

Olivier SIRE, expert près la cour d'appel de Rennes

La cour d'appel de Rennes

En Analyses physico-chimiques, biologiques et Industries-Agro-Alimentaires

RAPPORT D'EXPERTISE

Demandeur : M. Thierry JAMIN

Rappel de la Mission	2
Méthodologie de l'expertise	2
Analyses spectroscopiques infrarouge	4
Acquisitions Infrarouge.....	6
Analyses Spectrales.	6
Analyses comparatives	12
Conclusions générales.....	17

Rappel de la Mission

Dans le cadre de *The Alien Project*, cinq prélèvements de différentes parties du corps de momies retrouvées sur le site de Nazca (Pérou) m'ont été envoyés pour examen de leur composition moléculaire par spectroscopie moyen infrarouge. Cette technique permet d'identifier la composition (bio)chimique de tout échantillon constitué de matière organique.

La présente expertise vise donc à analyser ces fragments momifiés.

Les analyses ont été conduites à l'Institut de Recherche Dupuy de Lôme (UMR CNRS 6027) à Vannes (France).

Les prélèvements étaient répertoriés comme suit :

- 01 – VICTORIA HUESO (hanche)
- 02 – MAIN TENDON (tridactyle)
- 03 – MAIN OS
- 04 – MARIA SACRUM
- 05 – MARIA HANCHE

Méthodologie de l'expertise

Les cinq échantillons ont été envoyés dans de petits tubes ou flacons en plastique. Une première étape a consisté à en faire des photos à fort grossissement. Les clichés ci-dessous ont été obtenus avec un boîtier Nikon D610 et un objectif MACRO NIKKOR105 1:2.8. Pour indiquer l'échelle, une pile bouton de 8 mm de diamètre a été systématiquement photographiée avec les objets. Les clichés haute-résolution sont disponibles dans un fichier compressé séparé du présent rapport.

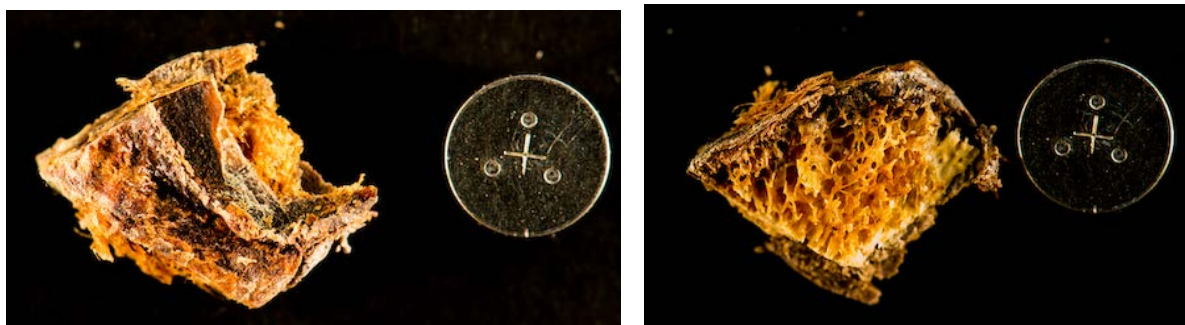


Fig.1 VICTORIA HUESO (deux faces)



Fig. 2 MAIN TENDON (deux faces)

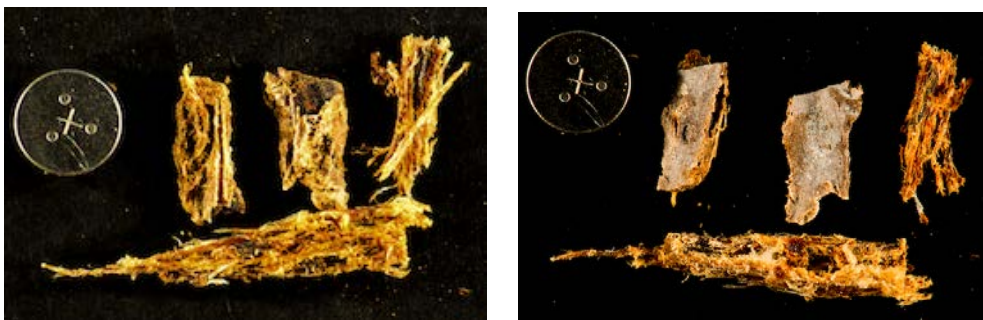


Fig. 3 MAIN OS TRIDACTYLE (deux faces)

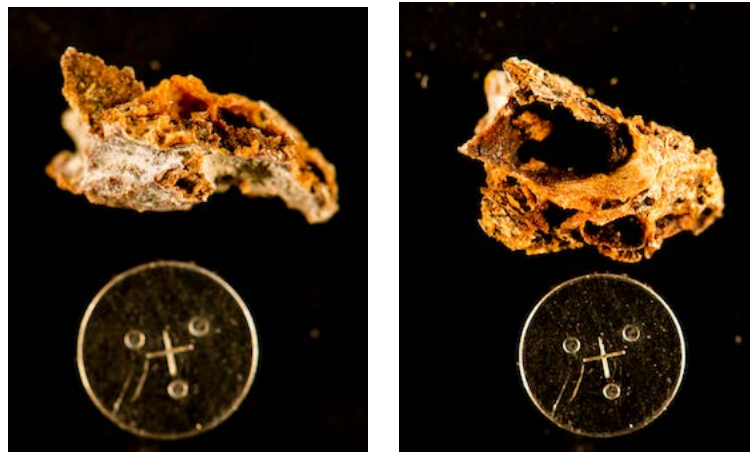


Fig. 4 MARIA SACRUM (deux faces)

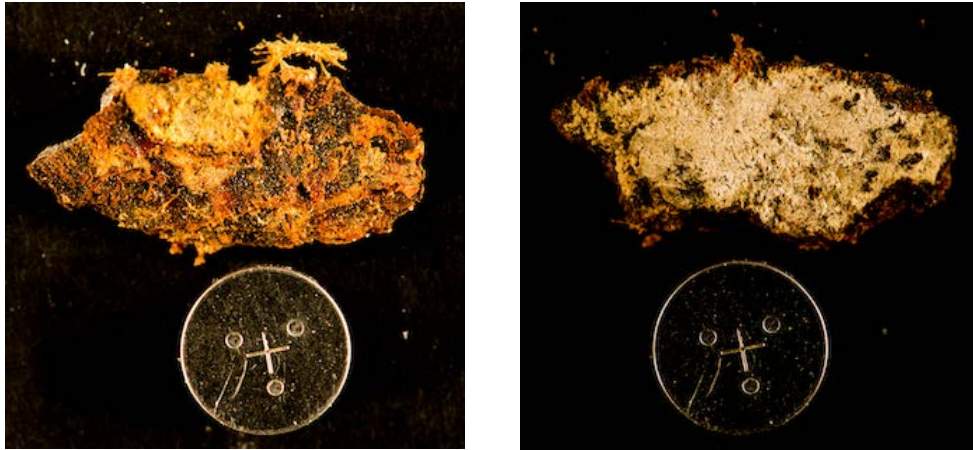


Fig. 5 MARIA HANCHE (deux faces)

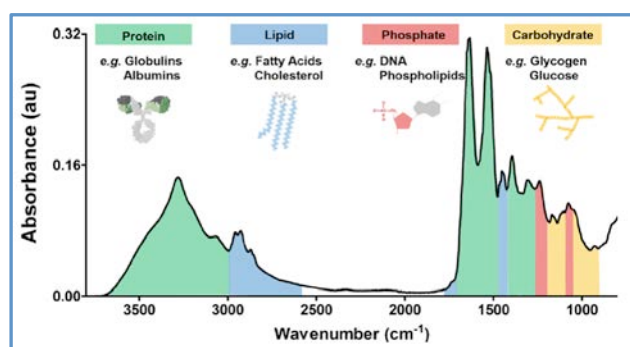
Analyses spectroscopiques infrarouge

Les échantillons ont ensuite été analysés en spectroscopie moyen infrarouge (MIR) à l'aide d'un microscope infrarouge Lumos (Bruker) en mode micro ATR.



FIG. 6 Micropsectrophotomètre LUMOS

Typiquement, cette spectroscopie d'absorption permet d'identifier les groupements chimiques présents dans l'échantillon d'intérêt au travers de leurs modes vibrationnels. Les groupes chimiques (O-H, C-C, N-H, C=O, etc. ...) présentent des bandes d'absorption différentes dans leur position dans le



spectre en fonction de la masse des atomes qui sont reliés par une liaison chimique covalente et du type de liaison (simple ou double). La figure ci-dessus, présente les principaux domaines spectraux reflétant les contributions respectives des protéines, lipides (graisses), sucres ou acides nucléiques (ADN, ARN).

Aux fins de comparaison, différents échantillons de « référence » ont été analysés. Il s'agit notamment d'échantillons de muscle, de peau et d'os de poulet placés dans un dessiccateur pendant deux mois et d'une mue de vipère (*Daboia palestinae*). Les clichés correspondants sont montrés ci-dessous.



Fig. 7 Mue de vipère (*D. palestinae*) **Fig. 8 Muscle déshydraté de poulet**



Fig. 9 OS de Poulet (Deux faces)



Fig. 10 Peau déshydratée de poulet (deux faces)

Acquisitions Infrarouge

Les différents échantillons ont été analysés par microspectroscopie MIR en mode ATR simple réflexion à l'aide d'un cristal Germanium. Les échantillons sont mis en contact avec le cristal ; la zone échantillonnée est d'environ $2\,000\ \mu\text{m}^2$ sur une épaisseur de $2\text{--}3\ \mu\text{m}$; C'est donc essentiellement une analyse de surface. Pour chaque analyse, 128 spectres sont moyennés avec une résolution spectrale de $4\ \text{cm}^{-1}$.



Prétraitements des spectres. Afin d'optimiser la résolution spectrale, les dérivées seconde des spectres sont calculées et une normalisation vectorielle est effectuée ce qui permet de compenser des variations d'absorbance due simplement à la « quantité » de matière vue par le cristal. Ces dérivées secondes sont utilisées pour les analyses statistiques multivariées.

Au cours des acquisitions, il a été noté pour certains échantillons des petits spots d'ébullition qui caractérisent une évaporation d'eau. Ce phénomène est dû au fait que la lumière du microscope (allumée avant l'acquisition MIR proprement dite) est concentrée sur une très petite surface ce qui provoque un échauffement local. On peut en déduire qu'il existe dans les échantillons des petites poches d'eau piégées sans doute dans un environnement lipidique hydrophobe, donc étanche. La fusion des lipides sous la chaleur de la lampe rendrait possible l'évaporation de l'eau.

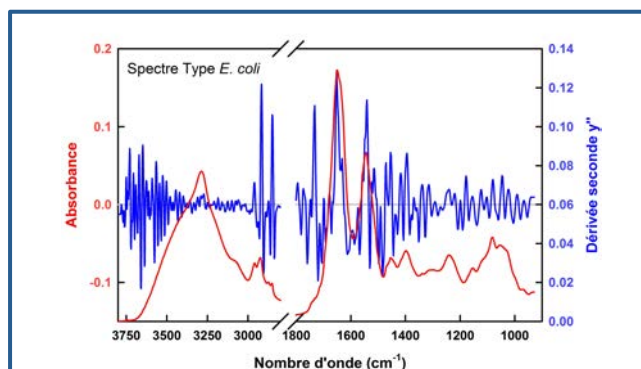
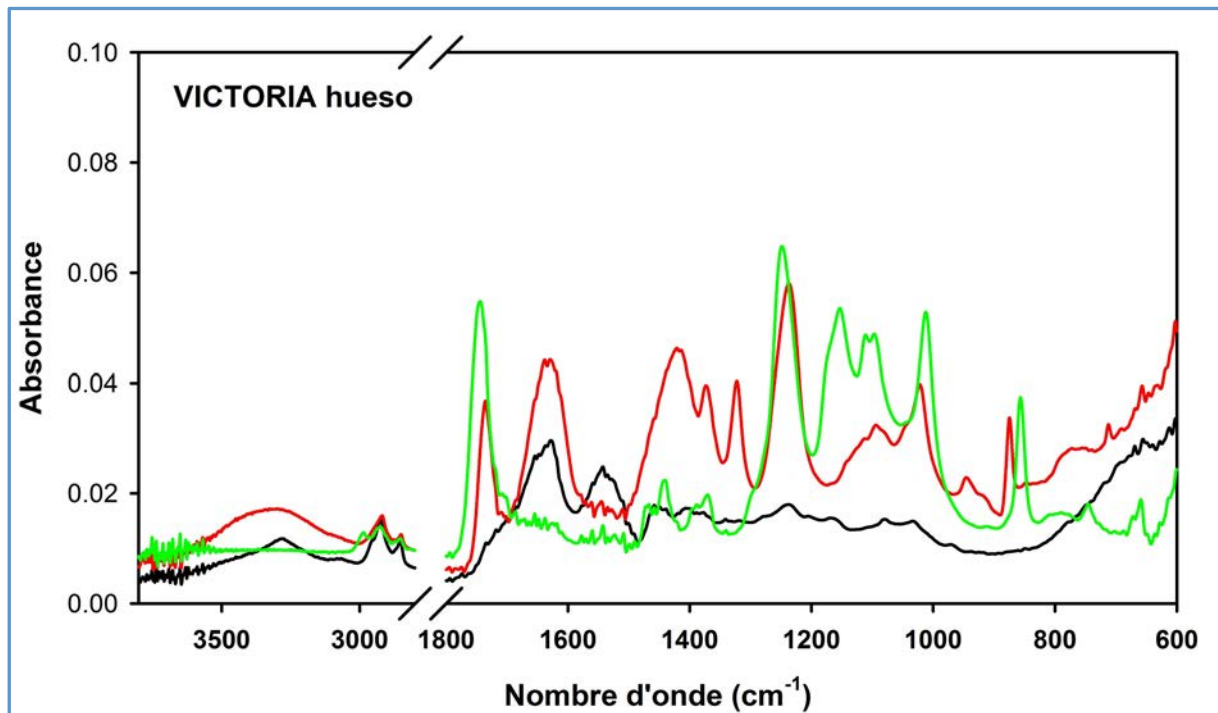


Fig. 11 Spectre MIR type (ici de bactérie) avec sa dérivée seconde (en bleu)

Analyses Spectrales.

Les spectres individuels sont tout d'abord analysés pour identifier au mieux leurs composants biochimiques (protéines, graisses, sucres, ...). Pour tenir compte des hétérogénéités spatiales (à l'échelle du mm), plusieurs acquisitions (3 à 5) ont été effectuées sur chaque échantillon. Les spectres les plus représentatifs sont présentés. Pour tous les échantillons, les deux faces ont été analysées.

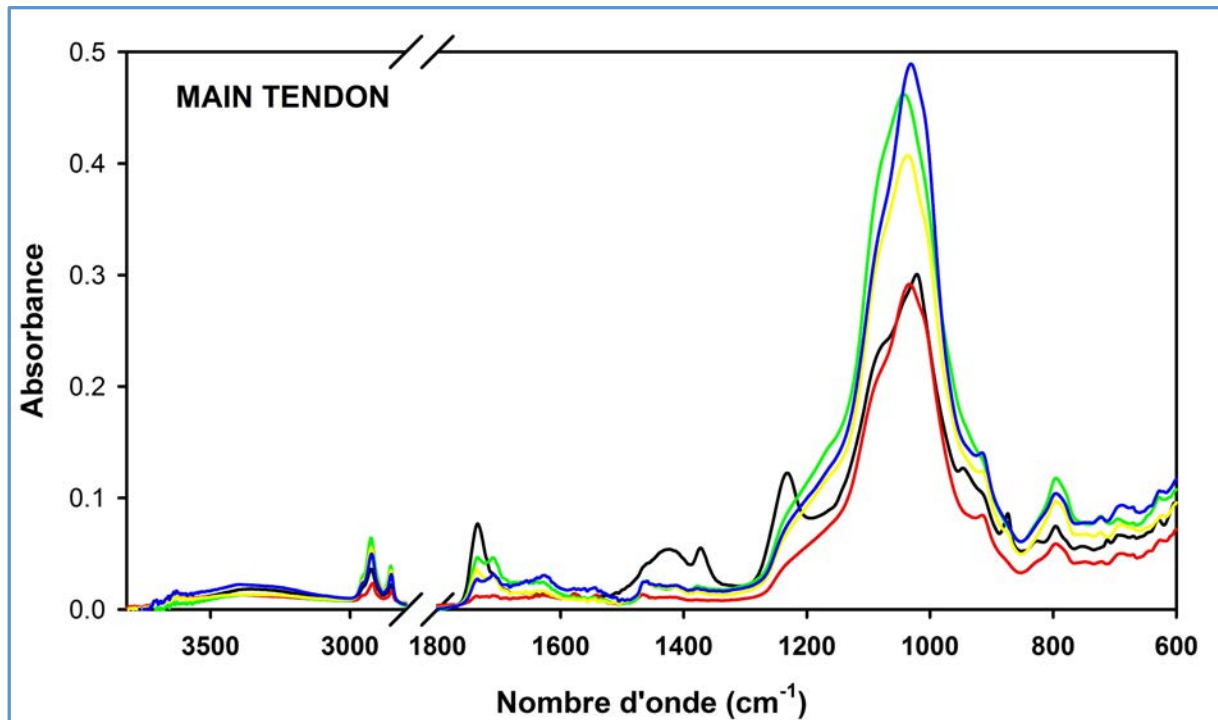
Fig. 12 VICTORIA Hueso



Cet échantillon présente une face très irrégulière (Fig.1 gauche ; spectres noir et rouge) et une face nettement alvéolée (Fig.1 droite, spectre vert).

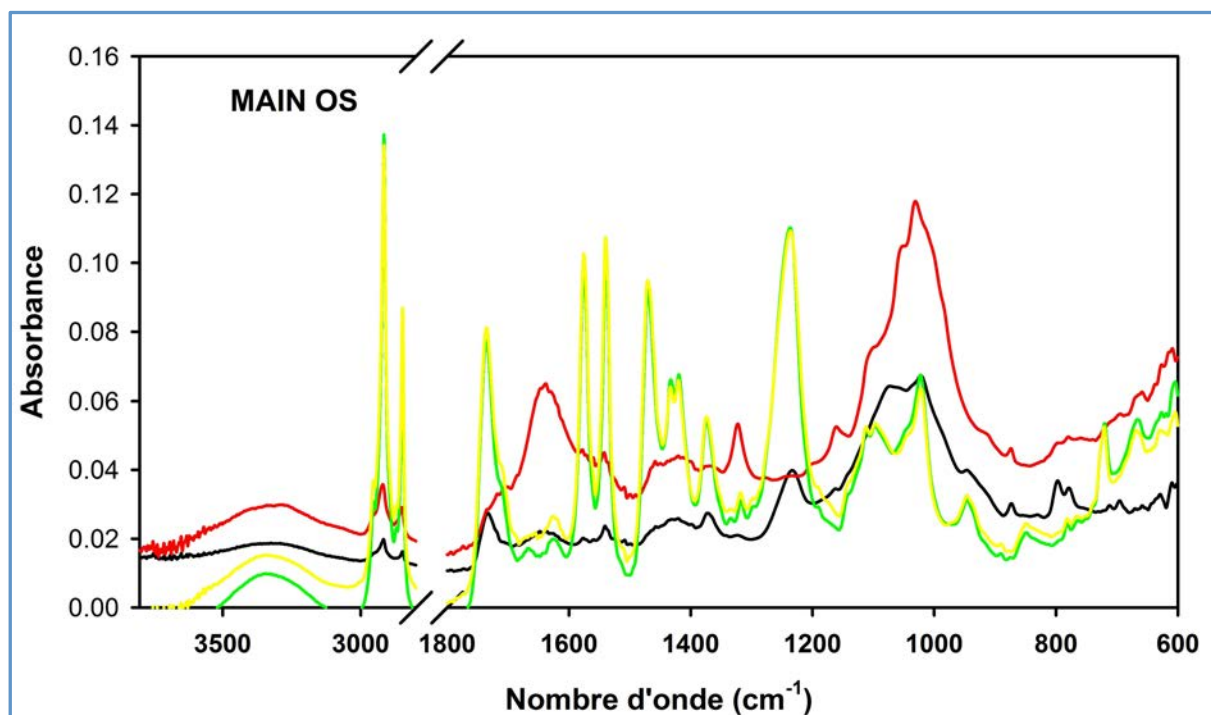
La face irrégulière est hétérogène avec présence de protéines (amides I et II) à 1540 et 1650 cm⁻¹, de tissu minéralisé (bande des carbonates CaCO₃ à 860-870 cm⁻¹) et des lipides estérifiés (1740, 1420, 1320 et massif 2800-3000 cm⁻¹). La face alvéolée est dominée par les lipides avec une bande ester très importante ainsi qu'une bande à 1240 intense. La bande à 1010 doit refléter le groupement phosphate qui est caractéristique du tissu osseux. Cette dernière doit être liée à la structure alvéolaire bien visible sur la Fig.1 (droite).

Fig. 13 Main Tendon



Les spectres « Main tendon » (Fig.2) collectés sur chacune des faces (bleu-vert-jaune vs noir-rouge) sont qualitativement proches si ce n'est une contribution plus forte de la matrice phosphocalcique. (massif à 1030 cm⁻¹ et bande à 800 cm⁻¹) Les lipides sont détectables à 1740 et 2800-3000 cm⁻¹. La bande à 1230 cm⁻¹ ne peut pas être attribuée de façon univoque. L'absence de signature des protéines caractéristiques des tendons (collagène et élastine) laisse penser que ces constituants ont été détruits ou que le prélèvement ne correspond pas spécifiquement à ce tissu mais plutôt à du tissu osseux.

Fig. 14 Main Os tridactyle



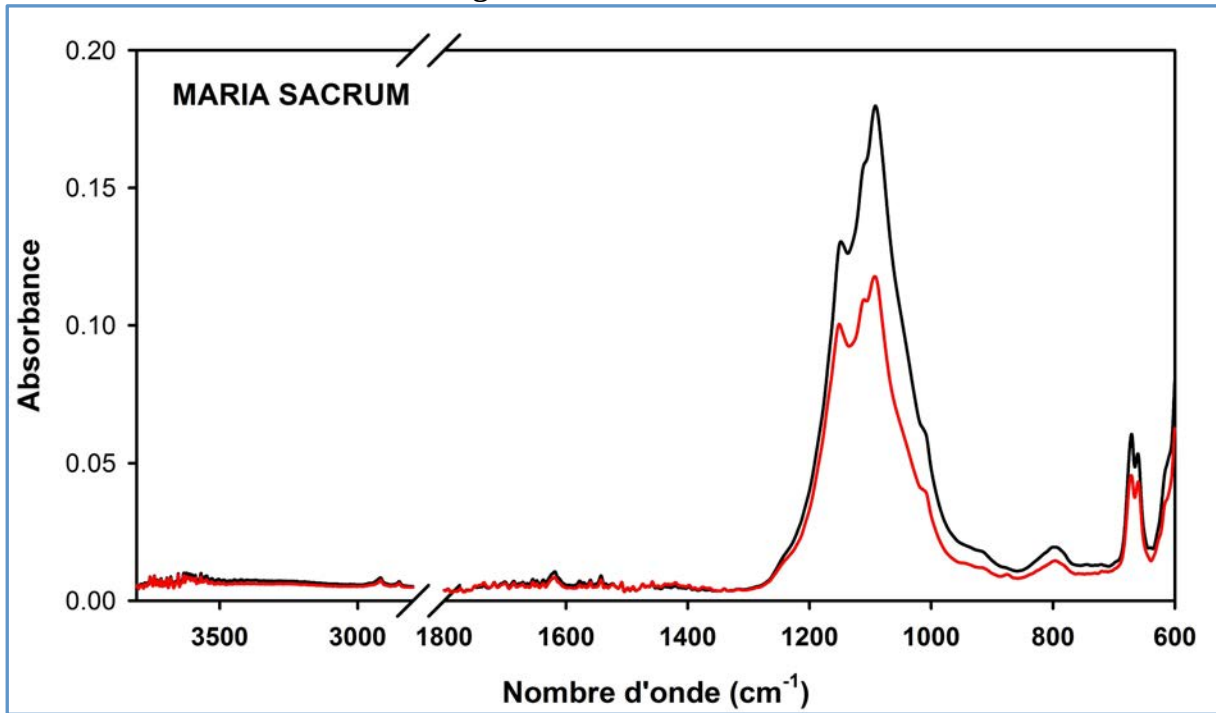
Cet échantillon (Fig.3) présente un aspect relativement uni et lisse sur une de ces faces pour deux fragments, tandis que la face opposée a un aspect fibreux. On considèrera que la face lisse correspond à la face externe de l'os, l'aspect fibreux à la face interne.

Les spectres noir et rouge correspondent à la face externe. Ces spectres sont dominés par une bande large et intense (1030 cm^{-1}) qui représente la vibration des groupements phosphate (PO_4^{3-}) caractéristique de la matrice minérale phosphocalcique de l'os. L'épaule et le petit pic vers 880 cm^{-1} reflètent les carbonates. La bande à 1640 cm^{-1} est représentative du collagène qui est la protéine la plus abondante de l'os. La bande à 1320 cm^{-1} (visible sur le spectre rouge) ainsi que les bandes entre 2800 et 3000 cm^{-1} reflètent les lipides (graisses).

Les spectres acquis sur la face interne de l'os sont quant à eux, largement dominés par les lipides qui sont les constituants majeurs de la moelle osseuse. La présence de triglycérides en forte concentrations est signée par des bandes intenses entre 2800 et 3000 cm^{-1} (groupes méthylène CH_2 et méthyle CH_3 des acides gras) et à 1740 cm^{-1} (liaison $\text{C}=\text{O}$ ester glycérol-acide gras des triglycérides). On note également une bande intense à 1240 cm^{-1} qui signe la vibration asymétrique des CH_2 dans les phospholipides.

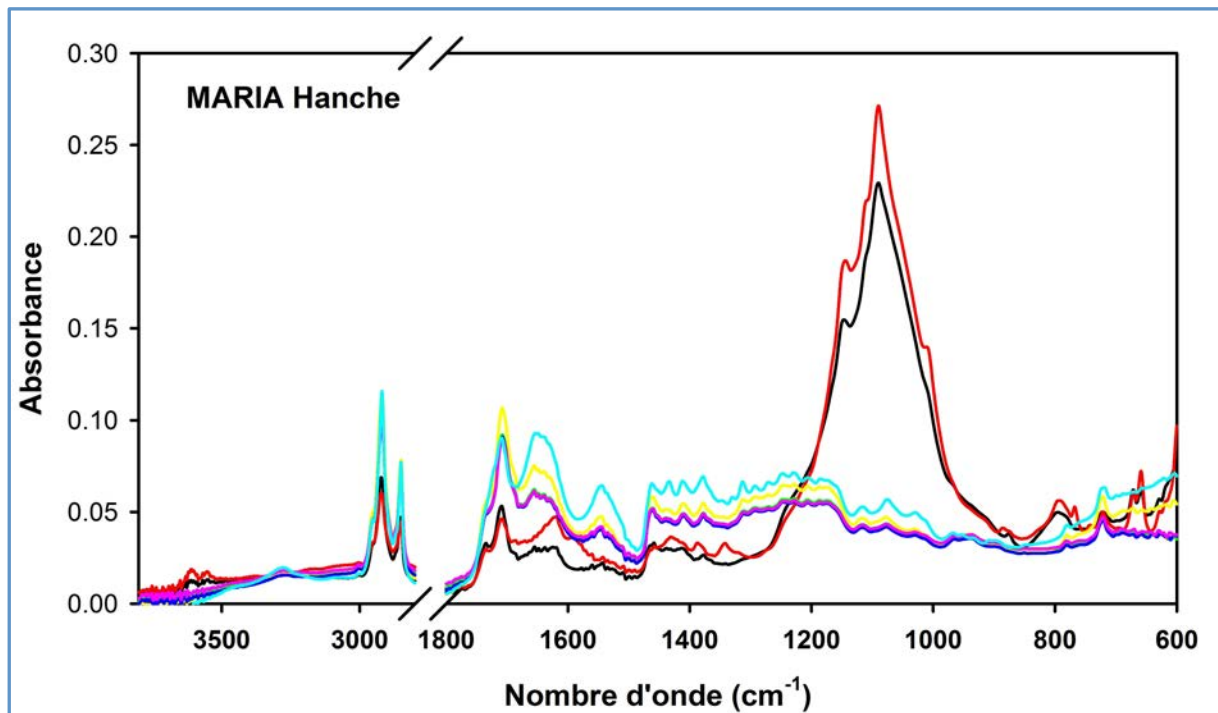
Par contraste avec la face externe, les protéines sont virtuellement absentes tandis que la bande phosphocalcique (1030 cm^{-1}) est deux fois moins intense.

Fig. 15 MARIA Sacrum



Le spectre MIR de cet échantillon (Fig.4) est dominé par le massif à 1030 cm⁻¹ qui traduit le tissu osseux. Aucune trace de lipides ou de protéines n'est détectée. Il est à mentionner un doublet à 660-670 cm⁻¹ qui est généralement attribué au groupement soufré S=O. La présence de soufre n'est pas recensé dans la partie minérale de l'os. Cette attribution peut donc être soumise à caution.

Fig. 16 MARIA Hanche



Cet échantillon présente deux faces d'aspects différents. La face représentée Fig.5 (droite) est caractérisée principalement par une bande phosphocalcique à 1030 cm⁻¹ (spectres noir et rouge) avec une contribution lipidique visible entre 2800 et 3000 cm⁻¹. L'autre face (spectres jaune, cyan, magenta et bleu) est de nature essentiellement lipidique (2800-3000 et 1710 cm⁻¹) avec une présence de protéines visibles par les bandes amides I (1640 cm⁻¹) et II (1540 cm⁻¹) caractéristiques de ces macromolécules.

On retrouve donc les caractéristiques du tissu osseux avec une face essentiellement minérale et l'autre marquée par les lipides de la moelle osseuse.

Analyses comparatives

Afin de disposer de tissus « référence » les plus proches possibles des échantillons, différents tissus (poulet et mue de serpent) ont été analysés. Les tissus de poulet ont été préalablement placés dans un dessiccateur sous vide pendant deux mois en présence de silica gel. La mue de serpent a été analysée telle quelle. Les différents spectres obtenus sont présentés ci-dessous.

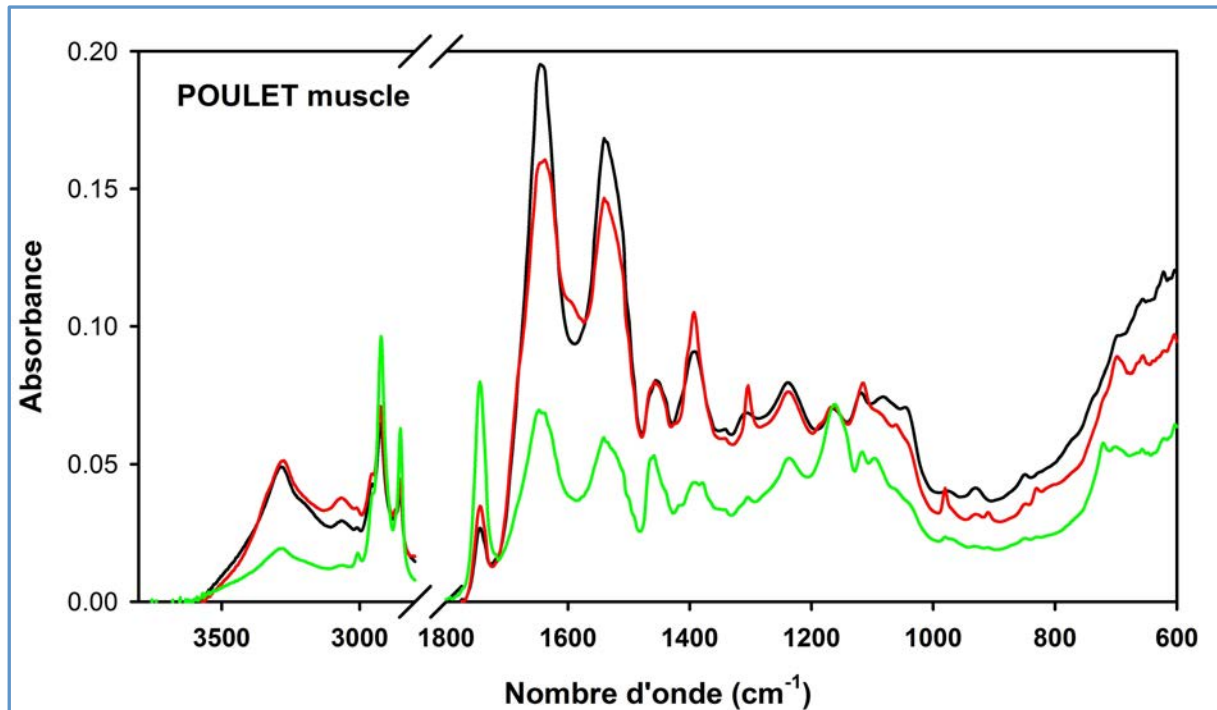


Fig. 17

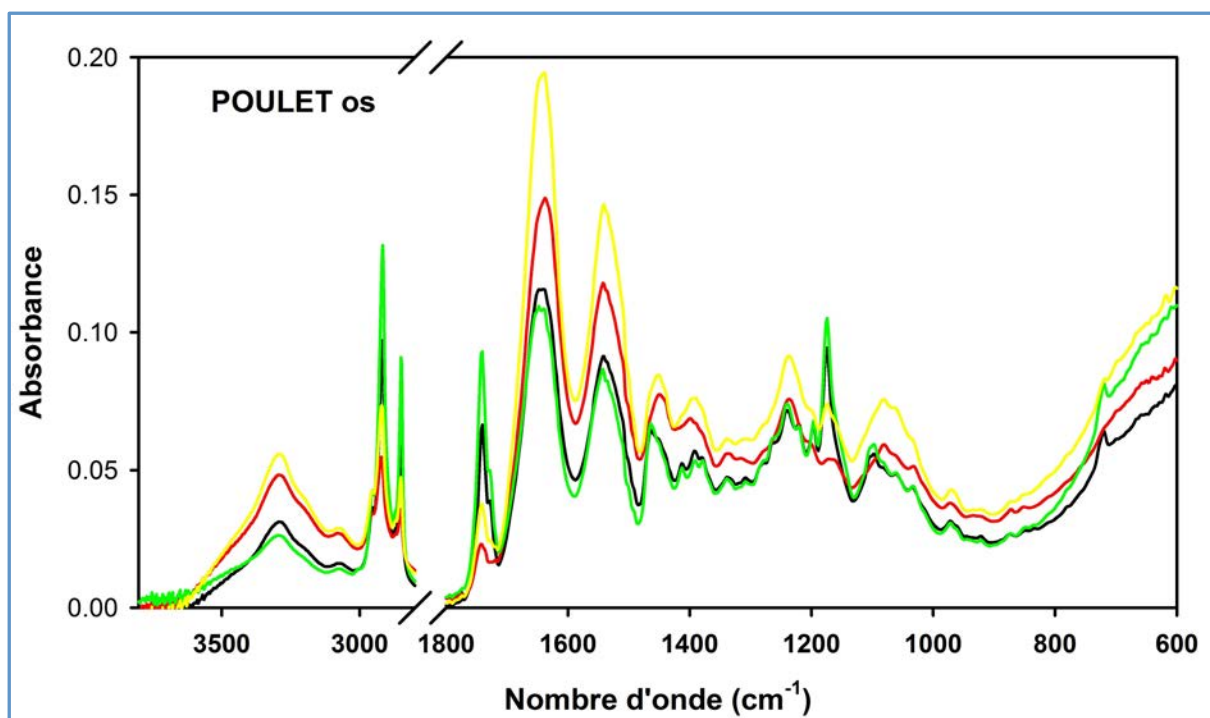


Fig. 18

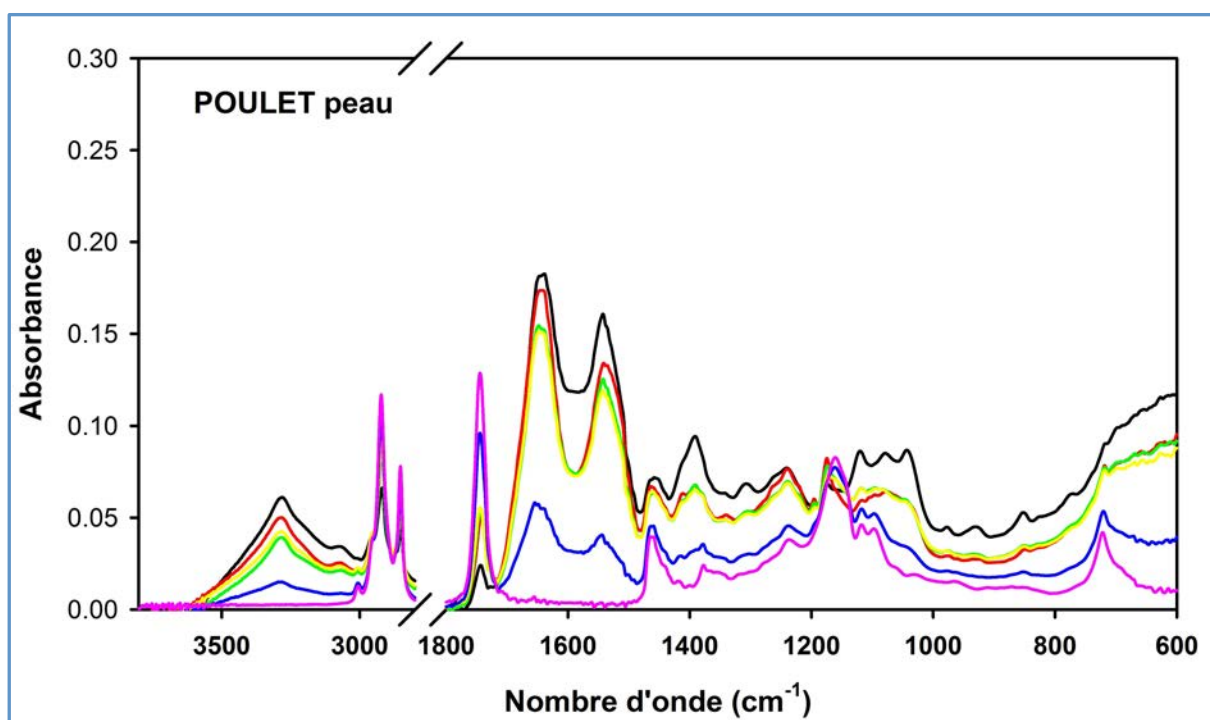


Fig. 19

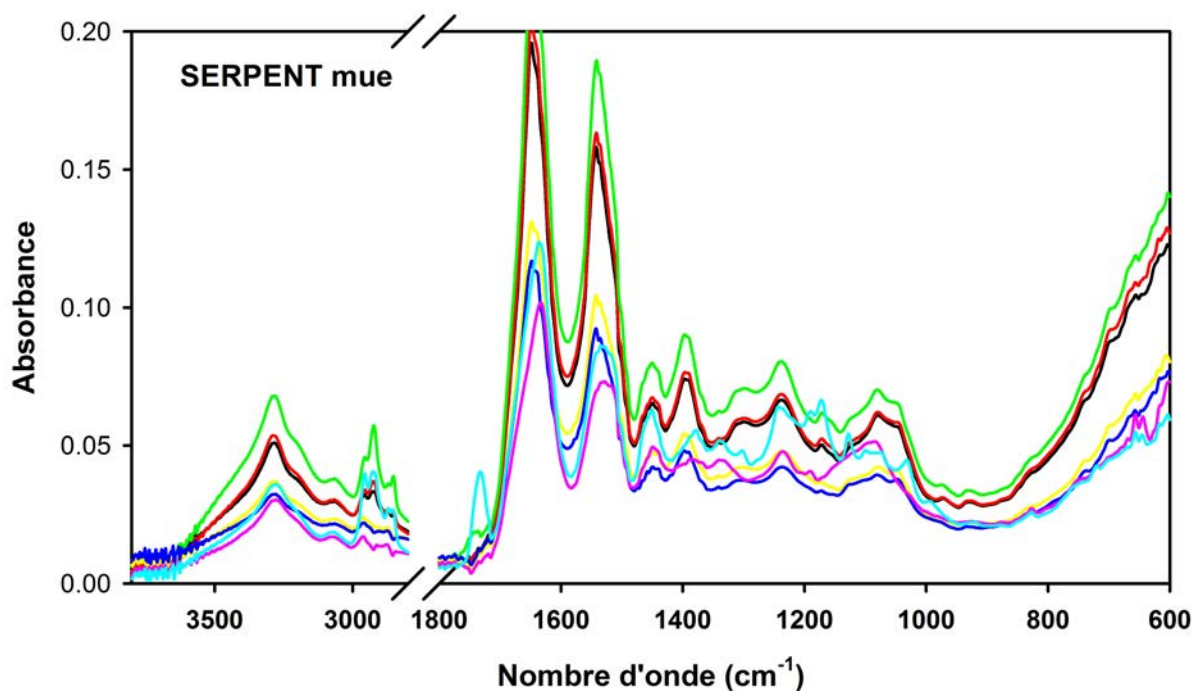


Fig. 20

Le fait saillant qui ressort de ces comparaisons entre échantillons momies et échantillons de *référence* est la quasi absence (ou faible concentration) des protéines retrouvées dans les échantillons de momies. Ce fait pourrait s'expliquer par une dégradation chimique des protéines qui se traduirait par une lyse des liaisons peptidiques qui relient les acides aminés entre eux (une protéine est un polymère d'acides aminés). En effet, comme mentionné ci-dessus, la liaison peptidique absorbe en MIR à 1640 et 1540 cm^{-1} . Or ces bandes « protéiques » ne sont visibles que dans les échantillons provenant de la hanche de Maria et Victoria.

On notera également que les faces internes des os analysés présentent une structure alvéolaire.

Afin de mettre en évidence les similarités et di-similarités entre échantillons, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée. Cette analyse, en permettant de réduire la dimensionnalité des spectres MIR, permet de calculer une « distance euclidienne » entre deux spectres représentés dans un espace (ici) à deux dimensions. La distance entre deux bipoints reflète donc la plus ou moins grande proximité entre deux échantillons. Les figures ci-dessous, dites cartes factorielles, présentent la distribution des individus (les spectres).

Codes échantillons :

VH E/I	Victoria Hueso (hanche) face Externe/Interne
MT	Main Tendon
MO E/I	Main Os face Externe/Interne
MS	Maria sacrum
MH E/I	Maria hanche face Externe/Interne

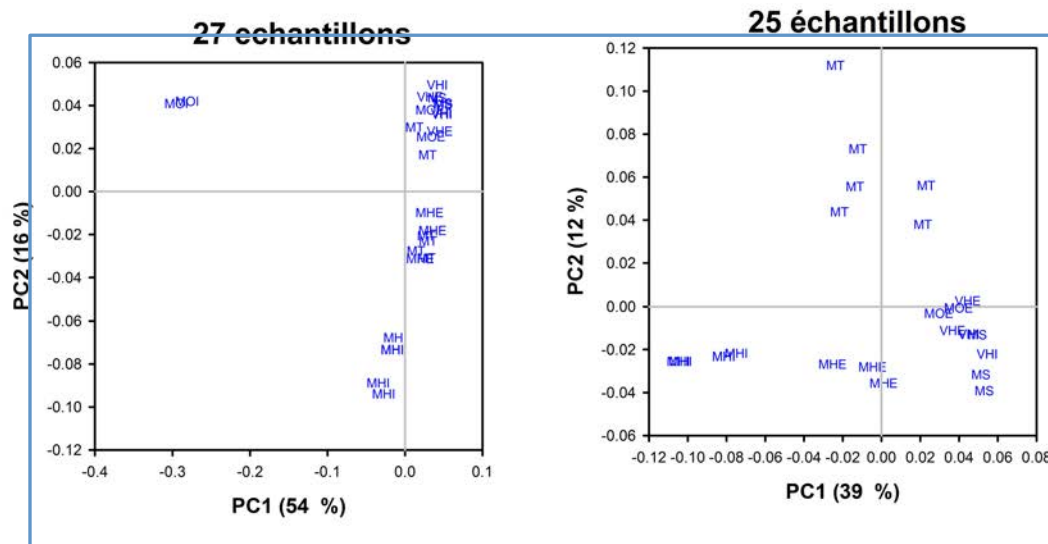


Fig. 21

La Figure 21 (Gauche) présente la carte factorielle de tous les échantillons provenant des momies. Il ressort très nettement que les échantillons MOI (Main OS face interne) sont très différents de tous les autres. Ces différences sont évidentes quand on compare leurs scores (assimilables à des coordonnées en x) négatif (environ -0,3) aux scores voisins de zéro des autres échantillons. Le pourcentage affiché sur chaque axe représente le % de variabilité représenté par une composante principale donnée ; 54% pour PC1 et 16% pour PC2 dans le cas présent.

Une seconde ACP a donc été effectuée pour « dilater » les autres échantillons ; c'est ce que représente la Figure 21 droite. Les échantillons MT forme un nuage (ou cluster) bien distinct, ainsi que les échantillons MHI et MHE. Les échantillons MOE, VHE/VHI et MS sont proches les uns des autres.

Une première constatation est que les prélèvements sur la hanche de Maria et Victoria sont distincts. Une seconde est que la face externe de la Main Os (MOE) tridactyle est proche de VHE, un peu moins de MS.

Pour situer ces échantillons par rapport à un jeu de « références » les échantillons déhydratés de poulet et de mue de serpent ont été projetés sur la carte factorielle construite à partir des seuls échantillons en provenance des momies.

Pour les références, les codes sont :

PO E/I	Poulet Os face Externe/Interne
PP	Poulet peau
PM	Poulet muscle
ECA	Ecaille mue de vipère
TEG	Tégument mue de vipère
SER	Face interne de la mue de vipère

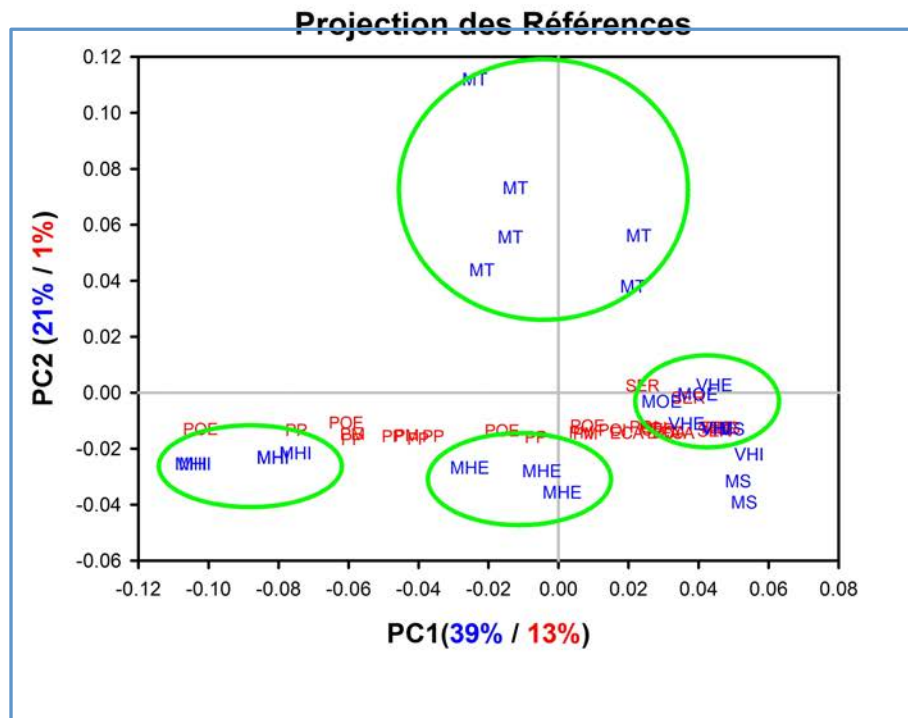


Fig. 22

Ces « références » sont ici projetées en rouge. On voit qu'elles présentent des scores très faible selon l'axe PC2 (y) et que cet axe ne présente que 1% de la variabilité de ces références. Cela signifie que ces échantillons sont très mal décrits par la PC2 du modèle. Il n'en va pas de même avec la PC1 bien que la représentativité de la PC1 demeure faible (13%).

Bien que ces « rapprochements » soient sujets à caution, on note les proximités de l'échantillon MOE (Main Os externe) avec les échantillons de mue de vipère.

Conclusions générales

1. Les analyses spectrales effectuées dans le cadre de la présente expertise démontrent de façon indiscutable que les échantillons remis correspondent bien à des échantillons biologiques fortement déshydratés.
2. Seule la nature du tissu correspondant à Main Tendon semble plus correspondre à du tissu osseux qu'à un tendon, ce type de tissus étant essentiellement composé de protéines, collagène pour l'essentiel. Ceci est peut-être à rapprocher des tissus osseux qui, comme on l'a noté, présentent des taux faibles ou non détectables de protéines.
3. Les tentatives de rapprochement avec des échantillons déshydratés en laboratoire sont peu probantes. Il serait intéressant de pouvoir rapprocher les spectres de mue de vipère avec un échantillon de peau de l'espèce reptilienne.
4. L'échantillon Main Os (MOE) semble être plus proche de Victoria (VHE) que de Maria ; ce point est à vérifier car l'expert n'a pas connaissance que l'échantillon Main Os ait été identifié comme appartenant à une espèce particulière.
5. Si des attributions plus précises s'avéraient nécessaires, elles devront se baser sur un plus grand nombre d'échantillons avec une connaissance précise du type de tissu. Ceci vaut pour les échantillons des momies, car, on l'a vu, le rapprochement avec des échantillons déshydratés en laboratoire est peu probant.
6. Le point concernant les protéines, très peu présentes, serait aussi à investiger sur des échantillons avérés comme étant du muscle.

Fait à Vannes, le 30 juillet 2019
Olivier SIRE
Expert