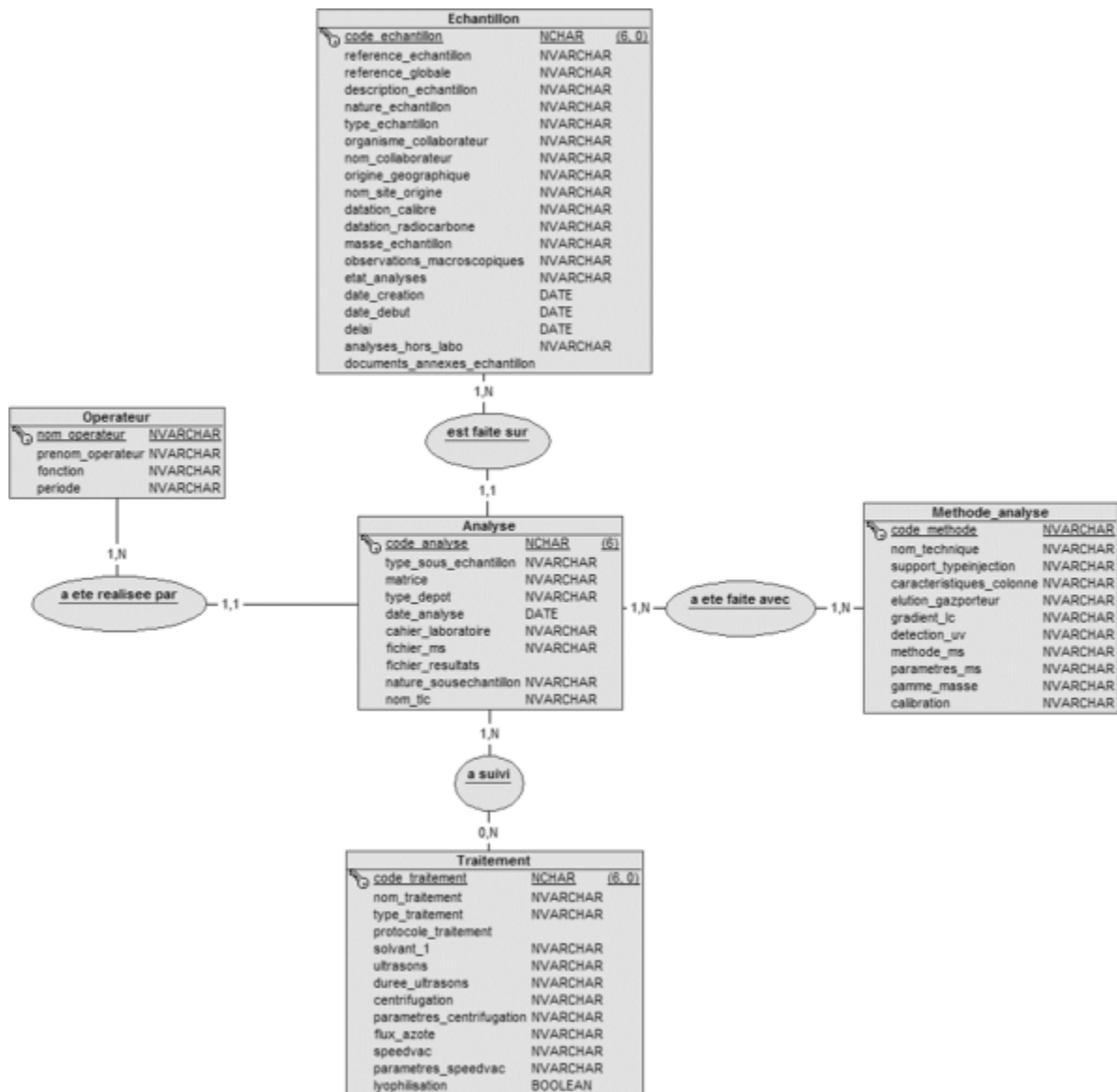


Figure E. 7 – Modèle conceptuel de données de la base de données archéométrique créée dans le cadre de cette thèse.

La Figure E.7 montre le MCD de la base de données archéométrique qui a été créée dans le cadre de cette thèse pour les projets archéométriques internes au laboratoire. Sur ce modèle simple, seuls les entités, attributs, relations – associations et cardinalités – et les clés primaires sont visibles, ce qui

permet de visualiser l’organisation globale de la base et les données qui seront disponibles, ainsi que leur type. Cependant, ce modèle ne montre pas comment les relations entre les entités seront représentées dans la base ; pour cela, il faut convertir le MCD en MRD.

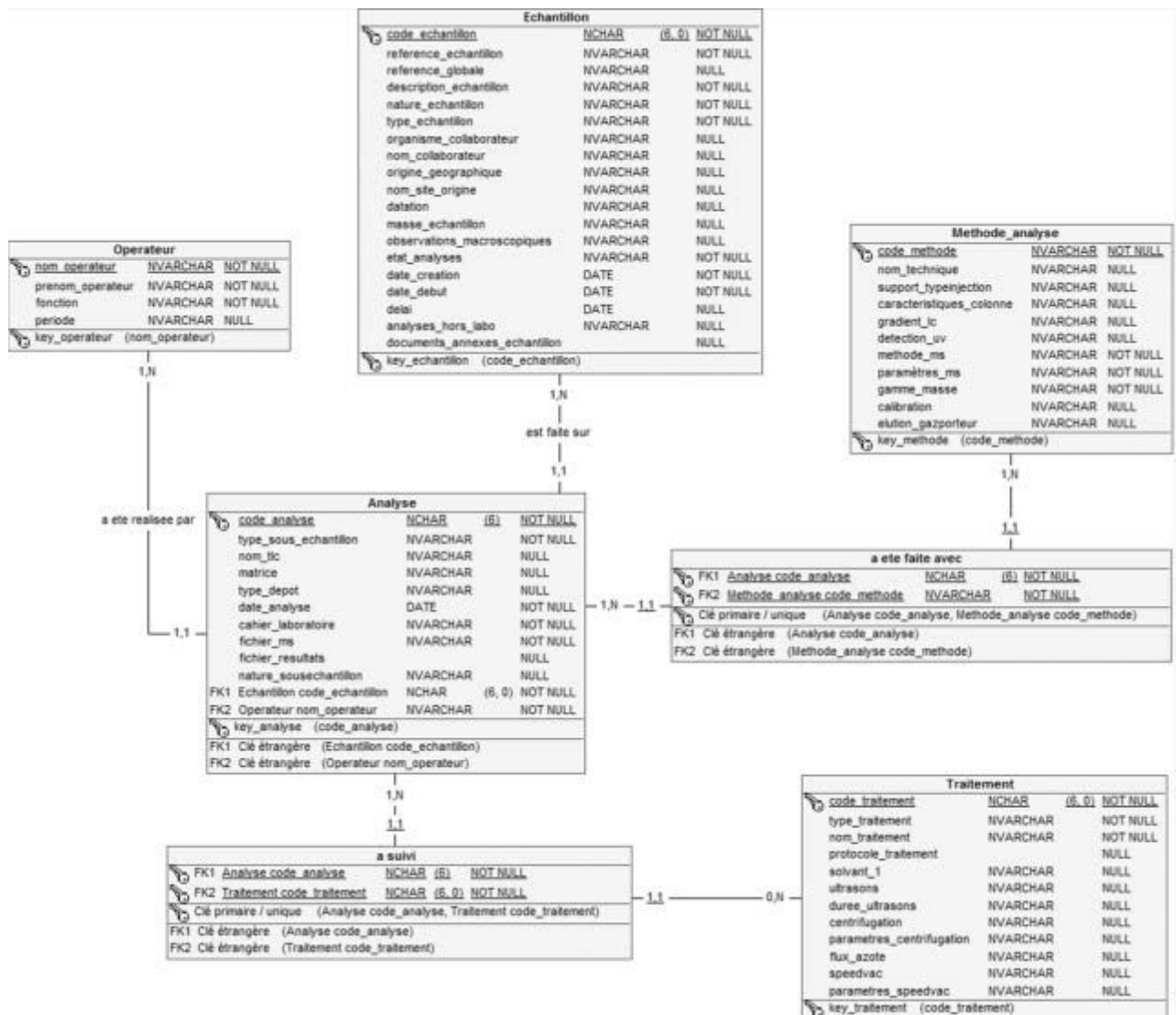


Figure E. 8 – Modèle relationnel de données de la base de données archéométrique créée dans le cadre de cette thèse.

Lors de cette étape, les entités deviennent des tables et les attributs deviennent des champs. La conversion en MRD (Figure E.8) permet de rendre visible la présence de clés étrangères dans les tables et donc la façon dont celles-ci sont reliées entre elles. Pour les relations binaires de type (x,n)-(x,1) – avec x = 0 ou 1 (voir ci-dessus le paragraphe « Associations et cardinalités »)– la clé primaire de la table de cardinalité (x,n) est dupliquée dans la table de cardinalité (x,1) et devient clé étrangère de celle-ci, comme pour l’exemple de la Figure E.6. Egalement, pour les relations de type binaire (x,n)-(x,n), l’association est convertie en une table à part entière dont la clé primaire est composée des clés primaires des deux tables en relation, qui sont également les clés étrangères de la nouvelle table,

comme sur la Figure E.8 pour la relation entre « Analyse » et « Traitement », ou « Analyse » et « Méthode_analyse ».

Le MRD peut alors être reconverti en MCD, afin de visualiser l'organisation générale de la base avec les nouvelles tables créées.

2.2.3. Construction du modèle physique de données

La construction du modèle physique de données, autrement dit de la base de données en elle-même, est la dernière étape du processus de création. Elle inclut le choix du système de gestion de la base de données pour le développement et la phase de tests et d'ajustements.

▣ Conversion du modèle relation en modèle physique

Une fois la solution de développement choisie, dans notre cas Access (Partie 1.1.4), la base de données physique peut être réalisée, en construisant manuellement les tables et leurs champs, ainsi que les relations, puis les différents formulaires utiles, grâce aux fonctionnalités du logiciel Access.

▣ Phase de tests et ajustements

A la fin de la construction du modèle physique et avant toute utilisation de routine, il est nécessaire de tester les fonctionnalités de la nouvelles base, en saisissant des données-test dans les tables, à l'aide ou non des différents formulaires. Selon les problèmes et dysfonctionnements observés, des ajustements sont alors effectués. Cette phase est extrêmement importante, puisqu'il est en général difficile de modifier la structure même de la base, sans supprimer toutes les données, une fois celle-ci validée et mise à disposition des utilisateurs. Par exemple, dans le cas d'une base qui n'aurait pas été validée par cette phase de test avant son utilisation, si une modification de la structure doit être effectuée après quelques mois, et donc après la saisie d'importantes quantités de données, une étape de vérification des informations saisies sera nécessaire pour s'assurer de leur validité.

Il est donc important de suivre toutes les étapes de la conception, et de savoir exactement ce que l'on veut faire dans un projet de base de données, afin de pouvoir obtenir un modèle physique final qui corresponde aux objectifs et qui ne nécessite que peu d'ajustements ou de mises à niveau futurs.

2.3. Conclusion

Après avoir suivi les étapes de la mise en place du cahier des charges et la création des MCD et MRD, nous avons construit notre base en commençant par la mise en place des différentes tables et l'entrée des champs (colonnes des tables) déterminés par le dictionnaire de données. Grâce aux fonctionnalités du logiciel, les relations entre les tables ont été créées facilement sans avoir recours à l'écriture de lignes de code informatique. Dans la version la plus évoluée (Figure E.9), des formulaires de listing permettent de visualiser rapidement tous les échantillons étudiés et les analyses effectuées, ainsi que la totalité des informations les concernant. Des formulaires de saisie et de listing des différents échantillons et analyses ont également été créés afin de faciliter la saisie des données et de rendre l'utilisation de la base conviviale pour tous les membres du groupe de chercheurs concerné.

La base de données est désormais opérationnelle depuis 2 ans, et répertorie d'ores et déjà les informations et résultats d'analyse relatifs à plus de 170 échantillons et environ 1500 analyses. Afin de faciliter l'utilisation de la base pour tous les acteurs du groupe de recherche et leur permettre la réalisation d'éventuelles modifications, un tutoriel a également été rédigé.

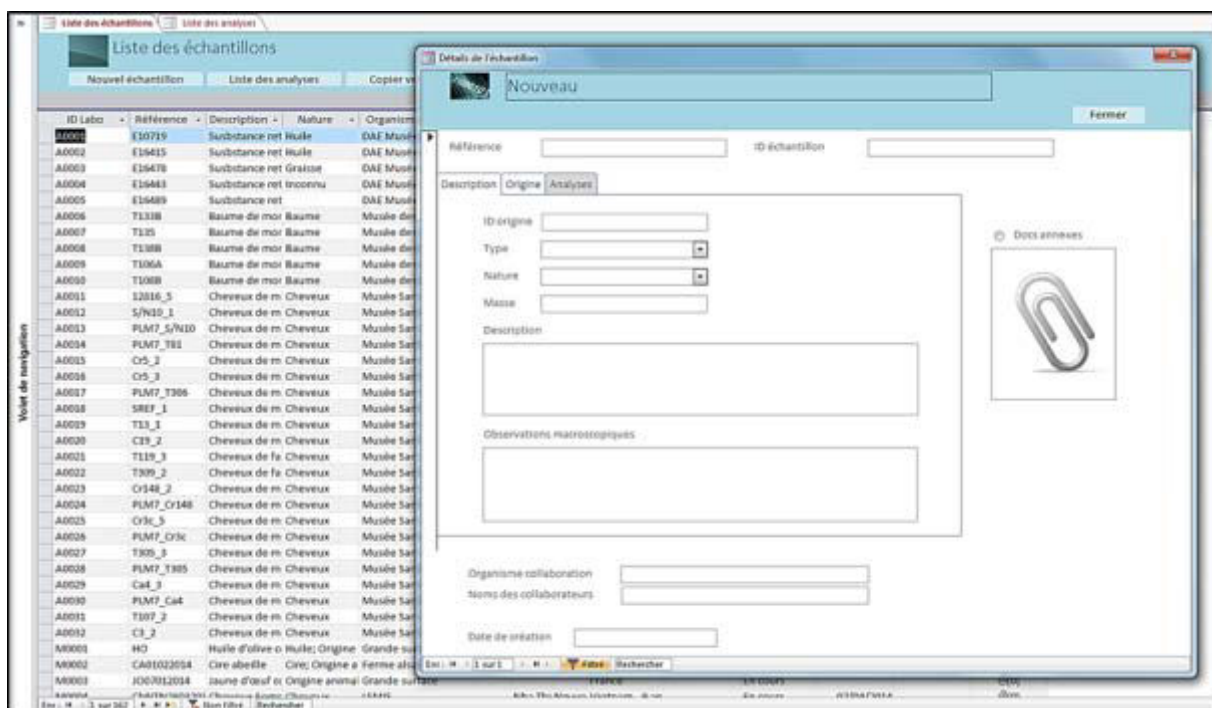


Figure E. 9 – Design final de la base de données archéométrique créée dans le cadre du projet de thèse.

Conclusion générale et perspectives

Nous avons tout d'abord concentré ces travaux de recherche sur la mise en place d'une stratégie interdisciplinaire pour l'étude des fibres capillaires archéologiques et celle de leur état de préservation, à partir de l'observation globale et structurale de celles-ci et de leur caractérisation élémentaire et moléculaire. Les analyses morphologiques préliminaires au SEM avaient montré une conservation variable de la cuticule des cheveux anciens, selon l'échantillon considéré. Malgré cela, une bonne conservation structurale de la surface des fibres capillaires archéologiques avait pu être mise en évidence par les analyses FTIR.

L'approche protéomique mise en place au cours de ces travaux apporte un regard neuf et plus approfondi sur l'étude de cheveux de momies, puisqu'elle donne accès principalement aux protéines corticales, mais aussi cuticulaires, extraites au cours du traitement. Elle a non seulement aidé à identifier les protéines des fibres anciennes avec de bons scores d'identification et de bons taux de recouvrement, mais aussi à caractériser les kératines majoritaires, grâce à l'étude des PTMs, et plus particulièrement des déamidations des asparagines et glutamines, et des mono-, di- et trioxydations des cystéines. Ce dernier point favorise la compréhension des processus de dégradation moléculaire des fibres capillaires et celle de l'influence de l'environnement sur leur état de conservation. Cette étude a ainsi permis, pour la première fois, de mettre en évidence des indicateurs moléculaires de dégradation des cheveux et offre de nouvelles perspectives dans la recherche de biomarqueurs de dégradation des protéines spécifiques au contexte archéologique.

Les résultats présentés dans ce manuscrit constituent les prémices de l'application de notre approche protéomique pour la caractérisation des cheveux de momies. Celle-ci doit maintenant être approfondie, notamment en s'intéressant aux modifications induites par la présence de métaux lourds dans la fibre. Les analyses élémentaires, menées dans le cadre de ces travaux, par SEM-EDS, XRF et PIXE, ont en effet mis en évidence la présence d'un certain nombre de métaux lourds dans les cheveux des momies du corpus, à l'image de Mn, Fe, Hg, As et Pb, et ont permis d'émettre des hypothèses quant à l'origine probable de ces éléments – exogène, endogène ou mixte.

Du point de vue d'une caractérisation strictement élémentaire, l'étude pourrait également être approfondie. Contrairement à ce qui pouvait être attendu au vu des données environnementales et des observations d'ossements de momies issues des sites de fouilles d'intérêt, l'arsenic a été détecté dans moins de 50 % des échantillons étudiés. Cette observation pourrait être due à une exposition moins importante que prévu, et donc à une concentration dans les fibres capillaires plus faible que ce que nous attendions. Les analyses PIXE permettent de détecter la présence d'éléments traces (teneurs supérieures à 1 ppm). Cependant, les quantités présentes en As dans les échantillons du corpus pourraient être en réalité de l'ordre de l'ultra-trace (inférieures à 1 ppm). Pour s'assurer de cela, il faudrait réaliser des analyses par LA-ICP-MS, permettant la détection et la quantification de composés

présents à l'état d'ultra-traces dans un seul cheveu, ce qui donnerait aussi accès à un suivi temporel de l'exposition d'un individu à différents éléments, grâce à une analyse depuis la racine jusqu'à la pointe de la fibre.

Dans le cadre de la stratégie interdisciplinaire mise en place, outre la détermination de la composition élémentaire des fibres capillaires anciennes et de l'origine des différents éléments détectés, les analyses élémentaires XRF et PIXE présentent plusieurs enjeux supplémentaires, en lien direct avec l'approche protéomique.

D'une part, la présence des métaux lourds peut influencer l'état de conservation moléculaire des cheveux archéologiques (protection contre les attaques microbiennes par exemple²⁴⁰). Il est donc intéressant de voir que les différences observées dans l'état d'avancement de la dégradation moléculaire d'un échantillon de cheveux anciens par rapport aux autres peuvent être, dans certains cas, corrélées avec la présence de métaux lourds. Ceci semble être le cas pour les cheveux de la momie PLM7_T305, recouverts d'un pigment rouge à base de fer, ou ceux de la momie PLM7_Cr3c contenant une importante quantité de As. Les analyses protéomiques des échantillons de cheveux irradiés lors des analyses PIXE vont également dans ce sens. Les résultats obtenus ont non seulement montré que cette méthode, dite non-destructrice, n'est pas sans effet sur la conservation moléculaire des échantillons biologiques, mais également que les différences de comportement des échantillons testés (notamment une certaine résistance à l'altération) pourraient être dues à la présence de métaux lourds dans les cheveux, comme dans le cas de PLM7_T305.

Enfin, les résultats des analyses élémentaires constituent des données de référence pour l'application des techniques de spectrométrie de masse à l'étude de la présence des métaux lourds dans les cheveux archéologiques, et de leurs interactions avec les protéines capillaires. Pour cet aspect, les réflexions se sont focalisées sur l'arsenic et seront, à terme, étendues aux différents métaux lourds observés. Plus particulièrement, la recherche des PTMs correspondant à une addition d'arsenic ou d'un de ses métabolites permettrait de discriminer l'arsenic endogène de l'arsenic exogène. Les premiers tests développés dans ces travaux ont ainsi eu pour objectif d'étudier la possibilité de détecter la présence de peptides arséniés dans les digests de cheveux, par les analyses MS/MS. Les premiers résultats n'ont cependant pas été concluants et l'étude doit être poursuivie.

D'un point de vue plus spécifique aux analyses protéomiques, il faudra par la suite approfondir le traitement des échantillons et des données MS/MS, afin d'aller plus loin dans la caractérisation des cheveux archéologiques.

Plus particulièrement, concernant le protocole, l'éluant appliqué pour le dessalage des digests peptidiques n'est constitué qu'à 50 % de ACN. Ceci pourrait limiter l'élution des peptides les plus

hydrophobes, possédant une plus grande affinité avec la phase C18 qu'avec l'éluant, et risquerait donc d'induire une perte d'informations relatives aux différents échantillons. Afin de confirmer ou de réfuter cette hypothèse, une seconde élution pourrait être appliquée sur les cartouches SPE après le dessalage, à l'aide d'un solvant plus hydrophobe, et l'éluat récupéré, analysé par nanoLC-MS/MS.

Le traitement des données, et notamment les recherches dans les bases de données de protéomique, sont également à approfondir. Les résultats présentés dans ce travail de thèse ont été obtenus, grâce aux recherches basées sur des critères pouvant être restrictifs. En particulier, un premier paramètre spécifique que les peptides recherchés doivent suivre les règles de coupure de la trypsine (coupures spécifiques après les résidus lysine et arginine). Ce critère ne permet pas l'identification de peptides dont les sites de coupures se situent au niveau d'autres résidus. De plus, les logiciels utilisés demandent de spécifier les PTMs recherchées, avec un nombre limité. Les échantillons archéologiques ayant été conservés pendant des siècles dans des conditions souvent méconnues, il est difficile de pouvoir réellement prévoir quelles PTMs peuvent être exprimées sur les protéines. Afin de compléter les résultats d'identification et de caractérisation des protéines, il faudra donc effectuer une recherche sur tous les peptides, en ne définissant aucune enzyme et aucune PTM attendue. Des premiers tests de recherche sur *ProteinPilot* pour un échantillon moderne et un échantillon archéologique ont été menés. Les résultats ont montré qu'il serait *a priori* possible d'identifier, grâce à ces critères, plus de 90 % des peptides détectés, pour les cheveux modernes et archéologiques, contre moins de 20 % avec les critères restrictifs. De plus, les protéines identifiées au cours de ce test correspondent bien à celles identifiées pour les recherches restrictives correspondantes.

Enfin, plusieurs perspectives relatives à la recherche de marqueurs de dégradation moléculaire des protéines découlent de ces recherches.

La première concerne les observations sur les spectres MALDI-MS réalisés pendant la mise au point du protocole final. Ces spectres mettent en effet en évidence une distribution des peptides de cheveux anciens sur une gamme de m/z plus faible et plus étroite que pour les peptides de cheveux modernes. Ces observations soulèvent ainsi l'hypothèse d'une fragmentation progressive des protéines au cours du temps par coupure des liaisons peptidiques, ce qui correspond à une voie de dégradation bien connue des protéines. Dans ce cas, les proportions en peptides courts et longs identifiés par l'approche protéomique devraient être représentatives de ces observations dans les échantillons modernes et archéologiques. Pour vérifier cela, les proportions des peptides de différentes longueurs ont été calculées à partir des recherches tests non restrictives mentionnées précédemment. Les résultats n'ont cependant montré aucune différence significative entre les cheveux modernes et les cheveux archéologiques. Ceux-ci s'appuient sur seulement un échantillon de chaque type et ne peuvent donc pas être considérés comme représentatifs. Il s'agira par la suite de vérifier ce point pour les différents échantillons du corpus. De plus, une seconde hypothèse pourrait expliquer les

différences observées en MALDI-MS. En effet, l'étude des PTMs a montré une contribution plus importante des oxydations des cystéines sur les peptides de cheveux archéologiques. Cette oxydation induit une forte charge négative sur le peptide modifié, ce qui a probablement détérioré l'efficacité d'ionisation de celui-ci en mode positif. Ceci expliquerait une perte de détection des peptides oxydés, plus nombreux dans le cas des cheveux archéologiques que pour les cheveux modernes. Une analyse MALDI-MS en mode négatif des digests dessalés pourrait ainsi être mise en œuvre pour vérifier cet aspect.

Comme mentionné au cours de ce manuscrit, les ponts disulfures sont les principaux responsables de la résistance des cheveux, mais peuvent être impactés par différentes PTMs, à l'image des oxydations des cystéines. Notamment, la mise en œuvre de l'approche protéomique sur les cheveux de momie du corpus a soulevé l'hypothèse de la dégradation par oxydation de ces ponts disulfures au cours du temps, fragilisant ainsi la cohésion des fibres capillaires anciennes et favorisant leur solubilisation. Par conséquent, l'étude des ponts disulfures présents dans les échantillons d'intérêt devra être approfondie. D'une part, le protocole de préparation des échantillons pourrait être mis en œuvre sans agent réducteur, afin de conserver les ponts disulfures existant dans l'échantillon. Cela permettrait de confirmer ou réfuter l'hypothèse formulée quant à l'altération des ponts disulfures dans les fibres capillaires archéologiques. De même, la mise en place d'un protocole d'alkylation différentielle, adapté du protocole développé au cours de ces recherches, pourrait donner une idée du nombre de cystéines impliquées dans les ponts disulfures, et de celles qui ne le sont pas. Une telle approche pourrait donc aussi aider à confirmer ou non une altération des ponts disulfures au cours du temps. D'autre part, une autre enzyme que la trypsine, l'endoprotéinase AspN, pourrait apporter des réponses pour la mise en évidence d'une sur-oxydation des cystéines des cheveux archéologiques³⁰⁰. AspN est en effet une enzyme coupant les protéines du côté N-terminal des acides aminés à courte chaîne latérale acide, et plus particulièrement au niveau de l'acide aspartique, et des acides cystéines sulfinique et sulfonique (cystéine di- et trioxydée). Ceci permettrait la localisation des sites de di- et trioxydations dans les cheveux analysés.

Il faut noter que d'autres pistes, différentes de l'approche protéomique « *bottom-up* » mise en place, existent pour l'étude de l'altération des protéines capillaires liée au vieillissement en contexte archéologique. Celles-ci sont principalement basées sur l'hydrolyse totale de l'échantillon, telles que la détermination de la composition en acides aminés ou l'étude de la racémisation de l'acide aspartique par exemple, et n'ont donc pas été abordées dans ces travaux.

La seconde partie des travaux a concerné la mise en place du couplage direct TLC-MALDI-MS au laboratoire, pour l'analyse de systèmes complexes et précieux, à l'image des archéomatériaux

organiques et biologiques. Le choix des plaques TLC, ainsi que la mise au point des différentes conditions de préparation des plaques et des paramètres d'analyses en MS, s'est effectué à l'aide de composés de référence modernes, représentant les différentes familles chimique d'intérêt, à savoir les lipides, les peptides et les protéines.

Ce développement a ainsi permis de limiter les quantités d'échantillon à mettre jeu, point crucial dans l'étude des matériaux précieux, et d'optimiser les performances analytiques, en termes de sensibilité et de résolution notamment. Les conditions de préparation mises en place ont permis pour la première fois de détecter une protéine entière de plus de 20 kDa à l'aide de ce couplage, et ont également montré des premiers résultats prometteurs pour la séparation, la détection et l'identification de composés de natures différentes dans un mélange complexe.

Ce couplage présente cependant un certain nombre de limites qu'il faudra par la suite dépasser. En effet, les différentes expériences ont montré un manque de reproductibilité dans les performances d'analyse, et plus particulièrement pour la détection des protéines de plus de 20 kDa. De plus, un problème de précision de masse est apparu tout au long de la phase de développement, avec des différences de m/z , par rapport à la littérature et aux analyses sur cible en acier inoxydable, pouvant aller jusqu'à 5 Da, en fonction de la nature chimique des composés d'intérêt. Ce point constitue un problème majeur, puisque cela risque de compromettre la caractérisation d'un échantillon de composition inconnue. Les raisons à l'origine de ces décalages, non observés dans la littérature, sont encore mal comprises (irrégularités de surface dues au dépôt de la matrice ou à la phase stationnaire, problème de calibration, etc.). Il s'agira donc pour la suite de s'attacher à la compréhension de ce problème et à sa résolution.

L'application du couplage direct TLC-MALDI-MS à l'analyse d'archéomatériaux organiques et biologiques a mis en évidence l'apport de cette approche pour la caractérisation de ces systèmes complexes de composition inconnue et ce, même en utilisant un minimum de matière brute. De fait, l'analyse par TLC-MALDI-MS des matériaux organiques solubles extraits d'une poterie archéologique a permis d'accéder à l'identification de composés minoritaires, non visibles en MALDI-MS sur cible classique. De plus, il a été possible de séparer sur phase inverse et de détecter en MALDI-MS les peptides capillaires de cheveux modernes et archéologiques. Ces premiers résultats sont prometteurs, mais l'application de cette approche doit être étudiée davantage, afin d'optimiser les performances de l'analyse des archéomatériaux (sensibilité notamment). Il s'agira également de choisir de nouveaux éluants, pour une meilleure séparation des peptides de kératines ou pour une séparation sur phase directe, ce qui donnerait accès à une meilleure détection que sur phase inverse.

Le couplage direct TLC-MALDI-MS a été mis en place pour l'analyse de systèmes complexes et précieux nécessitant une caractérisation structurale précise, ce qui implique également les systèmes

possédant un lien direct avec la biologie cellulaire. Certaines protéines membranaires ne présentent une activité que lorsqu'elles sont en association avec des lipides, à l'image des lipides membranaires – phospholipides, glycolipides, etc. On parle alors de protéines lipidées. Dans ce contexte, la TLC-MALDI-MS directe aiderait à caractériser à la fois ces lipides et les protéines associées, sur des quantités d'échantillon moindres, seules disponibles en biologie cellulaire. Les optimisations du couplage ayant été réalisées à l'aide de composés de référence directement liés à la composition de ces systèmes biologiques cibles (protéines et phospholipides), la prochaine étape sera donc d'appliquer notre approche à l'analyse de ces protéines membranaires et des lipides associés.

Ainsi d'un point de vue archéologique et dans le contexte de l'étude des cheveux de momies préhispaniques de la côte andine, la stratégie interdisciplinaire dans laquelle s'inscrit l'approche protéomique mise en place a apporté des informations nouvelles, relatives aux questionnements des archéologues. Comme détaillé précédemment, ces informations concernent l'état de conservation des cheveux de momies et l'influence de l'environnement sur la préservation des cheveux et sur leur composition élémentaire.

De plus, notre approche protéomique pourrait, à terme, prouver l'existence d'une contribution endogène en métaux lourds importante, et plus particulièrement en As, ayant eu des effets notables sur la santé des civilisations préhispaniques andines. Par ailleurs, de récentes analyses microbiologiques³⁰¹ ont montré la détérioration de la peau des momies conservées au Musée San Miguel de Azapa (Université de Tarapacá), par action de microbes induisant une activité kératinolitique et collagénolitique. Les cheveux étant majoritairement constitués de kératines, ces microbes pourraient aussi avoir une influence sur leur état de préservation. L'étude des PTMs sur les données expérimentales protéomiques pourraient ainsi permettre de rechercher spécifiquement l'empreinte de cette activité microbienne sur les cheveux de momies, au niveau moléculaire.

Il faut rappeler que l'interprétation des données physico-chimiques dépend des informations disponibles sur le contexte archéologique, qui peuvent être différentes selon les régions ou époques d'intérêt, les types de momification concernés, etc. De ce point de vue, il est nécessaire de compléter ces informations.

D'une part, il faudrait effectuer des analyses environnementales permettant de mieux appréhender, entre autres, les conditions d'exposition des momies aux métaux lourds selon le site étudié. Par exemple, dans la région d'Arica-Parinacota, la teneur en As est très variable (concentration de l'ordre de 200 µg/L près des sites PLM7 et QUI7, contre environ 1 000 µg/L dans la rivière Camarones). La connaissance du site d'origine d'une momie peut ainsi aider à interpréter une teneur en As importante, ou plus faible qu'attendu, dans les cheveux de celle-ci.

De plus, les momies analysées dans ces travaux ont principalement été découvertes sur le site Playa Miller 7, et seules trois momies ont été découvertes ailleurs, sur les sites Quiani 7 et Camarones 15. Ainsi, il pourrait être intéressant d'élargir le corpus en incluant plus de momies d'autres sites que PLM7, notamment des sites QUI7 et CAM15, mais aussi d'autres sites non étudiés de la côte et de l'altiplano, afin d'avoir une meilleure représentativité sur la région et de pouvoir en tirer des conclusions plus fiables d'un point de vue statistique. Elargir le corpus donnerait également accès à une meilleure représentativité au niveau des époques impliquées.

Le modèle statistique en cours de développement pourrait ainsi être appliqué à ce corpus élargi et mettre en évidence des critères archéologiques (époque, site d'origine, type de momification, etc.) ayant une influence significative sur la conservation moléculaire ou les teneurs en métaux lourds par exemple. Dans ce cas, l'étude des cheveux d'une momie inconnue par cette stratégie interdisciplinaire, associée au modèle statistique établi, pourrait corroborer les hypothèses quant à son époque ou son site d'origine notamment, sur la base des résultats d'analyses physico-chimiques (teneurs en métaux lourds, état de conservation des protéines, etc.).

En conclusion, ce travail de recherche a permis de montrer l'apport des techniques d'analyse par spectrométrie de masse à la caractérisation des archéomatériaux organiques et biologiques, disponibles en faibles quantités, dans le cadre de projets interdisciplinaires. Comme développé dans ce manuscrit, les approches mises en place présentent également un intérêt majeur pour la compréhension des systèmes biologiques modernes.

Références bibliographiques

- (1) Taru, P.; Backwell, L. Identification of Fossil Hairs in Parahyaena Brunnea Coprolites from Middle Pleistocene Deposits at Gladysvale Cave, South Africa. *J. Archaeol. Sci.* **2013**, *40* (10), 3674–3685.
- (2) Sepulveda, M.; Gutierrez, S.; Campos-Vallette, M.; Clavijo, E.; Walter, P.; Carcamo, J. J. Raman Spectroscopy and X-Ray Fluorescence in Molecular Analysis of Yellow Blocks from the Archeological Site Playa Miller 7 (Northern Chile). *J. Chil. Chem. Soc.* **2013**, *58* (3), 1836–1839.
- (3) Kakoulli, I.; Prikhodko, S. V.; King, A.; Fischer, C. Earliest Evidence for Asbestos Composites Linked to Byzantine Wall Paintings Production. *J. Archaeol. Sci.* **2014**, *44*, 148–153.
- (4) Kakoulli, I.; Prikhodko, S. V.; Fischer, C.; Cilluffo, M.; Uribe, M.; Bechtel, H. A.; Fakra, S. C.; Marcus, M. A. Distribution and Chemical Speciation of Arsenic in Ancient Human Hair Using Synchrotron Radiation. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (1), 521–526.
- (5) Arriaza, B.; Amarasiriwardena, D.; Cornejo, L.; Standen, V.; Byrne, S.; Bartkus, L.; Bandak, B. Exploring Chronic Arsenic Poisoning in Pre-Columbian Chilean Mummies. *J. Archaeol. Sci.* **2010**, *37* (6), 1274–1278.
- (6) Charrié-Duhaut, A.; Porraz, G.; Cartwright, C. R.; Igreja, M.; Connan, J.; Poggenpoel, C.; Texier, P.-J. First Molecular Identification of a Hafting Adhesive in the Late Howiesons Poort at Diepkloof Rock Shelter (Western Cape, South Africa). *J. Archaeol. Sci.* **2013**, *40* (9), 3506–3518.
- (7) Adam, P.; Schaeffer, P.; Schmitt, G.; Bailly, L.; Courel, B.; Fresnais, M.; Fossurier, C.; Rohmer, M. Identification and Mode of Formation of Hopanoid Nitriles in Archaeological Soils. *Org. Geochem.* **2016**, *91*, 100–108.
- (8) Charrié-Duhaut, A.; Connan, J.; Rouquette, N.; Adam, P.; Barbotin, C.; de Rozières, M.-F.; Tchaplá, A.; Albrecht, P. The Canopic Jars of Rameses II: Real Use Revealed by Molecular Study of Organic Residues. *J. Archaeol. Sci.* **2007**, *34* (6), 957–967.
- (9) Arriaza, B. Arseniasis as an Environmental Hypothetical Explanation for the Origin of the Oldest Artificial Mummification Practice in the World. *Chungara Rev. Antropol. Chil.* **2005**, *37* (2), 255–260.
- (10) Standen, V. G.; Arriaza, B. T.; Santoro, C. M.; Romero, á.; Rothhammer, F. Perimortem Trauma in the Atacama Desert and Social Violence during the Late Formative Period (2500-1700 Years BP). *Int. J. Osteoarchaeol.* **2010**, *20* (6), 693–707.
- (11) Watson, J. T.; Arriaza, B.; Standen, V.; Muñoz Ovalle, I. Tooth Wear Related to Marine Foraging, Agro-Pastoralism and the Formative Transition on the Northern Chilean Coast: Tooth Wear in Northwest Chile. *Int. J. Osteoarchaeol.* **2013**, *23* (3), 287–302.
- (12) Silva-Pinto, V.; Valenzuela, D.; Sepulveda, M. Osteoarticular paleopathology in a Chinchorro body. Report of one case. *Rev. Med. Chil.* **2013**, *141* (5), 637–643.
- (13) Deniro, M. J. Postmortem Preservation and Alteration of in Vivo Bone Collagen Isotope Ratios in Relation to Palaeodietary Reconstruction. *Nature* **1985**, *317*, 806–809.
- (14) Ramaroli, V.; Hamilton, J.; Ditchfield, P.; Fazeli, H.; Aali, A.; Coningham, R. A. E.; Pollard, A. M. The Chehr Abad “Salt Men” and the Isotopic Ecology of Humans in Ancient Iran. *Am. J. Phys. Anthropol.* **2010**, *143* (3), 343–354.
- (15) Poulson, S. R.; Kuzminsky, S. C.; Scott, G. R.; Standen, V. G.; Arriaza, B.; Muñoz, I.; Dorio, L. Paleodiet in Northern Chile through the Holocene: Extremely Heavy $\delta^{15}\text{N}$ Values in Dental Calculus Suggest a Guano-Derived Signature? *J. Archaeol. Sci.* **2013**, *40* (12), 4576–4585.
- (16) Manrique, A. D. S. Morphometric and mtDNA Analyses of Archaic Skeletal Remains from Southwestern South America. *Chungara Rev. Antropol. Chil.* **2011**, *43* (2), 283–292.
- (17) Kempson, I. M.; Lombi, E. Hair Analysis as a Biomonitor for Toxicology, Disease and Health Status. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (7), 3915.
- (18) Tobin, D. J. *Hair in Toxicology*; Issues in Toxicology; The Royal Society of Chemistry, 2005.
- (19) Richardin, P.; Gandolfo, N.; Carminati, P.; Walter, P. 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. *Archaeol. Anthropol. Sci.* **2011**, *3* (4), 379–384.
- (20) Fresnais, M.; Richardin, P.; Gimat, A.; Sepúlveda, M.; Leize-Wagner, E.; Charrié, A. Recent Advances in the Characterization of Hair of Mummies from the Chilean Andean Coast. *Forensic Sci. Int.* **2015**, *249*, 25–34.

- (21) Aufderheide, A. C.; Kelley, M. A.; Rivera, M.; Gray, L.; Tieszen, L. L.; Iversen, E.; Krouse, H. R.; Alvaro, C. Contributions of Chemical Dietary Reconstruction to the Assessment of Adaptation by Ancient Highland Immigrants (Alto Ramirez) to Coastal Conditions at Pisagua, North Chile. *J. Archaeol. Sci.* **1994**, *21*, 515–524.
- (22) Díaz-Zorita Bonilla, M.; Drucker, D. G.; Richardin, P.; Silva-Pinto, V.; Sepúlveda, M.; Bocherens, H. Marine Food Consumption in Coastal Northern Chilean (Atacama Desert) Populations during the Formative Period: Implications of Isotopic Evidence (C, N, S) for the Neolithic Process in South Central Andes. *J. Archaeol. Sci. Rep.* **2016**.
- (23) Bartkus, L.; Amarasiriwardena, D.; Arriaza, B.; Bellis, D.; Yañez, J. Exploring Lead Exposure in Ancient Chilean Mummies Using a Single Strand of Hair by Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (LA-ICP-MS). *Microchem. J.* **2011**, *98* (2), 267–274.
- (24) Wilson, A. S.; Edwards, H. G. M.; Farwell, D. W.; Janaway, R. C. Fourier Transform Raman Spectroscopy: Evaluation as a Non-Destructive Technique for Studying the Degradation of Human Hair From Archaeological and Forensic Environments. *J. Raman Spectrosc.* **1999**, *30* (5), 367–373.
- (25) Wilson, A. S.; Dodson, H. I.; Janaway, R. C.; Pollard, A. M.; Tobin, D. J. Selective Biodegradation in Hair Shafts Derived from Archaeological, Forensic and Experimental Contexts. *Br. J. Dermatol.* **2007**, *157* (3), 450–457.
- (26) Bertrand, L.; Doucet, J.; Dumas, P.; Simionovici, A.; Tsoucaris, G.; Walter, P. Microbeam Synchrotron Imaging of Hairs from Ancient Egyptian Mummies. *Synchrotron Radiat.* **2003**, *10* (5), 387–392.
- (27) Bertrand, L.; Vichi, A.; Doucet, J.; Walter, P.; Blanchard, P. The Fate of Archaeological Keratin Fibres in a Temperate Burial Context: Microtaphonomy Study of Hairs from Marie de Bretagne (15th C., Orléans, France). *J. Archaeol. Sci.* **2014**, *42*, 487–499.
- (28) Lubec, G.; Nauer, G.; Seifert, K.; Strouhal, E.; Porteder, H.; Szilvassy, J.; Teschler, M. Structural Stability of Hair over Three Thousand Years. *J. Archaeol. Sci.* **1987**, *14* (2), 113–120.
- (29) Bolbach, G. Cours : La Détection Des Ions En Spectrométrie de Masse, 2016.
- (30) Karas, M.; Hillenkamp, F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10,000 Daltons. *Anal. Chem.* **1988**, *60* (20), 2299–2301.
- (31) Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F. Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules. *Anal. Chem.* **1985**, *57* (14), 2935–2939.
- (32) Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1987**, *78*, 53–68.
- (33) Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Matsuo, T. Protein and Polymer Analyses up to M/Z 100 000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2* (8), 151–153.
- (34) Zenobi, R.; Knochenmuss, R. Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17* (5), 337–366.
- (35) Land, C. M.; Kinsel, G. R. Investigation of the Mechanism of Intracluster Proton Transfer from Sinapinic Acid to Biomolecular Analytes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 1060–1067.
- (36) Hillenkamp, F.; Jaskolla, T. W.; Karas, M. The MALDI Process and Method. In *MALDI MS*; Hillenkamp, F., Peter-Katalinic, J., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013; pp 1–40.
- (37) Pasch, H.; Schrepp, W. *MALDI-TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers*; Springer Science & Business Media, 2013.
- (38) Cohen, L.; Go, E. P.; Siuzdak, G. Small-Molecule Desorption/Ionization Mass Analysis. In *MALDI MS*; Hillenkamp, F., Peter-Katalinic, J., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007; pp 299–337.
- (39) Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B. Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49* (5), 2240–2249.
- (40) Yamashita, M.; Fenn, J. B. Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88* (20), 4451–4459.

- (41) Yamashita, M.; Fenn, J. B. Negative Ion Production with the Electrospray Ion Source. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88* (20), 4671–4675.
- (42) Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B. Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Anal. Chem.* **1985**, *57* (3), 675–679.
- (43) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F. Electrospray Ionization - Principles and Practice. *Mass Spectrom. Rev.* **1990**, *9*, 37–70.
- (44) Evans Jr, C. A.; Hendricks, C. D. An Electrohydrodynamic Ion Source for the Mass Spectrometry of Liquids. *Rev. Sci. Instrum.* **1972**, *43* (10), 1527–1530.
- (45) Wilm, M. S.; Mann, M. Electrospray and Taylor-Cone Theory, Dole's Beam of Macromolecules at Last? *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1994**, *136* (2), 167–180.
- (46) Cech, N. B.; Enke, C. G. Practical Implications of Some Recent Studies in Electrospray Ionization Fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, *20* (6), 362–387.
- (47) Taflin, D. C.; Ward, T. L.; Davis, E. J. Electrified Droplet Fission and the Rayleigh Limit. *Langmuir* **1989**, *5* (2), 376–384.
- (48) Iribarne, J. V.; Thomson, B. A. On the Evaporation of Small Ions from Charged Droplets. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64* (6), 2287–2294.
- (49) Fenn, J. B. Ion Formation from Charged Droplets: Roles of Geometry, Energy, and Time. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 524–535.
- (50) Winger, B. E.; Light-Wahl, K. J.; Ogorzalek Loo, R. R.; Udseth, H. R.; Smith, R. D. Observation and Implications of High Mass-to-Charge Ratio Ions from Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4* (7), 536–545.
- (51) Wilm, M. S.; Mann, M. Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1–8.
- (52) Vestal, M. L.; Juhasz, P.; Martin, S. A. Delayed Extraction Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9* (11), 1044–1050.
- (53) Boyle, J. G.; Whitehouse, C. M.; Fenn, J. B. An Ion-Storage Time-of-Flight Mass Spectrometer for Analysis of Electrospray Ions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 400–405.
- (54) Hillenkamp, F.; Karas, M.; Chait, B. T.; Beavis, R. C. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. *Anal. Chem.* **1991**, *63* (24), A1193.
- (55) HAMAMATSU. Technical Information - MCP Assembly. HAMAMATSU PHOTONICS K.K. 2006.
- (56) Wenzel, R.; Röhling, U.; Nazabal, A.; Hillenkamp, F. A Detector Device for High Mass Ion Detection, a Method for Analyzing Ions of High Mass and a Device for Selection Between Ion Detectors. WO/2009/086642, July 17, 2009.
- (57) James, P. Protein Identification in the Post-Genome Era: The Rapid Rise of Proteomics. *Q. Rev. Biophys.* **1997**, *30* (4), 279–331.
- (58) McLafferty, F. W. Tandem Mass Spectrometric Analysis of Complex Biological Mixtures. *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, *212* (1–3), 81–87.
- (59) Kelleher, N. L.; Lin, H. Y.; Valaskovic, G. A.; Aaserud, D. J.; Fridriksson, E. K.; McLafferty, F. W. Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 806–812.
- (60) Ge, Y.; Lawhorn, B. G.; ElNaggar, M.; Strauss, E.; Park, J.-H.; Begley, T. P.; McLafferty, F. W. Top Down Characterization of Larger Proteins (45 kDa) by Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (4), 672–678.
- (61) Garcia, B. A.; Thomas, C. E.; Kelleher, N. L.; Mizzen, C. A. Tissue-Specific Expression and Post-Translational Modification of Histone H3 Variants. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (10), 4225–4236.
- (62) McDonald, W. H.; Yates, J. R. Shotgun Proteomics and Biomarker Discovery. *Dis. Markers* **2002**, *18* (2), 99–105.
- (63) Barthélémy, N. R.; Bednarczyk, A.; Schaeffer-Reiss, C.; Jullien, D.; Van Dorsselaer, A.; Cavusoglu, N. Proteomic Tools for the Investigation of Human Hair Structural Proteins and Evidence of Weakness Sites on Hair Keratin Coil Segments. *Anal. Biochem.* **2012**, *421* (1), 43–55.
- (64) James, P.; Quadroni, M.; Carafoli, E.; Gonnet, G. Protein Identification in DNA Databases by Peptide Mass Fingerprinting. *Protein Sci.* **1994**, *3* (8), 1347–1350.

- (65) Yates, J. R. Mass Spectrometry and the Age of the Proteome. *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33* (1), 1–19.
- (66) Apweiler, R. Protein Sequence Databases; Chemistry, B.-A. in P., Ed.; Analysis of Amino Acid Sequences; Academic Press, 2000; Vol. 54, pp 31–71.
- (67) Biemann, K. Appendix 5. Nomenclature for Peptide Fragment Ions (Positive Ions). *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 886–887.
- (68) Mascot overview | Protein identification software for mass spec data http://www.matrixscience.com/search_intro.html (accessed May 6, 2016).
- (69) Elias, J. E.; et al. Comparative Evaluation of Mass Spectrometry Platforms Used in Large-Scale Proteomics Investigations. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 667–675.
- (70) Larsen, M. R.; Roepstorff, P. Mass Spectrometric Identification of Proteins and Characterization of Their Post-Translational Modifications in Proteome Analysis. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 677–690.
- (71) Poole, C. F.; Poole, S. K. Instrumental Thin-Layer Chromatography. *Anal. Chem.* **1994**, *66* (1), 27A–37A.
- (72) Sherma, J. Basic TLC Techniques, Materials, and Apparatus. In *Handbook of Thin-Layer Chromatography*; CRC Press, 2003; p 1.
- (73) Fuchs, B.; Süß, R.; Nimptsch, A.; Schiller, J. MALDI-TOF-MS Directly Combined with TLC: A Review of the Current State. *Chromatographia* **2008**, *69* (S1), 95–105.
- (74) Poole, C. F. Thin-Layer Chromatography: Challenges and Opportunities. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000* (1), 963–984.
- (75) Charrié-Duhaut, A.; Lemoine, S.; Adam, P.; Connan, J.; Albrecht, P. Abiotic Oxidation of Petroleum Bitumens under Natural Conditions. *Org. Geochem.* **2000**, *31* (10), 977–1003.
- (76) Charrié-Duhaut, A.; Connan, J.; Darnell, M.; Spangenberg, J.; Szymczyk, E.; Bissada, A.; Albrecht, P. Molecular and Isotopic Characterization of Organic Samples from the Wreck of the Saint-Etienne Merchant Ship (XVIIIth Century): Identification of Pitch, Fat, Hair and Sulfur. *Org. Geochem.* **2009**, *40* (5), 647–665.
- (77) Al-Zoman, N. Z.; Maher, H. M.; Al-Shehri, M. M.; Al-Johar, H.; Al-Taweel, A. M.; Fawzy, G. A.; Perveen, S.; El-Shafae, A. M.; Issa, I. Determination of Methyl Gallate in Bauhinia Retusa Extract by High-Performance Liquid and Thin-Layer Chromatography. *Instrum. Sci. Technol.* **2016**, *44* (3), 308–323.
- (78) Tuzimski, T. Application of Different Modes of Thin-Layer Chromatography and Mass Spectrometry for the Separation and Detection of Large and Small Biomolecules. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (49), 8799–8812.
- (79) Sherma, J.; Fried, B. *Handbook of Thin-Layer Chromatography*; CRC Press, 2003.
- (80) Cheng, S.-C.; Huang, M.-Z.; Shiea, J. Thin Layer Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (19), 2700–2711.
- (81) Davies, N. W.; Veronese, M. E.; McLean, S. Mass Spectrometric Determination of N-Hydroxyphenacetin in Urine Using Multiple Metastable Peak Monitoring Following Thin-Layer Chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **1984**, *310*, 179–187.
- (82) Charrié, A.; Leprovost, C. Biomarqueurs et GC/MS: Des Principes Clés Pour La Caractérisation, La Conservation et La Restauration Des Objets Du Patrimoine. Application À Un Adhésif Végétal Néolithique. *Spectra Anal.* **2012**, *825*, 32–39.
- (83) Morlock, G.; Schwack, W. Coupling of Planar Chromatography to Mass Spectrometry. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2010**, *29* (10), 1157–1171.
- (84) Oka, J.; Hisao, I.; Ikaia, Y.; Ohno, T.; Kawamura, N.; Hayakawa, J.; Harada, K.; Suzuki, M. Identification of Unlawful Food Dyes by Thin-Layer Chromatography-Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1994**, *674* (1), 301–307.
- (85) de Koster, C. G.; Vos, B.; Versluis, C.; Heerma, W.; Haverkamp, J. High-Performance Thin-Layer Chromatography/Fast Atom Bombardment (Tandem) Mass Spectrometry of Pseudomonas Rhamnolipids. *Biol. Mass Spectrom.* **1994**, *23* (4), 179–185.

- (86) Masuda, K.; Harada, K.-I.; Suzuki, M.; Oka, H.; Kawamura, N.; Yamada, M. Identification of Food Dyes by TLC/SIMS with a Condensation Technique. *Org. Mass Spectrom.* **1989**, *24* (1), 74–75.
- (87) Oriňák, A.; Arlinghaus, H. F.; Vering, G.; Oriňáková, R.; Hellweg, S. Introduction to Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Application in Chromatographic Analysis. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1084* (1–2), 113–118.
- (88) Ramaley, L.; Nearing, M. E.; Vaughan, M. A.; Ackman, R. G.; Jamieson, W. D. Thin-Layer Chromatographic Plate Scanner Interfaced with a Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **1983**, *55* (14), 2285–2289.
- (89) Gusev, A. I.; Proctor, A.; Rabinovich, Y. I.; Hercules, D. M. Thin-Layer Chromatography Combined with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (11), 1805–1814.
- (90) Gusev, A. I.; Vasseur, O. J.; Proctor, A.; Sharkey, A. G.; Hercules, D. M. Imaging of Thin-Layer Chromatograms Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (24), 4565–4570.
- (91) Chen, Y.-C.; Shiea, J.; Sunner, J. Thin-Layer Chromatography–mass Spectrometry Using Activated Carbon, Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization. *J. Chromatogr. A* **1998**, *826* (1), 77–86.
- (92) Yan, N.; Zhu, Z.; Jin, L.; Guo, W.; Gan, Y.; Hu, S. Quantitative Characterization of Gold Nanoparticles by Coupling Thin Layer Chromatography with Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (12), 6079–6087.
- (93) Cheng, S.-C.; Huang, M.-Z.; Shiea, J. Thin-Layer Chromatography/Laser-Induced Acoustic Desorption/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (22), 9274–9281.
- (94) Harry, E. L.; Reynolds, J. C.; Bristow, A. W. T.; Wilson, I. D.; Creaser, C. S. Direct Analysis of Pharmaceutical Formulations from Non-Bonded Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography Plates by Desorption Electrospray Ionisation Ion Mobility Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23* (17), 2597–2604.
- (95) Kim, H. J.; Oh, M. S.; Hong, J.; Jang, Y. P. Quantitative Analysis of Major Dibenzocyclooctane Lignans in Schisandrae Fructus by Online TLC-DART-MS. *Phytochem. Anal.* **2011**, *22* (3), 258–262.
- (96) Anderson, R. M.; Busch, K. L. Thin-Layer Chromatography Coupled with Mass Spectrometry: Interfaces to Electrospray Ionization. *Jpc-J. Planar Chromatogr.-Mod. Tlc* **1998**, *11* (5), 336–341.
- (97) Chai, W.; Leteux, C.; Lawson, A. M.; Stoll, M. S. On-Line Overpressure Thin-Layer Chromatographic Separation and Electrospray Mass Spectrometric Detection of Glycolipids. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (1), 118–125.
- (98) Hsu, F.-L.; Chen, C.-H.; Yuan, C.-H.; Shiea, J. Interfaces To Connect Thin-Layer Chromatography with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (10), 2493–2498.
- (99) Alpmann, A.; Morlock, G. Improved Online Coupling of Planar Chromatography with Electrospray Mass Spectrometry: Extraction of Zones from Glass Plates. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 1543–1551.
- (100) Jarne, C.; Cebolla, V. L.; Membrado, L.; Galbán, J.; Savirón, M.; Orduna, J.; Garriga, R. Separation and Profiling of Monoglycerides in Biodiesel Using a Hyphenated Technique Based on High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Fuel* **2016**, *177*, 244–250.
- (101) Schröter, J.; Griesinger, H.; Reuß, E.; Schulz, M.; Riemer, T.; Süß, R.; Schiller, J.; Fuchs, B. Unexpected Products of the Hypochlorous Acid-Induced Oxidation of Oleic Acid: A Study Using High Performance Thin-Layer Chromatography–electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1439*, 89–96.
- (102) Fuchs, B.; Schiller, J.; Süß, R.; Schürenberg, M.; Suckau, D. A Direct and Simple Method of Coupling Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) to Thin-Layer Chromatography (TLC) for the Analysis of Phospholipids from Egg Yolk. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389* (3), 827–834.

- (103) Hayen, H.; Volmer, D. A. Rapid Identification of Siderophores by Combined Thin-Layer Chromatography/Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19* (5), 711–720.
- (104) Manikandan, M.; Hasan, N.; Wu, H.-F. Rapid Detection of Haloarchaeal Carotenoids via Liquid–liquid Microextraction Enabled Direct TLC MALDI-MS. *Talanta* **2013**, *107*, 167–175.
- (105) Nakamura, K.; Suzuki, Y.; Goto-Inoue, N.; Yoshida-Noro, C.; Suzuki, A. Structural Characterization of Neutral Glycosphingolipids by Thin-Layer Chromatography Coupled to Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Quadrupole Ion Trap Time-of-Flight MS/MS. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (16), 5736–5743.
- (106) Leriche, E.-D.; Hubert-Roux, M.; Grossel, M. C.; Lange, C. M.; Afonso, C.; Loutelier-Bourhis, C. Direct TLC/MALDI–MS Coupling for Modified Polyamidoamine Dendrimers Analyses. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *808*, 144–150.
- (107) Tscherch, K.; Biller, J.; Lehmann, M.; Trusch, M.; Rohn, S. One- and Two-Dimensional High-Performance Thin-Layer Chromatography as an Alternative Analytical Tool for Investigating Polyphenol–Protein Interactions. *Phytochem. Anal.* **2013**, *24* (5), 436–445.
- (108) Mowthorpe, S.; Clench, M. R.; Cricelius, A.; Richards, D. S.; Parr, V.; Tetler, L. W. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight/Thin Layer Chromatography/Mass Spectrometry—a Rapid Method for Impurity Testing. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13* (4), 264–270.
- (109) Guerrero, I. C.; Astarita, G.; Jais, J.-P.; Sands, D.; Nowakowska, A.; Colas, J.; Sermet-Gaudelus, I.; Schuereberg, M.; Piomelli, D.; Edelman, A.; Ollero, M. A Novel Lipidomic Strategy Reveals Plasma Phospholipid Signatures Associated with Respiratory Disease Severity in Cystic Fibrosis Patients. *PLoS ONE* **2009**, *4* (11), e7735.
- (110) Kuwayama, K.; Tsujikawa, K.; Miyaguchi, H.; Kanamori, T.; Iwata, Y. T.; Inoue, H. Rapid, Simple, and Highly Sensitive Analysis of Drugs in Biological Samples Using Thin-Layer Chromatography Coupled with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *402* (3), 1257–1267.
- (111) Fuchs, B.; Schiller, J.; Süß, R.; Zscharnack, M.; Bader, A.; Müller, P.; Schürenberg, M.; Becker, M.; Suckau, D. Analysis of Stem Cell Lipids by Offline HPTLC-MALDI-TOF MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392* (5), 849–860.
- (112) Crecelius, A.; Clench, M. R.; Richards, D. S. TLC-MALDI in Pharmaceutical Analysis. *LC GC Eur.* **2003**, *16* (4), 225–229.
- (113) Schürenberg, M.; Suckau, D.; Fuchs, B.; Schiller, J. Application Note 34 - Direct Read-out of Thin Layer Chromatography (TLC) Using MALDI-TOF. *Bruker Daltonics* **2009**.
- (114) Fuchs, B.; Schiller, J.; Suess, R.; Nimptsch, A.; Schuereberg, M.; Suckau, D. Capabilities and Disadvantages of Combined Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC): Analysis of Egg Yolk Lipids. *Jpc-J. Planar Chromatogr.-Mod. Tlc* **2009**, *22* (1), 35–42.
- (115) Lobasso, S.; Lopalco, P.; Angelini, R.; Vitale, R.; Huber, H.; Meller, V.; Corcelli, A. Coupled TLC and MALDI-TOF/MS Analyses of the Lipid Extract of the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus Furiosus*. *Archaea* **2012**, 2012.
- (116) Griesinger, H.; Fuchs, B.; Süß, R.; Matheis, K.; Schulz, M.; Schiller, J. Stationary Phase Thickness Determines the Quality of Thin-Layer Chromatography/Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Mass Spectra of Lipids. *Anal. Biochem.* **2014**, *451*, 45–47.
- (117) Bakry, R.; Bonn, G. K.; Mair, D.; Svec, F. Monolithic Porous Polymer Layer for the Separation of Peptides and Proteins Using Thin-Layer Chromatography Coupled with MALDI-TOF-MS. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (2), 486–493.
- (118) Salo, P. K.; Salomies, H.; Harju, K.; Ketola, R. A.; Kotiaho, T.; Yli-Kauhaluoma, J.; Kostianen, R. Analysis of Small Molecules by Ultra Thin-Layer Chromatography-Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16* (6), 906–915.

- (119) Salo, P. K.; Vilmunen, S.; Salomies, H.; Ketola, R. A.; Kostianen, R. Two-Dimensional Ultra-Thin-Layer Chromatography and Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Bioanalysis. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (5), 2101–2108.
- (120) Mehl, J. T.; Hercules, D. M. Direct TLC-MALDI Coupling Using a Hybrid Plate. *Anal. Chem.* **2000**, *72* (1), 68–73.
- (121) Matsumoto, K.; Ajiro, H.; Habaue, S.; Okamoto, Y. Modifications of TLC-MALDI-TOFMS for Lower Detection Limits Comparable with Conventional MALDI-TOFMS. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **2001**, *49* (3), 127–132.
- (122) Nicola, A. J.; Gusev, A. I.; Hercules, D. M. Direct Quantitative Analysis from Thin-Layer Chromatography Plates Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Appl. Spectrosc.* **1996**, *50* (12), 1479–1482.
- (123) Mehl, J. T.; Gusev, A. I.; Hercules, D. M. Coupling Protocol for Thin Layer Chromatography/Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization. *Chromatographia* **1997**, *46* (7/8), 358–364.
- (124) Crecelius, A.; Clench, M. R.; Richards, D. S.; Mather, J.; Parr, V. Analysis of UK-224,671 and Related Substances by Thin-Layer Chromatography-Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Jpc-J. Planar Chromatogr.-Mod. Tlc* **2000**, *13* (2), 76–81.
- (125) Crecelius, A.; Clench, M. R.; Richards, D. S.; Evason, D.; Parr, V. Thin-Layer Chromatography—Postsource-Decay Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of Small Drug Molecules. *J. Chromatogr. Sci.* **2002**, *40* (10), 614–620.
- (126) Crecelius, A.; Clench, M. R.; Richards, D. S.; Parr, V. Quantitative Determination of Piroxicam by TLC–MALDI TOF MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *35* (1), 31–39.
- (127) Santos, L. S.; Haddad, R.; Höehr, N. F.; Pilli, R. A.; Eberlin, M. N. Fast Screening of Low Molecular Weight Compounds by Thin-Layer Chromatography and “On-Spot” MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (7), 2144–2147.
- (128) Wegener, J.; Zschörnig, K.; Onischke, K.; Fuchs, B.; Schiller, J.; Müller, K. Conservation of Honey Bee (*Apis Mellifera*) Sperm Phospholipids during Storage in the Bee Queen — A TLC/MALDI–TOF MS Study. *Exp. Gerontol.* **2013**, *48* (2), 213–222.
- (129) Fuchs, B.; Nimptsch, A.; Suess, R.; Schiller, J. Analysis of Brain Lipids by Directly Coupled Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and High-Performance Thin-Layer Chromatography. *J. Aoac Int.* **2008**, *91* (5), 1227–1236.
- (130) Zhang, Z.; Ratnayaka, S. N.; Wirth, M. J. Protein UTLC-MALDI–MS Using Thin Films of Submicrometer Silica Particles. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (40), 7196–7202.
- (131) Dreisewerd, K.; Kölbl, S.; Peter-Katalinić, J.; Berkenkamp, S.; Pohlentz, G. Analysis of Native Milk Oligosaccharides Directly from Thin-Layer Chromatography Plates by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Orthogonal-Time-of-Flight Mass Spectrometry with a Glycerol Matrix. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17* (2), 139–150.
- (132) Isbell, D. T.; Gusev, A. I.; Taranenko, N. I.; Chen, C. H.; Hercules, D. M. Analysis of Nucleotides Directly from TLC Plates Using MALDI-MS Detection. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, *365* (7), 625–630.
- (133) Kamata, T.; Shima, N.; Sasaki, K.; Matsuta, S.; Takei, S.; Katagi, M.; Miki, A.; Zaitso, K.; Nakanishi, T.; Sato, T.; Suzuki, K.; Tsuchihashi, H. Time-Course Mass Spectrometry Imaging for Depicting Drug Incorporation into Hair. *Anal. Chem.* **2015**, 5476–5481.
- (134) Kumtabtim, U.; Matusch, A.; Ulhoa Dani, S.; Siripinyanond, A.; Sabine Becker, J. Biomonitoring for Arsenic, Toxic and Essential Metals in Single Hair Strands by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2011**, *307* (1–3), 185–191.
- (135) Kales, S. N.; Christiani, D. C. Hair and Metal Toxicity. In *Hair in Toxicology - An Important Bio-Monitor. Part II*; Tobin, D. J., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2005; pp 125–158.
- (136) Kintz, P.; Villain, M. Application of Hair Biology to Environmental Assessments. Hair in Forensic Toxicology with a Special Focus on Drug-Facilitated Crimes. In *Hair in Toxicology - An Important Bio-Monitor. Part II*; Tobin, D. J., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2005; pp 87–104.

- (137) Bencko, V. Hair and Exposure to Environmental Pollutants. In *Hair in Toxicology - An Important Bio-Monitor. Part II*; Tobin, D. J., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2005; pp 159–174.
- (138) Kintz, P.; Ginet, M.; Marques, N.; Cirimele, V. Arsenic Speciation of Two Specimens of Napoleon's Hair. *Forensic Sci. Int.* **2007**, *170* (2–3), 204–206.
- (139) Hardy, E. M.; Duca, R. C.; Salquebre, G.; Appenzeller, B. M. R. Multi-Residue Analysis of Organic Pollutants in Hair and Urine for Matrices Comparison. *Forensic Sci. Int.* **2015**, *249*, 6–19.
- (140) Goodrich, J. M.; Chou, H.-N.; Gruninger, S. E.; Franzblau, A.; Basu, N. Exposure of Dental Professionals to Elemental Mercury and Methylmercury. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **2016**, *26*, 78–85.
- (141) Beigel, H. *The Human Hair : Its Structure, Growth, Diseases, and Their Treatment*; London : Henry Renshaw, 1869.
- (142) Vickery, H. B.; Leavenworth, C. S. The Separation of Cystine from Histidine: The Basic Amino Acids of Human Hair. *J. Biol. Chem.* **1929**, *83* (3), 523–534.
- (143) Vickery, H. B.; Block, R. J. The Basic Amino Acids of Wool. *J. Biol. Chem.* **1930**, *86* (1), 107–111.
- (144) Stewart, A. M.; Rimington, C. The Basic Amino-Acids of Wool. *Biochem. J.* **1931**, *25* (6), 2189–2192.
- (145) Beveridge, J. M. R.; Lucas, C. C. The Analysis of Hair Keratin - 2. The Dicarboxylic and Basic Amino-Acids of Human Hair. *Biochem. J.* **1944**, *38* (1), 88–95.
- (146) Beveridge, J. M. R.; Lucas, C. C. The Analysis of Hair Keratin - 3. Isolation of Proline from Human Hair. *Biochem. J.* **1944**, *38* (1), 95–97.
- (147) Beveridge, J. M. R.; Lucas, C. C. The Analysis of Hair Keratin - 4. A Note on the Occurrence of Serine in Human Hair. *Biochem. J.* **1944**, *38* (5), 411–412.
- (148) Lang, J. M.; Lucas, C. C. The Analysis of Hair Keratin. 1. Application of Microbiological Techniques to Hydrolysates of Human Hair. *Biochem. J.* **1952**, *52* (1), 84–87.
- (149) Swift, J. A.; Bews, B. The Chemistry of Human Hair Cuticle - II: The Isolation and Amino Acid Analysis of the Cell Membranes and A-Layer. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1974**, *25* (7), 355–366.
- (150) Swift, J. A.; Bews, B. The Chemistry of Human Hair Cuticle - III: The Isolation and Amino Acid Analysis of the Cuticle Obtained by Pronase and Trypsin Digestion. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1976**, *27* (6), 289–300.
- (151) Rogers, G. E. Isolation and Properties of Inner Sheath Cells of Hair Follicles. *Exp. Cell Res.* **1964**, *33* (1), 264–276.
- (152) Clarke, R. M.; Rogers, G. E. Protein Synthesis in the Hair Follicle. *J. Invest. Dermatol.* **1970**, *55* (6), 419–424.
- (153) Marshall, R. C.; Gillespie, J. High-Sulphur Proteins From α -Keratins I. Heterogeneity of the Proteins From Mouse Hair. *Aust. J. Biol. Sci.* **1976**, *29* (2), 1–10.
- (154) Marshall, R. C.; Gillespie, J. High-Sulphur Proteins From α -Keratins II. Isolation and Partial Characterization of Purified Components From Mouse Hair. *Aust. J. Biol. Sci.* **1976**, *29* (2), 11–20.
- (155) Marshall, R.; Frenkel, M.; Gillespie, J. High-Sulphur Proteins in Mammalian Keratins: A Possible Aid in Classification. *Aust. J. Zool.* **1977**, *25* (1), 121–132.
- (156) Marshall, R. C.; Gillespie, J. M. Comparison of Samples of Human Hair by Two-Dimensional Electrophoresis. *J. Forensic Sci. Soc.* **1982**, *22* (4), 377–385.
- (157) Marshall, R. C. Characterization of the Proteins of Human Hair and Nail by Electrophoresis. *J. Invest. Dermatol.* **1983**, *80* (6), 519–524.
- (158) Rogers, G. E. Genes for Hair and Avian Keratins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1985**, *455* (1), 403–425.
- (159) Rogers, M. A.; Nischt, R.; Korge, B.; Krieg, T.; Fink, T. M.; Lichter, P.; Winter, H.; Schweizer, J. Sequence Data and Chromosomal Localization of Human Type I and Type II Hair Keratin Genes. *Exp. Cell Res.* **1995**, *220* (2), 357–362.
- (160) Wu, D.-D.; Irwin, D. M.; Zhang, Y.-P. Molecular Evolution of the Keratin Associated Protein Gene Family in Mammals, Role in the Evolution of Mammalian Hair. *BMC Evol. Biol.* **2008**, *8* (1), 241.

- (161) Plowman, J. E.; Bryson, W. G.; Flanagan, L. M.; Jordan, T. W. Problems Associated with the Identification of Proteins in Homologous Families: The Wool Keratin Family as a Case Study. *Anal. Biochem.* **2002**, *300* (2), 221–229.
- (162) Bringans, S. D.; Plowman, J. E.; Dyer, J. M.; Clerens, S.; Vernon, J. A.; Bryson, W. G. Characterization of the Exocuticle a-Layer Proteins of Wool. *Exp. Dermatol.* **2007**, *16* (11), 951–960.
- (163) Plowman, J. E.; Deb-Choudhury, S.; Thomas, A.; Clerens, S.; Cornellison, C. D.; Grosvenor, A. J.; Dyer, J. M. Characterisation of Low Abundance Wool Proteins through Novel Differential Extraction Techniques. *ELECTROPHORESIS* **2010**, *31* (12), 1937–1946.
- (164) Koehn, H.; Clerens, S.; Deb-Choudhury, S.; Morton, J. D.; Dyer, J. M.; Plowman, J. E. The Proteome of the Wool Cuticle. *J. Proteome Res.* **2010**, *9* (6), 2920–2928.
- (165) Clerens, S.; Cornellison, C. D.; Deb-Choudhury, S.; Thomas, A.; Plowman, J. E.; Dyer, J. M. Developing the Wool Proteome. *J. Proteomics* **2010**, *73* (9), 1722–1731.
- (166) Plowman, J. E.; Harland, D. P.; Ganeshan, S.; Woods, J. L.; van Shaijik, B.; Deb-Choudhury, S.; Thomas, A.; Clerens, S.; Scobie, D. R. The Proteomics of Wool Fibre Morphogenesis. *J. Struct. Biol.* **2015**, *191* (3), 341–351.
- (167) Deb-Choudhury, S.; Plowman, J. E.; Harland, D. P. Chapter Eleven - Isolation and Analysis of Keratins and Keratin-Associated Proteins from Hair and Wool. In *Methods in Enzymology*; Liem, M. B. O. and R. K. H., Ed.; Intermediate Filament Proteins; Academic Press, 2016; Vol. 568, pp 279–301.
- (168) Plowman, J. E. The Proteomics of Keratin Proteins. *J. Chromatogr. B* **2007**, *849* (1–2), 181–189.
- (169) Langbein, L.; Rogers, M. A.; Winter, H.; Praetzel, S.; Beckhaus, U.; Rackwitz, H.-R.; Schweizer, J. The Catalog of Human Hair Keratins I. Expression of the Nine Type I Members in the Hair Follicle. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (28), 19874–19884.
- (170) Nakamura, A.; Arimoto, M.; Takeuchi, K.; Fujii, T. A Rapid Extraction Procedure of Human Hair Proteins and Identification of Phosphorylated Species. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25* (5), 569–572.
- (171) Shimomura, Y.; Ito, M. Human Hair Keratin-Associated Proteins. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **2005**, *10* (3), 230–233.
- (172) Bednarczyk, A. Nouvelles Méthodologies En Protéomique Pour Une Caractérisation Fine Des Protéines, Université de Strasbourg, 2008.
- (173) Laatsch, C. N.; Durbin-Johnson, B. P.; Rocke, D. M.; Mukwana, S.; Newland, A. B.; Flagler, M. J.; Davis, M. G.; Eigenheer, R. A.; Phinney, B. S.; Rice, R. H. Human Hair Shaft Proteomic Profiling: Individual Differences, Site Specificity and Cuticle Analysis. *PeerJ* **2014**, *2*, e506.
- (174) Sinclair, R.; Flagler, M. j.; Jones, L.; Rufaut, N.; Davis, M. g. The Proteomic Profile of Hair Damage. *Br. J. Dermatol.* **2012**, *166*, 27–32.
- (175) Naito, S.; Arai, K. Type and Location of SS Linkages in Human Hair and Their Relation to Fiber Properties in Water. *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, *61* (12), 2113–2118.
- (176) Parry, D. A. D.; Smith, T. A.; Rogers, M. A.; Schweizer, J. Human Hair Keratin-Associated Proteins: Sequence Regularities and Structural Implications. *J. Struct. Biol.* **2006**, *155* (2), 361–369.
- (177) Barthélémy, N. Protéomique Qualitative et Quantitative, Une Passerelle Pour Relier L'expression Génomique À La Construction Des Édifices Biologiques - Application À La Compréhension de La Structure Moléculaire Du Cheveu Humain. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, 2011.
- (178) Wolfram, L. J. Human Hair: A Unique Physicochemical Composite. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2003**, *48* (6, Supplement), S106–S114.
- (179) Swift, J. A.; Bews, B. The Chemistry of Human Hair Cuticle - I: A New Method for the Physical Isolation of Cuticle. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1974**, *25* (1), 13–22.
- (180) The Human Hair Fibre. In *Hair in Toxicology - An Important Bio-Monitor. Part I*; Tobin, D. J., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2005; pp 34–56.
- (181) Tobin, D. J. Pigmentation of Human Hair. In *Hair in Toxicology - An Important Bio-Monitor. Part I*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2005; pp 57–86.

- (182) Bertrand, L. Approche structurale et bioinorganique de la conservation de fibres kératinisées archéologiques. Thèse de doctorat, Université Paris 6: Paris, 2002.
- (183) Pauling, L.; Corey, R. B.; Branson, H. R. The Structure of Proteins: Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1951**, *37* (4), 205–211.
- (184) Burkhard, P.; Stetefeld, J.; Strelkov, S. V. Coiled Coils: A Highly Versatile Protein Folding Motif. *Trends Cell Biol.* **2001**, *11* (2), 82–88.
- (185) Steggerda, M. Cross Sections of Human Hair from Four Racial Groups. *J. Hered.* **1940**, *31* (11), 474–476.
- (186) Fuchs, E.; Weber, K. Intermediate Filaments: Structure, Dynamics, Function and Disease. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63* (1), 345–382.
- (187) Langbein, L.; Rogers, M. A.; Winter, H.; Praetzel, S.; Schweizer, J. The Catalog of Human Hair Keratins II. Expression of the Six Type II Members in the Hair Follicle and the Combined Catalog of Human Type I and II Keratins. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (37), 35123–35132.
- (188) Langbein, L.; Rogers, M. A.; Praetzel-Wunder, S.; Böckler, D.; Schweitzer, J. Novel Type I Hair Keratins K39 and K40 Are the Last to Be Expressed in Differentiation of the Hair: Completion of the Human Hair Keratin Catalog. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, 1532–1535.
- (189) Langbein, L.; Eckhart, L.; Rogers, M. A.; Praetzel-Wunder, S.; Schweizer, J. Against the Rules: Human Keratin K80: Two Functional Alternative Splice Variants, K80 and K80.1, with Special Cellular Localization in a Wide Range of Epithelia. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (47), 36909–36921.
- (190) Schweizer, J.; Bowden, P. E.; Coulombe, P. A.; Langbein, L.; Lane, E. B.; Magin, T. M.; Maltais, L.; Omary, M. B.; Parry, D. A. D.; Rogers, M. A.; Wright, M. W. New Consensus Nomenclature for Mammalian Keratins. *J. Cell Biol.* **2006**, *174* (2), 169–174.
- (191) Szeverenyi, I.; Cassidy, A. J.; Chung, C. W.; Lee, B. T. K.; Common, J. E. A.; Ogg, S. C.; Chen, H.; Sim, S. Y.; Goh, W. L. P.; Ng, K. W.; Simpson, J. A.; Chee, L. L.; Eng, G. H.; Li, B.; Lunny, D. P.; Chuon, D.; Venkatesh, A.; Khoo, K. H.; McLean, W. H. I.; Lim, Y. P.; Lane, E. B. The Human Intermediate Filament Database: Comprehensive Information on a Gene Family Involved in Many Human Diseases. *Hum. Mutat.* **2008**, *29* (3), 351–360.
- (192) Steinert, P. M. Structure, Function, and Dynamics of Keratin Intermediate Filaments. *J. Invest. Dermatol.* **1993**, *100* (6), 729–734.
- (193) Powell, B. C.; Rogers, G. E. *Keratinocyte Handbook*, Cambridge University Press.; Leigh, I., Watt, F., Lane, E. B., Eds.; Cambridge, 1993.
- (194) Lee, Y. J.; Rice, R. H.; Lee, Y. M. Proteome Analysis of Human Hair Shaft From Protein Identification to Posttranslational Modification. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5* (5), 789–800.
- (195) Robbins, C. R. *Chemical and Physical Behavior of Human Hair*; Springer Science & Business Media, 2013.
- (196) Zhou, Y.; Rigoletto, R.; Koelmel, D.; Zhang, G.; Gillece, T. W.; Foltis, L.; Moore, D. J.; Qu, X.; Sun, C. The Effect of Various Cosmetic Pretreatments on Protecting Hair from Thermal Damage by Hot Flat Ironing. *J. Cosmet. Sci.* **2011**, *62*, 265–282.
- (197) Santos Nogueira, A. C.; Joekes, I. Hair Color Changes and Protein Damage Caused by Ultraviolet Radiation. *J. Photochem. Photobiol. B* **2004**, *74* (2–3), 109–117.
- (198) Zhang, H.; Millington, K. R.; Wang, X. A Morphology-Related Study on Photodegradation of Protein Fibres. *J. Photochem. Photobiol. B* **2008**, *92* (3), 135–143.
- (199) Nogueira, A. C. S.; Dicelio, L. E.; Joekes, I. About Photo-Damage of Human Hair. *Photochem Photobiol Sci* **2006**, *5* (2), 165–169.
- (200) Kim, K. S.; Park, H.-K. Analysis of Aging Effects on Chemical Property of Human Hair by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Skin Res. Technol.* **2013**, *19* (1), e325–e331.
- (201) Pielesz, A.; Freeman, H. .; Weselucha-Birczyńska, A.; Wysocki, M.; Włochowicz, A. Assessing Secondary Structure of a Dyed Wool Fibre by Means of FTIR and FTR Spectroscopies. *J. Mol. Struct.* **2003**, *651–653*, 405–418.
- (202) Kon, R.; Nakamura, A. Analysis of the Damaged Components of Permed Hair Using Biochemical Technique. *J. Cosmet. Sci.* **1998**, *49* (13–22).
- (203) Lippincott, J.; Apostol, I. Carbamylation of Cysteine: A Potential Artifact in Peptide Mapping of Hemoglobins in the Presence of Urea. *Anal. Biochem.* **1999**, *267* (1), 57–64.

- (204) Capriles, J. M.; Santoro, C. M.; Dillehay, T. D. Harsh Environments and the Terminal Pleistocene Peopling of the Andean Highlands. *Curr. Anthropol.* **2016**, *57* (1), 99–100.
- (205) Arriaza, B. T. *Beyond Death: The Chinchorro Mummies of Ancient Chile*; Smithsonian Institution Press, 1995.
- (206) Standen, V. G.; Santoro, C. M.; Arriaza, B. T. Síntesis Y Propuestas Para El Período Arcaico En La Costa Del Extremo Norte de Chile. *Chungará Arica* **2004**, *36*, 201–212.
- (207) Santoro, C. M.; Arriaza, B. T.; Standen, V. G.; Marquet, P. A. People of the Coastal Atacama Desert: Living Between Sand Dunes and Waves of the Pacific Ocean. In *Desert People: Archaeological Perspectives*; P. Veth, M. Smith and P. Hiscock: Oxford, 2008; pp 243–260.
- (208) Arriaza, B. T.; Standen, V. G.; Cassman, V.; Santoro, C. M. Chinchorro Culture: Pioneers of the Coast of the Atacama Desert. In *Handbook of South American Archaeology*; Helaine Silverman and William H. Isbell: New York, 2008; pp 45–58.
- (209) Marquet, P. A.; Santoro, C. M.; Latorre, C.; Standen, V. G.; Abades, S. R.; Rivadeneira, M. M.; Arriaza, B.; Hochberg, M. E. Emergence of Social Complexity among Coastal Hunter-Gatherers in the Atacama Desert of Northern Chile. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (37), 14754–14760.
- (210) Focacci, G. Excavaciones en el cementerio Playa Miller 7, Arica (Chile). *Chungara Rev. Antropol. Chil.* **1974**, *3*, 23–74.
- (211) Aufderheide, A. C.; Kelley, M. A.; Rivera D., M.; Gray, L.; Tieszen, L. L.; Iversen, E.; Krouse, H. R.; Carevic, A. Contribution of Chemical Dietary Reconstruction to the Assessment of Adaptation by Ancient Highland Immigrants (Alto Ramirez) to Coastal Conditions at Pisagua, North Chile. *J. Archaeol. Sci.* **1994**, *21*, 515–524.
- (212) Reinhard, K.; Urban, O. Diagnosis Ancient Diphyllbothriasis from Chinchorros Mummies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio Jan.* **2003**, *98* (Suppl. I), 191–193.
- (213) Roberts, A.; Donald Pate, F.; Petruzzelli, B.; Carter, C.; Westaway, M. C.; Santoro, C. M.; Swift, J.; Maddern, T.; Jacobsen, G. E.; Bertuch, F.; Rothhammer, F. Retention of Hunter-gatherer Economies among Maritime Foragers from Caleta Vitor, Northern Chile, during the Late Holocene: Evidence from Stable Carbon and Nitrogen Isotopic Analysis of Skeletal Remains. *J. Archaeol. Sci.* **2013**, *40* (5), 2360–2372.
- (214) Pollard, A. M.; Heron, C. *Archaeological Chemistry*, 2nd ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2008.
- (215) O’Connell, T. C.; Hedges, R. E. Investigations into the Effect of Diet on Modern Human Hair Isotopic Values. *Am. J. Phys. Anthropol.* **1999**, *108* (4), 409–425.
- (216) Byrne, S.; Amarasiriwardena, D.; Bandak, B.; Bartkus, L.; Kane, J.; Jones, J.; Yañez, J.; Arriaza, B.; Cornejo, L. Were Chinchorros Exposed to Arsenic? Arsenic Determination in Chinchorro Mummies’ Hair by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (LA-ICP-MS). *Microchem. J.* **2010**, *94* (1), 28–35.
- (217) Du, A. Y.; Mangelson, N. F.; Rees, L. B.; Matheny, R. T. PIXE Elemental Analysis of South American Mummy Hair. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* **1996**, *109/110*, 673–676.
- (218) Stern, C. R. Active Andean Volcanism: Its Geologic and Tectonic Setting. *Rev. Geológica Chile* **2004**, *31* (2), 161–206.
- (219) Smedley, P. L.; Kinniburgh, D. G. Chapter 1. Source and Behaviour of Arsenic in Natural Waters; British Geological Survey: Wallingford.
- (220) Nordstrom, D. K. Worldwide Occurrences of Arsenic in Ground Water. *Science(Washington)* **2002**, *296* (5576), 2143–2145.
- (221) Sepulveda R., M.; Figueroa L., V.; Pages-Camagna, S. Copper Pigment-Making in the Atacama Desert (Northern Chile). *Lat. Am. Antiq.* **2013**, *24* (4), 467–482.
- (222) Jiang, G.; Gong, Z.; Li, X.-F.; Cullen, W. R.; Le, X. C. Interaction of Trivalent Arsenicals with Metallothionein. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16* (7), 873–880.
- (223) Boston, C. E.; Arriaza, B. T. Arseniasis and Teratogenic Anomalies in the Atacama Desert Coast of Ancient Chile. *Interciencia* **2009**, *34* (5), 338–343.
- (224) Smith, A. H.; Arroyo, A. P.; Mazumder, D. N.; Kosnett, M. J.; Hernandez, A. L.; Beeris, M.; Smith, M. M.; Moore, L. E. Arsenic-Induced Skin Lesions among Atacameno People in

- Northern Chile despite Good Nutrition and Centuries of Exposure. *Environ. Health Perspect.* **2000**, *108* (7), 617.
- (225) Núñez, L.; Santoro, C. M. El Tránsito Arcaico-Formativo En La Circumpuna Y Valles Occidentales Del Centro Sur Andino: Hacia Los Cambios“ neolíticos.” *Chungará Arica* **2011**, *43* (ESPECIAL), 487–530.
- (226) Standen, V. G.; Arriaza, B. T.; Santoro, C. M. External Auditory Exostosis in Prehistoric Chilean Populations: A Test of the Cold Water Hypothesis. *Am. J. Phys. Anthropol.* **1997**, *103* (1), 119–129.
- (227) Museo Arqueológico San Miguel de Azapa, Universidad de Tarapacá (Arica, Chile).
- (228) Lynnerup, N. Mummies. *Am. J. Phys. Anthropol.* **2007**, *134* (S45), 162–190.
- (229) Tudela, D. R. G.; Tatum, S. H.; Yee, M.; Brito, S. L. M.; Morais, J. L.; Morais, D. de; Piedade, S. C.; Munita, C. S. P.; Hazenfratz, R. TL, OSL and C-14 Dating Results of the Sediments and Bricks from Mummified Nuns' Grave. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **2012**, *84* (2), 237–244.
- (230) Janko, M.; Zink, A.; Gigler, A. M.; Heckl, W. M.; Stark, R. W. Nanostructure and Mechanics of Mummified Type I Collagen from the 5300-Year-Old Tyrolean Iceman. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2010**, *277* (1692), 2301–2309.
- (231) Ravn, M. Bronze and Early Iron Age Bog Bodies from Denmark. *Acta Archaeol.* **2010**, *81* (1), 112–113.
- (232) CHAPTER XII: Danish Bog Bodies in Antiquity. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* **1994**, *72*, 83–97.
- (233) Dunand, F.; Lichtenberg, R. *Les momies et la mort en Égypte*; Editions Errance, 1998.
- (234) Charlier, P.; Huynh-Charlier, I.; Brun, L.; Hervé, C.; de la Grandmaison, G. L. Shrunken Head (Tsantsa): A Complete Forensic Analysis Procedure. *Forensic Sci. Int.* **2012**, *222* (1–3), 399.e1–399.e5.
- (235) Aufderheide, A. C.; Muñoz, I.; Arriaza, B. Seven Chinchorro Mummies and the Prehistory of Northern Chile. *Am. J. Phys. Anthropol.* **1993**, *91* (2), 189–201.
- (236) Arriaza, B. T.; Doubrava, M.; Standen, V. G.; Haas, H. Differential Mortuary Treatment among the Andean Chinchorro Fishers: Social Inequalities or In Situ Regional Cultural Evolution? *Curr. Anthropol.* **2005**, *46* (4), 662–671.
- (237) Arriaza, B.; Allison, M.; Gerszten, E. Maternal Mortality in Pre-Columbian Indians of Arica, Chile. *Am. J. Phys. Anthropol.* **1988**, *77* (1), 35–41.
- (238) Begerock, A.-M. *Vivre Avec Les Ancêtres : Momies et Techniques de Momification de l'Amérique Latine Préhispanique*, 2014.
- (239) Mansilla, J.; Bosch, P.; Menéndez, M. T.; Pijoan, C.; Flores, C.; del Carmen López, M.; Lima, E.; Lebreiro, I. Archaeological and Contemporary Human Hair Composition and Morphology. *Chungara Rev. Antropol. Chil.* **2011**, *43* (2), 293–302.
- (240) Bianucci, R.; Jeziorska, M.; Lallo, R.; Mattutino, G.; Massimelli, M.; Phillips, G.; Appenzeller, O. A Pre-Hispanic Head. *PLoS ONE* **2008**, *3* (4), e2053.
- (241) Dauelsberg, P. Excavaciones Arqueológicas En Quiani. Provincia de Tarapacá. Departamento de Arica. *Chungara* **1974**, *4*, 7–38.
- (242) de Brer, C. The Deterioration of the Chinchorro Mummies of Arica, Chile. *Backdirt Annu. Rev.* **2008**, 26–27.
- (243) Arriaza, B.; Orellana, N. C.; Barbosa, H. S.; Menna-Barreto, R. F. S.; Araújo, A.; Standen, V. Severe Head Lice Infestation in an Andean Mummy of Arica, Chile. *J. Parasitol.* **2012**, *98* (2), 433–436.
- (244) Rothhammer, F.; Allison, M. J.; Núñez, L.; Standen, V.; Arriaza, B. Chagas' Disease in Pre-Columbian South America. *Am. J. Phys. Anthropol.* **1985**, *68* (4), 495–498.
- (245) Edwards, N. P.; Barden, H. E.; van Dongen, B. E.; Manning, P. L.; Larson, P. L.; Bergmann, U.; Sellers, W. I.; Wogelius, R. A. Infrared Mapping Resolves Soft Tissue Preservation in 50 Million Year-Old Reptile Skin. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2011**, *278* (1722), 3209–3218.
- (246) Richardin, P.; Lavier, C.; Horta, H.; Figueroa, V.; Lira, N. Radiocarbon Dating of Atacama (Chile) Snuffs Trays: An Update on Stylistic and Chronological Correlations. *Radiocarbon in press*.

- (247) Buckley, M.; Collins, M. J. Collagen Survival and Its Use for Species Identification in Holocene-Lower Pleistocene Bone Fragments from British Archaeological and Paleontological Sites. *Antiqua* **2011**, *1* (1), 1.
- (248) Cersoy, S.; Richardin, P.; Walter, P.; Brunelle, A. Cluster TOF-SIMS Imaging of Human Skin Remains: Analysis of a South-Andean Mummy Sample. *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47* (3), 338–346.
- (249) Maixner, F.; Overath, T.; Linke, D.; Janko, M.; Guerriero, G.; Berg, B. H. J.; Stade, B.; Leidinger, P.; Backes, C.; Jaremek, M.; Kneissl, B.; Meder, B.; Franke, A.; Egarter-Vigl, E.; Meese, E.; Schwarz, A.; Tholey, A.; Zink, A.; Keller, A. Paleoproteomic Study of the Iceman's Brain Tissue. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70* (19), 3709–3722.
- (250) Richardin, P.; Coudert, M.; Gandolfo, N.; Vincent, J. Radiocarbon Dating of Mummified Human Remains, Application to a Series of Coptic Mummies from the Louvre Museum. *Radiocarbon* **2013**, *55* (3–4), 345–352.
- (251) O'Connell, T. C. Hair and Nutrient/Diet Assessment. In *Hair in Toxicology - An Important Bio-Monitor. Part II*; Tobin, D. J., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2005; pp 175–193.
- (252) Grova, N.; Hardy, E. M.; Meyer, P.; Appenzeller, B. M. R. Analysis of Tetrahydroxylated Benzo[a]pyrene Isomers in Hair as Biomarkers of Exposure to Benzo[a]pyrene. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408* (8), 1997–2008.
- (253) Ogalde, J. P.; Arriaza, B. T.; Soto, E. C. Identification of Psychoactive Alkaloids in Ancient Andean Human Hair by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Archaeol. Sci.* **2009**, *36* (2), 467–472.
- (254) Echeverría, J.; Niemeyer, H. M. Nicotine in the Hair of Mummies from San Pedro de Atacama (Northern Chile). *J. Archaeol. Sci.* **2013**, *40* (10), 3561–3568.
- (255) Lubec, G.; Zimmerman, M. R.; Teschler-Nicola, M.; Stocch, V.; Aufderheide, A. C. Protein Oxidation of a Hair Sample Kept in Alaskan Ice for 800–1000 Years. *Free Radic. Res.* **1997**, *26* (5), 457–462.
- (256) Pichon, L.; Moignard, B.; Lemasson, Q.; Pacheco, C.; Walter, P. Development of a Multi-Detector and a Systematic Imaging System on the AGLAE External Beam. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B* **2014**, *318*, 27–31.
- (257) Lemasson, Q.; Moignard, B.; Pacheco, C.; Pichon, L.; Filomena Guerra, M. Fast Mapping of Gold Jewellery from Ancient Egypt with PIXE: Searching for Hard-Solders and PGE Inclusions. *Talanta* **2015**, *143*, 279–286.
- (258) Pichon, L.; Calligaro, T.; Lemasson, Q.; Moignard, B.; Pacheco, C. Programs for Visualization, Handling and Quantification of PIXE Maps at the AGLAE Facility. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* **2015**, *363*, 48–54.
- (259) Ramsey, C. B.; Lee, S. Recent and Planned Developments of the Program OxCal. *Radiocarbon* **2013**, *55* (2–3), 720–730.
- (260) Rivera, A. M. Prehistoric Chronology of Northern Chile, University of Wisconsin: Madison, 1977.
- (261) Munoz, I.; Rocha, R.; Chacon, S. Camarones 15: Asentamiento de Pescadores Correspondiente Al Periodo Arcaico Y Formativo En El Extremo Norte de Chile. *Actas XI Congr. Nac. Arqueol. Chil.* **1991**, *2*, 1–24.
- (262) Strassburger, J.; Breuer, M. M. Quantitative Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Oxidized Hair. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1985**, *36*, 61–74.
- (263) Kim, K. S.; Shin, M. K.; Park, H.-K. Effects of Ultraviolet B Radiation on Physicochemical Properties of Human Hair Shaft. *Microsc. Res. Tech.* **2012**, *75*, 949–954.
- (264) Panayiotou, H.; Kokot, S. Matching and Discrimination of Single Human-Scalp Hairs by FT-IR Micro-Spectroscopy and Chemometrics. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *392*, 223–235.
- (265) Cotte, M. Développement de la microscopie infrarouge avec rayonnement synchrotron pour l'étude de pratiques pharmaceutiques anciennes - Exemples des emplâtres de plomb et des tissus humains. Thèse de doctorat, Université Paris 6: Paris, 2004.
- (266) Wojciechowska, E.; Rom, M.; Włochowicz, A.; Wysocki, M.; Weselucha-Birczyńska, A. The Use of Fourier Transform-Infrared (FTIR) and Raman Spectroscopy (FTR) for the Investigation of

- Structural Changes in Wool Fibre Keratin after Enzymatic Treatment. *J. Mol. Struct.* **2004**, *704* (1–3), 315–321.
- (267) Solazzo, C.; Rogers, P. W.; Weber, L.; Beaubien, H. F.; Wilson, J.; Collins, M. Species Identification by Peptide Mass Fingerprinting (PMF) in Fibre Products Preserved by Association with Copper-Alloy Artefacts. *J. Archaeol. Sci.* **2014**, *49*, 524–535.
- (268) Haglund, W. D.; Sorg, M. H. *Forensic Taphonomy: The Postmortem Fate of Human Remains*; CRC Press, 1996.
- (269) Wilson, A. S. Hair as a Bioresource in Archaeological Study. In *Hair in Toxicology - An Important Bio-Monitor. Part IV*; Tobin, D. J., Ed.; Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2005.
- (270) Hallégot, P.; Walter, P.; Cotte, M.; Audinot, J.-N.; Guillot, J.; Migeon, H.-N.; Tallarek, E.; Hagenhoff, B. Accumulations of Ca/P in the Core of Hairs from Taklamakan Desert Mummies. *Appl. Surf. Sci.* **2008**, *255* (4), 1154–1157.
- (271) Collins, M. J.; Cappellini, E.; Buckley, M.; Penkman, K. E. H.; Griffin, R. C.; Koon, H. E. C. Analytical Methods to Detect Ancient Proteins. In *Bio-and Material Cultures at Qumran*; Gunneweg J., Greenblatt C. and Adriaens A.: Stuttgart, 2006; pp 33–40.
- (272) Buckley, M.; Wadsworth, C. Proteome Degradation in Ancient Bone: Diagenesis and Phylogenetic Potential. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **2014**, *416*, 69–79.
- (273) Farrell, J.; Amarasiriwardena, D.; Goodman, A. H.; Arriaza, B. Bioimaging of Trace Metals in Ancient Chilean Mummies and Contemporary Egyptian Teeth by Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (LA-ICP-MS). *Microchem. J.* **2013**, *106*, 340–346.
- (274) Buckley, M.; Kansa, S. W. Collagen Fingerprinting of Archaeological Bone and Teeth Remains from Domuztepe, South Eastern Turkey. *Archaeol. Anthropol. Sci.* **2011**, *3* (3), 271–280.
- (275) Simpson, D. M.; Beynon, R. J. Acetone Precipitation of Proteins and the Modification of Peptides. *J. Proteome Res.* **2010**, *9* (1), 444–450.
- (276) Preedy, V. R. *Adhesion Molecules*; CRC Press, 2010.
- (277) Rombouts, I.; Lagrain, B.; Brunnbauer, M.; Delcour, J. A.; Koehler, P. Improved Identification of Wheat Gluten Proteins through Alkylation of Cysteine Residues and Peptide-Based Mass Spectrometry. *Sci. Rep.* **2013**, *3*.
- (278) Sun, S.; Zhou, J.-Y.; Yang, W.; Zhang, H. Inhibition of Protein Carbamylation in Urea Solution Using Ammonium-Containing Buffers. *Anal. Biochem.* **2014**, *446*, 76–81.
- (279) Robinson, N. E.; Robinson, A. B. Molecular Clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (3), 944–949.
- (280) Araki, N.; Moini, M. Age Estimation of Museum Wool Textiles from Ovis Aries Using Deamidation Rates Utilizing Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry: Dating Wool Using Deamidation Rate. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25* (22), 3396–3400.
- (281) Perez Hurtado, P.; O'Connor, P. B. Deamidation of Collagen. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (6), 3017–3025.
- (282) Robinson, A. B.; McKerrow, J. H.; Cary, P. Controlled Deamidation of Peptides and Proteins: An Experimental Hazard and a Possible Biological Timer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1970**, *66* (3), 753–757.
- (283) Kintz, P.; Ginet, M.; Cirimele, V. Multi-Element Screening by ICP-MS of Two Specimens of Napoleon's Hair. *J. Anal. Toxicol.* **2006**, *30* (8), 621–623.
- (284) Sepúlveda, M.; Valenzuela, D.; Cornejo, L.; Lienqueo, H.; Rousselière, H. Manganese Oxide in Northernmost Chile: Black Color Procurement, Production and Mobility during the Archaic Period. *Chungará Arica* **2013**, *45* (1), 143–159.
- (285) Bertrand, L.; Schöeder, S.; Anglos, D.; Breese, M. B. H.; Janssens, K.; Moini, M.; Simon, A. Mitigation Strategies for Radiation Damage in the Analysis of Ancient Materials. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2015**, *66*, 128–145.
- (286) Moini, M.; Rollman, C. M.; Bertrand, L. Assessing the Impact of Synchrotron X-Ray Irradiation on Proteinaceous Specimens at Macro and Molecular Levels. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (19), 9417–9422.
- (287) Kempson, I. M.; Henry, D.; Francis, J. Characterizing Arsenic in Preserved Hair for Assessing Exposure Potential and Discriminating Poisoning. *J. Synchrotron Radiat.* **2009**, *16* (3), 422–427.

- (288) Bischoff, A.; Eibisch, M.; Fuchs, B.; Suess, R.; Schuerenberg, M.; Suckau, D.; Schiller, J. A Simple TLC-MALDI Method to Monitor Oxidation Products of Phosphatidylcholines and - Ethanolamines. *Acta Chromatogr.* **2011**, *23* (2), 365–375.
- (289) Fuchs, B. Analysis of Phospholipids and Glycolipids by Thin-Layer Chromatography–matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1259*, 62–73.
- (290) Alais, C.; Linden, G.; Miclo, L. *Biochimie alimentaire - Abrégé*, 5ème.; Sciences Sup; Dunod, 2004.
- (291) Villa, A. L. V.; Aragão, M. R. S.; dos Santos, E. P.; Mazotto, A. M.; Zingali, R. B.; de Souza, E. P.; Vermelho, A. B. Feather Keratin Hydrolysates Obtained from Microbial Keratinases: Effect on Hair Fiber. *BMC Biotechnol.* **2013**, *13* (1), 15.
- (292) Ameline, A. *Caractérisation Par Spectrométrie de Masse de Produits Naturels En Contexte Archéologique*; Supervisé par Dr. Armelle Charrié-Duhaut; LSMIS - UMR 7140 CNRS-Unistra: Strasbourg, 2014.
- (293) Bastien, C. Étude Chimique Des Substances Contenues Dans Une Collection Exceptionnelle de Poteries Provenant de Deir El-Médineh (Egypte) : Une Population et Ses Produits, Université de Strasbourg: Strasbourg, 2011.
- (294) Solazzo, C.; Wilson, J.; Dyer, J. M.; Clerens, S.; Plowman, J. E.; von Holstein, I.; Walton Rogers, P.; Peacock, E. E.; Collins, M. J. Modeling Deamidation in Sheep α -Keratin Peptides and Application to Archeological Wool Textiles. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (1), 567–575.
- (295) Maennling, F. *Mise Au Point D'un Protocole D'analyse de Digests Peptidiques Des Kératines de Cheveux En Archéométrie Biomoléculaire*; Supervisé par Dr. Armelle Charrié-Duhaut; LSMIS - UMR 7140 CNRS-Unistra: Strasbourg, 2016.
- (296) Biller, J.; Morschheuser, L.; Riedner, M.; Rohn, S. Development of Optimized Mobile Phases for Protein Separation by High Performance Thin Layer Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1415*, 146–154.
- (297) Bertrand, F.; Maumy, M. Analyse de La Variance Pour Plans À Mesures Répétées, 2015.
- (298) Bonferroni, C. E. Teoria Statistica Delle Classi E Calcolo Delle Probabilità. *Pubblicazioni R Ist. Super. Sci. Econ. E Commer. Firenze* **1936**.
- (299) Baly, I.; Grison, P.; Quidoz, M.-C.; Martin, C. ANF “Comment Concevoir Une Base de Données En Archéométrie,” 2014.
- (300) Chevallet, M.; Wagner, E.; Luche, S.; van Dorsselaer, A.; Leize-Wagner, E.; Rabilloud, T. Regeneration of Peroxiredoxins during Recovery after Oxidative Stress: Only Some Overoxidized Peroxiredoxins Can Be Reduced during Recovery after Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (39), 37146–37153.
- (301) DeAraujo, A.; Vasanthakumar, A.; Sepulveda, M.; Standen, V.; Arriaza, B.; Mitchell, R. Investigation of the Recent Microbial Degradation of the Skin of the Chinchorro Mummies of Ancient Chile. *J. Cult. Herit.* **2016**.

Annexes

Annexe 1 – Datation par le carbone 14

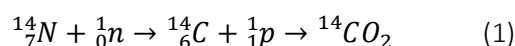
La datation par le carbone 14 (W.F. Libby, 1950) permet de déterminer l'âge de matériaux issus d'organismes vivants de moins de 50 000 ans. Deux méthodes de mesure existent :

- i) la mesure de l'activité du ^{14}C (mesure indirecte)
- ii) la spectrométrie de masse couplée à un accélérateur de particules (AMS).

Seule la seconde méthode, qui a été utilisée dans le cadre de ce projet, sera détaillée dans cette annexe.

▣ Principe

Le ^{14}C est un isotope radioactif du carbone qui se forme dans l'atmosphère par absorption de neutrons, issus des rayonnements cosmiques, par les atomes d'azote. Il est ensuite recombinaison en CO_2 (Equation (1)).



Au cours de sa vie, l'organisme absorbe du CO_2 selon des proportions isotopiques qui peuvent ensuite être corrélées avec la composition isotopique de l'atmosphère. Tant que l'organisme est vivant, l'équilibre est maintenu et ces proportions restent constantes. Lorsque celui-ci meurt, les échanges avec l'extérieur s'arrêtent et la quantité de ^{14}C diminue selon la loi de décroissance radioactive (Equation (2)).

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t} \quad (2)$$

Avec $\lambda = \frac{\ln 2}{T}$, constante de désintégration

T , temps de demi-vie (5730 ± 40 ans pour le ^{14}C)

La mesure du ^{14}C par AMS repose, non pas sur la quantité de rayonnement émis lors de la désintégration des noyaux, mais sur la mesure directe de la quantité de ^{14}C dans le matériau (mesure des rapports isotopiques $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ et $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). La méthode directe permet donc une analyse plus sensible, plus rapide et nécessitant de plus faibles quantités d'échantillon (de l'ordre du mg), mais elle requiert aussi un plus grand contrôle des contaminants.

Ainsi, il est possible de déterminer la date du décès d'un individu ou la date de fabrication d'un objet (le temps entre l'extraction de la matière première et son utilisation est ici considéré comme court) grâce à la datation des matériaux organiques les composant.

▣ Calcul de l'âge radiocarbone

L'âge radiocarbone, ou âge BP (*Before Present*), correspond à l'âge de l'échantillon par rapport à l'année 1950, définie comme année de référence par convention : Année 1950 = 0 BP.

Cet âge BP peut être calculé à partir de la loi de décroissance radioactive et des rapports isotopiques déterminés par AMS (Equation (3)) en utilisant la période T donnée par Libby, soit $T = 5568 \pm 30$ ans.

$$\text{Age BP} = 8033 \cdot \ln \frac{R_{\text{échantillon}}}{R_{\text{standard}}} \quad (3)$$

Avec $R = \frac{C_x}{C_{12}}$

C, le nombre de coups mesuré pour ^{12}C , ^{13}C ou ^{14}C

x, 13 ou 14 selon l'isotope considéré

$R_{\text{standard}} = (R_{\text{échantillon}})_0$, selon l'hypothèse d'une quantité de ^{14}C constante dans l'atmosphère au cours du temps.

Dans un premier temps, il faut prendre compte la contribution du fractionnement isotopique du carbone dans l'organisme, afin d'obtenir un résultat en années BP exact. Ce phénomène est dû aux différences d'absorption des isotopes du carbone par l'organisme lors de la respiration ou de l'alimentation. Les échantillons peuvent être plus ou moins enrichis ou appauvris en ^{14}C et une correction est donc nécessaire.

▣ Détermination de l'âge calendaire

La méthode exposée plus haut repose sur l'hypothèse que la quantité de radiocarbone présente dans l'atmosphère n'a jamais changé et reste constante au cours du temps, ce qui n'est pas le cas. Des corrections sont donc nécessaires afin d'obtenir un âge en années calendaires. Il faut tout d'abord tenir compte de deux effets anthropiques :

- i) L'effet Suess : l'ère industrielle a conduit au rejet en grandes quantités de carbone dépourvu d'isotope radioactif dans l'atmosphère et donc, à une diminution de la quantité de ^{14}C dans les organismes vivants.
- ii) Les essais nucléaires : durant les années 1950 et 1960, les essais nucléaires ont libéré d'importantes quantités de neutrons dans l'atmosphère, favorisant ainsi la production de ^{14}C artificiel.

Un étalon international est donc utilisé depuis 1960 pour palier à ces modifications : l'acide oxalique.

Egalement, selon l'alimentation de l'individu considéré (importance de l'alimentation marine notamment), la contribution isotopique en ^{15}N peut se révéler déterminante. L'azote est en effet à

l'origine d'un effet réservoir pouvant vieillir artificiellement l'échantillon de 200 à 400 ans. Il est donc important de mesurer cette contribution isotopique en parallèle afin de pouvoir corriger cet effet artificiel pour le résultat final.

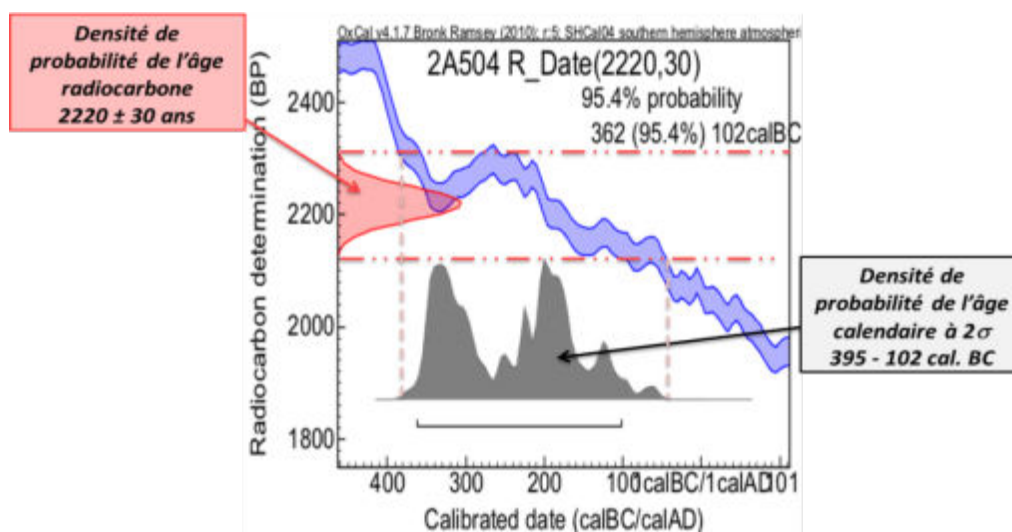


Figure S. 1 – Conversion d'un âge radiocarbone (années BP) en un âge en années calendaires selon une probabilité de 95,4%

De plus, il existe des fluctuations des rayonnements cosmiques du fait des changements dans l'activité solaire ou le champ magnétique terrestre, ce qui fait varier la teneur en ^{14}C dans l'atmosphère. Une courbe de calibration, obtenue à partir de données provenant d'autres méthodes (dendrochronologie, datation uranium/thorium), est donc nécessaire. La calibration d'une date peut s'effectuer en ligne à partir de programmes informatiques, tel que le logiciel OxCal utilisé par le C2RMF avec les courbes de calibration IntCal09 et Marine09-Radiocarbon. Les résultats considérés à un niveau de confiance de 95% (dans un intervalle 2σ) et traduits en années cal. BC (av. J.-C.) ou cal. AD (ap. J.-C.) (Figure S.1). Cette date est comprise dans un ou plusieurs intervalles de différentes probabilités, celui ayant la plus haute probabilité étant en général pris comme résultat.

Annexe 2 – Supporting Information for “Characterization of ancient human hair by a proteomic approach”

Article soumis à droits d’auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

Article soumis à droits d'auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

Article soumis à droits d'auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

Article soumis à droits d'auteurs:

Margaux Fresnais, Pascale Richardin, Marcela Sepúlveda, Emmanuelle Leize-Wagner, Armelle Charrié-Duhaut, **Characterization of ancient human hair by a proteomic approach**, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2016) under review.

Annexe 3 – Données de référence pour le couplage TLC-MALDI-MS

Tableau S. 1 – Assignment des ions principaux détectés par TLC-MALDI-MS pour les phospholipides de référence – PC, PE et SM – et l'extrait organique de jaune d'œuf. Tableau adapté de Fuchs *et al.*¹⁰²

Assignment	Valeurs des rapports m/z
LPC 16:0 + H ⁺	496.3
LPC 16:0 + Na ⁺	518.3
SM 16:0 – Fragment	677.5
SM 16:0 + H ⁺	703.6
SM 16:0 + Na ⁺	725.6
PC 16:0/18:1 + H ⁺	760.6
PE 18:0/18:2 + Na ⁺	766.6
PE 18:0/18:1 + Na ⁺	768.6
PC 16:0/18:1 + Na ⁺	782.6
PE 18:0/18:1 - H ⁺ + 2Na ⁺ et PE 18:0/20:4 + Na ⁺	790.6
PC 18:0/18:1 + Na ⁺ et PC 18:0/20:4 + H ⁺	810.6
PI 16:0/18:2 + Na ⁺	857.6
PI 16:0/18:2 - H ⁺ + 2Na ⁺	879.6
PI 18:0/18:2 – H ⁺ + 2Na ⁺	907.6

Tableau S. 2 – Masses théoriques monoisotopiques des ions détectés par TLC-MALDI-MS pour le digest de Cytochrome C.

Assignment (Séquence peptidique)	Masse théorique monoisotopique (Da)
TGPNLHGLFGR	1167.6
IFVQKCAQCHTVEK	1632.8

Annexe 4 – Publications, communications et prix

📄 Publications

M. Fresnais, P. Richardin, M. Sepulveda, E. Leize-Wagner, A. Charrié-Duhaut, Characterization of ancient human hair by a proteomic approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2016**, under review.

P. Adam, P. Schaeffer, G. Schmitt, L. Bailly, B. Courel, M. Fresnais, C. Fossurier, M. Rohmer, Identification and mode of formation of hopanoid nitriles in archaeological soils. *Organic Geochemistry*, **2016**, 100-108.

M. Fresnais, P. Richardin, A. Gimat, M. Sepúlveda, E. Leize-Wagner, A. Charrié, Recent advances in the characterization of hair of mummies from the Chilean Andean coast. *Forensic Science International*, **2015**, 249, 25-34.

M. Fresnais, P. Richardin, A. Charrié, N. Gandolfo, M. Sepúlveda, E. Leize-Wagner, O12: Analysis of Chilean mummies' hair: Recent advances in their characterization. *Toxicologie Analytique et Clinique, Proceedings of the Analytical, Clinical and Forensic Toxicology International Meeting*, **2014**, 26:2, S9 - S10.

📄 Communications dans un congrès international

“Innovative characterization of hair from pre-Hispanic Andean mummies using mass spectrometry” M. Fresnais, P. Richardin, M. Sepúlveda, E. Leize-Wagner, A. Charrié-Duhaut. Oral presentation and Poster at the *64th ASMS (American Society of Mass Spectrometry) Conference*, San Antonio (USA), 5-9 juin 2016.

“Analysis of hair of mummies from Andean coast – Recent advances for their characterization” M. Fresnais, P. Richardin, A. Gimat, M. Sepúlveda, E. Leize-Wagner, A. Charrié-Duhaut. Oral presentation at the *19th meeting of SoHT (Society of Hair Testing) – Analytical, Clinical and Forensic Toxicology International Meeting*, Bordeaux, 10-13 juin 2014.

📄 Communications dans un congrès national

“Innovative proteomics approach for the characterization of mummies' hair from the Andean coast” M. Fresnais, P. Richardin, M. Sepúlveda, E. Leize-Wagner, A. Charrié-Duhaut (Communication orale et Poster). Congrès français SMAP (Spectrométrie de Masse et d'Analyses Protéomiques), Ajaccio, 15-18 septembre 2015.

“Analysis of Andean mummies' hair: Recent advances in their characterization” M. Fresnais, P. Richardin, A. Gimat, M. Sepúlveda, E. Leize-Wagner, A. Charrié-Duhaut (Communication orale). Colloque du GMPCA (Groupe français des Méthodes Pluridisciplinaires Contribuant à l'Archéométrie) – Archéométrie, Besançon, 27-30 avril 2015.

“Nouvelles avancées dans la caractérisation par spectrométrie de masse de cheveux de momies de la côte Andine” M. Fresnais, P. Richardin, M. Sepúlveda, E. Leize-Wagner, A. Charrié-Duhaut (Communication orale). *Rencontres du Club Jeunes de la SFSM*, Montélimar, 23-27 mars 2015.

“Characterization of hair of mummies from Andean coast by mass spectrometry” M. Fresnais, P. Richardin, A. Gimat, M. Sepúlveda, E. Leize-Wagner, A. Charrié-Duhaut (Communication orale). *Rencontres des clubs jeunes SFSM (Société Française de Spectrométrie de Masse) et SFEAP (Société Française d’Electrophorèse et d’Analyses Protéomiques) pendant le congrès français SMAP (Spectrométrie de Masse et Analyses Protéomiques)*, Lyon, 03 juillet 2014.

“Proteomics analysis of mummy hair - New perspectives for a better characterization” M. Fresnais, P. Richardin, A. Gimat, J. Hertzog, M. Sepúlveda, D. Berthet, K. Madrigal, E. Leize-Wagner, A. Charrié-Duhaut (Poster). *Congrès français SMAP (Spectrométrie de Masse et Analyses Protéomiques)*, Lyon, 30 juin-02 juillet 2014.

📄 Autres communications

“Apport des analyses physico-chimiques et moléculaires à l’étude d’archéomatériaux : Exemple des cheveux de momies préhispaniques de la côte Andine” M. Fresnais, P. Richardin, M. Sepúlveda, E. Leize-Wagner, A. Charrié-Duhaut (Communication orale). Journée Internationale des Jeunes Chercheurs « Aux frontières des disciplines. Recherche et interdisciplinarité : quelles pratiques pour quels enjeux ? », Nancy, 17 juin 2016.

“Innovative approach for the characterization of mummies’ hair from the Andean coast” M. Fresnais, P. Richardin, M. Sepúlveda, A. Charrié-Duhaut (Communication orale). *Séminaire scientifique à l’Université de Tarapacá*, Arica (Chili), 19 novembre 2015.

“Analyse de cheveux de momies de la côte Andine : Nouvelles perspectives pour leur caractérisation” M. Fresnais, P. Richardin, M. Sepúlveda, A. Charrié-Duhaut (Communication orale). *Journée scientifique du GDR Momies*, Paris, 20 novembre 2014.

“Proteomics analysis of mummy hair - New perspectives for a better characterization” M. Fresnais, P. Richardin, A. Gimat, J. Hertzog, M. Sepúlveda, D. Berthet, K. Madrigal E. Leize-Wagner, A. Charrié-Duhaut (Poster). Journée annuelle du réseau CAI-RN (Compétences Archéométrique Interdisciplinaires – Réseau National), Paris, 22 septembre 2014.

📄 Prix

Prix de la meilleure communication orale à la demi-journée du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse (CJSM) pendant le congrès SMAP (Spectrométrie de Masse et Analyses Protéomiques), Ajaccio, 15 septembre 2015

Prix d’encouragement de l’Association des Membres de l’Ordre des Palmes Académiques 67 (AMOPA 67), Strasbourg, 19 décembre 2014.

Prix décerné pour un travail universitaire particulièrement prometteur, notamment pour ses retombées attendues dans le domaine scientifique, culturel, technique, ou économique.

Annexe 5 – Publications dans Forensic Science International (2014)

Forensic Science International 249 (2015) 25–34



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forsciint

Recent advances in the characterization of hair of mummies from the Chilean Andean coast

M. Fresnais^{a,b}, P. Richardin^b, A. Gimat^b, M. Sepúlveda^c, E. Leize-Wagner^a, A. Charrié^{a,*}^a Laboratoire de spectrométrie de masse des interactions et des systèmes (LSMIS), 1 rue Blaise Pascal, 67008 Strasbourg, France^b Centre de recherche et de restauration des musées de France (CZRMF), Palais du Louvre, Porte des Lions, 14 quai François Mitterrand, 75001 Paris, France^c Laboratorio de Análisis e Investigación arqueométrico, Departamento de Antropología, Universidad de Tarapacá, 18 de sept. 2222, Casilla 6D, Arica, Chile

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 14 January 2015

Keywords:
Hair analysis
Andean mummies
SEM-EDS
XRF
FTIR
Qualitative proteomics

ABSTRACT

Two pre-Hispanic mummies from the Andean coast, belonging to a corpus of 16 mummies from the San Miguel de Azapa (Arica, Chile), were radiocarbon dated and analyzed in order to replace them in their historical context and to study the conservation state of the hair fibers and the heavy metal presence. The radiocarbon dating placed both mummies in the Formative period (1700 years BC to 500 years AD). Global and elemental analyses were performed using scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy and using X-ray fluorescence spectroscopy. These combined techniques enabled to prove the good global conservation state of the mummies' hair and to detect iron, lead, bromide and also arsenic in some cases, in significant amounts inside the hair fibers. Fourier transformed infra-red spectroscopy seemed to prove the good conservation state of the hair surface at a structural level that is why the conservation of hair proteins at a molecular level will be investigated by a proteomics approach in future work.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Annexe 6 – Proceedings of the Analytical, Clinical and Forensic Toxicology International Meeting

012: Analysis of Chilean mummies' hair: Recent advances in their characterization

M. FRESNAIS^{1,2}, P. RICHARDIN², A. CHARRIE¹, N. GANDOLFO², M. SEPÚLVEDA³, E. LEIZE-WAGNER¹

¹Laboratoire de spectrométrie de masse des interactions et des systèmes (LSMIS), Strasbourg, France ; ²Centre de recherche et de restauration des musées de France (C2RMF), Paris, France ; ³Faculty of social and legal sciences, University of Tarapacá, Arica, Chile

Introduction: Among human remains from museum collections, mummies have intrigued researchers for a long time. They are subject to much research in order to understand the mummification processes, to improve conservation and restoration protocols and to infer fascinating clues about their civilizations. We focus here on a corpus of Chilean mummies from the San Miguel de Azapa (Arica, Chile). The present work aims to study the conservation state of hair and to detect heavy metal presence [Boston & al. (2009) *Interciencia*, 34:5, 338-343]. These aspects are related to the environmental conditions in which the individual lived, as well as various hair treatments performed. Furthermore, the molecular fingerprint of the material may have been modified by anthropic or natural alterations [Charrié-Duhaut & al. (2007) *J. of Archaeological Science*, 34, 957-967]. This complexity makes this research a true analytical challenge.

Methods: The hair of mummies was first dated by measurements of carbon 14 using accelerator mass spectrometry (AMS) [Richardin & al. (2011) *Archaeol. Anthropol. Sci.*, 3, 379-384; Richardin & al. (2013) *Radiocarbon*, 55:3-4, 345-352]. We undertook morphological and structural analyses (scanning electron microscopy - SEM - and infra-red spectroscopy), to obtain a global overview of the conservation state of hair. The presence of heavy metals was studied by X-ray fluorescence and by SEM-EDS (energy dispersive X-ray spectroscopy). We are currently developing a proteomics approach (MALDI-MS and nanoLC-MS/MS analyses) in order to determine the amino acid sequences of keratin molecules and their alterations [Barthelemy (2011) PhD thesis, University of Strasbourg].

Results: Radiocarbon dating has shown that the mummies are from the Archaic (8000-1000 BC) and Formative (1000 BC – 500 AD) periods. According to the first analyses, hair surfaces (cuticles) seem well preserved. On the surface and inside the hair fiber, lead, iron and bromine are detected in significant amounts, and arsenic is also present in some cases.

Conclusion: This work enables us to better situate the corpus of mummies in their historical context, and to deny the fact that they came from the archaic Chinchorro. On the other hand, the detection of arsenic in some hair samples seems to suggest that some individuals suffered from chronic arsenic poisoning. The proteomics approach, currently in progress, should allow us to confirm the first conclusions on the good state of preservation of the hair and to study the interactions between heavy metals and keratin molecules. In order to do this, it is crucial to develop as a first step an extraction protocol of the hair proteins, in order to preserve the non-covalent interactions.

Annexes soumises à droits d'auteurs

Annexe 7 – Poster présenté à l'ASMS 2016, San Antonio (TX, USA).

Annexe 8 – Poster présenté à SMAP 2015, Ajaccio.

Annexe 9 – Poster présenté à SMAP 2014, Lyon.

Margaux FRESNAIS

Nouvelles approches par spectrométrie de masse pour la caractérisation de systèmes archéologiques et biologiques **Application à l'étude de cheveux de momies préhispaniques de la côte andine**

Résumé

Les cheveux constituent un matériau de choix en archéométrie pour l'étude des civilisations anciennes. L'étude moléculaire de cheveux de momies et de leur protéome peut apporter de précieuses informations sur la composition, la préservation et l'environnement de la fibre. Une approche protéomique *bottom-up* dédiée à l'analyse en MS des protéines de cheveux de momies a été donc implémentée. Celle-ci a permis l'identification des protéines capillaires de cheveux anciens à partir de quantités minimales, ainsi que la caractérisation de leur état de conservation. Cette approche a été associée à une stratégie interdisciplinaire, intégrant également des analyses structurales par FTIR, et élémentaires par SEM-EDS, XRF et PIXE. Enfin, le couplage direct TLC-MALDI-MS a été mis en place pour la caractérisation de systèmes biologiques et archéologiques, complexes et précieux.

Mots-clés : Spectrométrie de masse, cheveux de momie, protéomique, biomarqueur de dégradation des kératines, TLC-MALDI-MS.

Summary

Hair is an ideal material for the archaeometric study of past civilizations. Although it is rarely described, molecular study of hair and its proteome can provide precious clues on the ancient hair composition, its preservation state, as well as its environment. Here, we describe the implementation of a bottom-up proteomic approach for the mass spectrometry analysis of proteins from mummy hair. Through this approach, it was possible to identify the ancient hair proteins from a minimal initial amount of sample, and to characterize their molecular conservation state. This study was associated to an interdisciplinary project that also integrates structural analyses by FTIR and elemental analyses by SEM-EDS, XRF and PIXE. Finally, TLC-MALDI-MS hyphenation was implemented for the characterization of biological and archaeological systems, which are also complex and precious.

Keywords: Mass spectrometry, mummy hair, proteomics, biomarker of keratin degradation, TLC-MALDI-MS.