



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par:

*l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)*

Discipline ou spécialité:

*Science et Génie des Matériaux - CO034*

---

Présentée et soutenue par : *Anne GRUNENWALD*

le : *vendredi 28 Mars 2014*

Titre :

*Etude de l'interaction entre ADN et apatites analogues au minéral osseux et dentaire –  
Implications pour la préservation de l'ADN ancien, son extraction, son analyse*

---

Ecole doctorale :

*ED SDM : Sciences de la Matière*

Laboratoires d'accueil :

*Institut Carnot CIRIMAT, UMR CNRS 5085, Toulouse*

*Laboratoire d'anthropologie moléculaire et imagerie de synthèse, UMR CNRS 5288, Toulouse,  
Strasbourg*

Direction de Thèse :

Mme Christine KEYSER, Professeur, Université de Strasbourg

Mme Anne-Marie SAUTEREAU, Professeur, Université de Toulouse

M. Christophe DROUET, CR1 CNRS, Université de Toulouse

Rapporteur-e-s :

Mme. Ina REICHE, DR2 CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Paris

M. Ludovic ORLANDO, Associate professor, Université de Copenhague, Danemark

Examineur-e-s :

Mme Marie-France DEGUILLOUX, Maître de conférences, Université de Bordeaux

M. Jaime GOMEZ-MORALES, Senior Res.Scientist, Université de Grenade, Espagne

M. Jacques SCHOTT, DR1 CNRS Emerite, Université de Toulouse



*A la mémoire de Don Van Vliet*  
*(1941 – 2010)*



## REMERCIEMENTS

Mes remerciements les plus chaleureux vont à mes encadrants. Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame Christine Keyser, qui m'a accordé sa confiance en me confiant ce sujet de recherche, à deux reprises, lors de ma thèse d'exercice en Chirurgie Dentaire, puis dans le cadre de ce doctorat ; je la remercie pour son soutien, son expertise scientifique dans le domaine de l'ADN ancien et pour sa gentillesse.

Que Madame Anne-Marie Sautereau reçoive ici le témoignage de ma profonde reconnaissance. Je la remercie pour son accueil, pour ses conseils avisés, pour son aide constante. Cette collaboration fût très enrichissante.

J'ai eu la chance de pouvoir travailler avec Monsieur Christophe Drouet, qui n'a pas hésité à m'intégrer dans la communauté des physico-chimistes, à me transmettre son savoir et son enthousiasme. Je le remercie pour son indéfectible soutien scientifique. J'espère que, grâce à lui, cette thématique de recherche va pouvoir se pérenniser.

Je souhaite également remercier Messieurs les Professeurs Bertrand Ludes et Eric Crubézy, sans lesquels ce projet de thèse n'aurait pas vu le jour. Je les remercie pour leur appui, et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Les différentes personnalités qui composent ce jury me font le grand honneur d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je remercie Madame Ina Reiche (Laboratoire d'Archéologie Moléculaire et Structurale) et Monsieur Ludovic Orlando (*Centre for GeoGenetics*) d'avoir relu ce travail en détails. Je remercie Madame Marie-France Deguilloux, chercheuse au laboratoire PACEA (« *de la préhistoire à l'actuel : culture, environnement et anthropologie* »), Monsieur Jaime Gomez Morales, chercheur au *Laboratorio de Estudios Cristalográficos*, et Monsieur Jacques Schott, chercheur au Géosciences Environnement Toulouse, pour leur examen du manuscrit. J'espère que des éléments de ce travail auront pu entrer en résonance avec vos propres disciplines.

Mes remerciements sincères vont aux membres des équipes dans lesquelles j'ai pu, sans exception, travailler dans d'excellentes conditions, matérielles et humaines. Ainsi, je remercie Mesdames Laure Tonasso, Stéphanie Schiavinato et Valérie Cadamuro pour leur soutien technique à l'AMIS. Je remercie chaleureusement chacun des membres de l'AMIS, sachez que j'ai beaucoup apprécié ces (trop rares) moments que nous avons partagés, merci notamment à Mesdames Morgane Gibert, Clémence Hollard, Marie Lacan, Harilanto

Razafindrazaka, Patricia Balaesque, Catherine Thèves, Line Hillat et Veronica Pereda, ainsi qu'à Messieurs Patrice Gérard et François-Xavier Ricaut.

Je remercie mes collaborateurs de l'équipe « Phosphates, Pharmacotechnie, Biomatériaux » (PPB) du CIRIMAT. Un grand merci à Mesdames Sandrine Cavalié, Françoise Bosc et Hélène Ternet, ainsi qu'à Messieurs Olivier Marsan et Cédric Charvillat pour leur aide concrète sur les aspects expérimentaux de ce travail. Je remercie également les étudiants que j'ai encadrés au cours de ce travail : Alice Gimat, Claire Perrot, Cécile Oblette, Alexis St Georges, Erik Morgoun et Mike Coulson.

Des personnalités extérieures m'ont également apporté leur aide pour mes essais de sonication : mes remerciements à Madame Leonora Poljak (Laboratoire de Microbiologie et Génétiques Moléculaires, Toulouse), Monsieur Hervé Acloque (INRA, Toulouse) et Monsieur Dominique Poncelet (Société Diagenode) pour leur contribution et leur gentillesse.

J'ai pu travailler au sein des deux composantes de l'équipe PPB. Je remercie chaque membre pour la qualité de l'accueil qu'ils m'ont réservé, Je remercie en particulier, du côté Ensiacet, Mesdames Christèle Combes et Dominique Bonsirven, Monsieur Christian Rey, mais aussi l'ensemble de l'équipe qui sait comment créer un climat de travail efficace et convivial. Merci aux membres du site Faculté de Pharmacie, ma deuxième maison : Mesdames Sophie Cazalbou, Sophie Girod-Fullana et Audrey Tourette, ainsi que Monsieur Fabien Brouillet. Merci également aux doctorants, anciens et « modernes », avec lesquels j'ai eu la chance de travailler (Hassan, Marie-Alix, Patricia, Nicolas, Sylvaine, Caroline, Raya, Pierre, Audric, Marion, Emmanuelle).

Je remercie Mesdames Adrianna Lacel et Deborah Goffner que j'ai rencontrées au cours de deux colloques. Leur curiosité scientifique et leur dynamisme n'ont fait qu'augmenter mon attrait pour la recherche.

Un grand merci à mes amis, qui m'ont vraiment beaucoup aidé (Solène Frattini, Pauline Delage, Hi Lane Siraut, Samia Adhal, David Ducoffre, Agathe Raybaud, Francine Adjagbenon, Heddy Boubaker, Bertrand Fahys – les relecteurs de dernière minute).

# TABLES DES MATIERES

---

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>19</b>
1 Contexte de l'étude.....	19
2 Présentation du mémoire.....	23
3 Références bibliographiques .....	24
<b>CHAPITRE I. SUBSTRATS MINERAUX DE L'ADN ANCIEN ET ANALOGUES SYNTHETIQUES.</b>	
<b>CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA DIAGENESE OSSEUSE .....</b>	<b>25</b>
<b>A Données bibliographiques sur l'identification de tissus biologiques minéralisés en tant que substrats de l'ADN ancien .....</b>	<b>26</b>
1 Généralités.....	26
1.1 Notions de biominéralisation .....	26
1.2 Définition et propriétés générales de l'hydroxyapatite stœchiométrique ...	28
1.2.1 Substitutions ioniques .....	30
<i>Substitutions cationiques</i> .....	30
<i>Substitutions anioniques</i> .....	31
1.2.2 (Non) stœchiométrie .....	32
2 Le tissu osseux .....	33
2.1 Composition du tissu conjonctif osseux .....	33
2.1.1 Phase organique .....	33
2.1.2 Phase minérale .....	35
<i>Composition</i> .....	35
<i>Dimensions</i> .....	36
<i>Propriétés de surface</i> .....	36
1.1 Organisation du tissu osseux.....	39
2.1.3 Interface organo-minérale.....	39
<i>A l'échelle moléculaire</i> .....	39
<i>A l'échelle nano- micromorphologique</i> .....	40
2.1.4 Organisation histologique .....	42
2.2 Substrats osseux d'ADN ancien.....	45
3 L'organe dentaire .....	47
3.1 Complexe pulpo-dentinaire.....	48
3.1.1 Dentine .....	48
3.1.2 Pulpe.....	50
3.2 Cément .....	50
3.3 Email .....	51
3.4 Substrat dentaire d'ADN ancien .....	52
4 Remarques conclusives .....	54
<b>B Modèles synthétiques des minéralisations biologiques et biomimétisme .....</b>	<b>55</b>
1 Synthèse d'analogues biomimétiques .....	56

2	Caractérisation physico-chimique .....	58
2.1	Diffraction des rayons X .....	59
2.2	Analyses chimiques .....	62
2.3	Analyse spectroscopique vibrationnelle.....	63
2.4	Mesures de surface spécifique .....	68
3	Remarques conclusives .....	69
<b>C</b>	<b>Contribution à l'étude de la diagenèse squelettique.....</b>	<b>70</b>
1	Généralités.....	70
1.1	Définitions.....	70
1.2	A quoi sert l'étude de la diagenèse ? .....	71
1.2.1	Fossiles moléculaires .....	72
1.2.2	Fossiles élémentaires.....	73
	<i>Isotopes stables et radioactifs.....</i>	<i>73</i>
	<i>Eléments traces.....</i>	<i>74</i>
2	Acteurs de la diagenèse .....	74
2.1	Histoire taphonomique.....	75
2.2	Processus biogéochimiques.....	77
2.2.1	Température .....	77
2.2.2	pH.....	78
2.2.3	Oxygène .....	78
2.2.4	Eau .....	78
2.2.5	Sels .....	79
2.2.6	Activité microbologique .....	79
3	Diagenèse des tissus squelettiques en tant que substrats d'ADN ancien .....	79
3.1	Email dentaire .....	80
3.2	Collagène de type I .....	82
3.3	Apatite nanocristalline .....	83
	<i>Adsorption.....</i>	<i>84</i>
	<i>Maturation, disparition de la couche hydratée .....</i>	<i>85</i>
	<i>Dissolution/précipitation (recristallisation).....</i>	<i>85</i>
	<i>Diffusion chimique.....</i>	<i>86</i>
	<i>Mûrissement d'Ostwald.....</i>	<i>86</i>
	<i>Précipitation de minéraux secondaires .....</i>	<i>86</i>
3.4	Histologie .....	87
3.4.1	Dentine .....	87
3.4.2	Cément .....	87
3.4.3	Os compact.....	88
4	Indices diagénétiques utilisés dans les études de l'ADN ancien.....	88
4.1	Indices de conservation.....	88
	<i>Racémisation des acides aminés.....</i>	<i>89</i>
	<i>Contenu en collagène .....</i>	<i>89</i>
	<i>Autres protéines .....</i>	<i>90</i>
	<i>Autres molécules organiques.....</i>	<i>90</i>

<i>Eléments traces</i> .....	91
4.2 Indices de contamination .....	91
5 Caractérisation physico-chimique de spécimens anciens.....	91
6 Complément : quantification indirecte des carbonates par FTIR.....	92
<b>CHAPITRE II. PROBLEMATIQUES LIEES A L'ADN ET A L'ADN ANCIEN.....</b>	<b>95</b>
<b>A Propriétés physico-chimiques de l'ADN.....</b>	<b>97</b>
1 Généralités.....	97
2 Facteurs de stabilité de la molécule d'ADN double-brin.....	99
2.1 Stabilité intrinsèque .....	99
2.1.1 Squelette sucre-phosphate.....	99
2.1.2 Bases azotées.....	100
2.1.3 Histones et autres protéines.....	101
2.2 Stabilité et réactivité de l'ADN en solution aqueuse .....	102
2.2.1 Propriétés acido-basiques.....	102
2.2.2 Solubilité .....	103
3 Biopolymère anionique .....	104
3.1 Notions générales de conformation appliquées à un polymère neutre.....	104
3.2 Conformation d'un polyélectrolyte.....	105
3.3 Viscosité.....	108
4 Remarques conclusives .....	109
<b>B Dégradation et modifications chimiques taphonomiques de l'ADN.....</b>	<b>111</b>
1 Dégradation enzymatique de l'ADN.....	111
1.1 Action précoce des nucléases endogènes (autolyse).....	111
1.2 Dégradation liée à l'activité de (micro)-organismes (putréfaction).....	115
1.2.1 Insectes.....	116
1.2.2 Microorganismes.....	116
2 Dégradation non-enzymatique de l'ADN .....	117
2.1 Hydrolyse de l'ADN .....	117
2.1.1 Hydrolyse de la liaison N-glycosidique .....	117
2.1.2 Désamination hydrolytique .....	119
2.2 Oxydation de l'ADN.....	119
2.3 Action directe des rayonnements ionisants et non-ionisants .....	120
2.4 Crosslinks.....	121
3 Remarques conclusives .....	121
<b>C Introduction aux méthodes d'étude de l'ADN ancien.....</b>	<b>123</b>
1 Prétraitements de l'échantillon.....	123
1.1 Recueil des échantillons.....	123
1.2 Décontamination des échantillons et réduction en poudre .....	124
2 Extraction de l'ADN ancien.....	125
2.1 Broyage .....	126
2.2 Solubilisation (tampon d'extraction) .....	127
2.2.1 EDTA.....	127

<i>Tampon sans agent chélatant</i> .....	128
<i>Déminéralisation partielle ou totale</i> .....	128
2.2.2 Protéolyse.....	130
2.2.3 Additifs.....	130
3 Purification .....	132
3.1 Extraction liquide-liquide au phénol-chloroforme.....	132
3.2 Extraction sur support solide .....	133
3.2.1 Formulation de la silice.....	135
<i>Poudre en suspension ou « lait de silice » (glass milk)</i> .....	135
<i>Gel de silice (silica-gel)</i> .....	136
<i>Fibres</i> .....	136
3.2.2 Agents chaotropiques .....	137
<i>Agent dénaturant</i> .....	137
<i>Agent déshydratant</i> .....	137
3.3 Identification de la nature et de la fonction d'un kit d'extraction par la caractérisation physico-chimique de ses composants .....	139
3.3.1 Observations microscopiques .....	141
<i>Filtre</i> .....	141
<i>Membrane</i> .....	142
<i>Solutions tampons</i> .....	142
3.3.2 Analyses chimiques.....	143
<i>Filtre</i> .....	143
<i>Membrane</i> .....	144
<i>Solutions</i> .....	146
4 Amplification et typage.....	148
4.1 Principes de l'amplification par PCR .....	148
4.2 Limites de la PCR .....	150
4.2.1 Contamination.....	150
4.2.2 Inhibiteurs .....	151
4.3 Séquençage .....	151
4.4 Analyse des marqueurs moléculaires.....	152

### CHAPITRE III. ETUDE EXPERIMENTALE DE L'INTERACTION ENTRE ADN ET APATITES

#### BIOMIMETIQUES..... 155

#### A Données générales et bibliographiques sur l'adsorption et la désorption..... 158

1 Généralités.....	158
1.1 Généralités sur les cinétiques de l'adsorption.....	160
1.1.1 Equations simples .....	161
1.1.2 Equations complexes.....	162
<i>Modèle de Ritchie</i> .....	162
<i>Modèle d'Elovich</i> .....	162
<i>Modèle double-exponentiel</i> .....	164
1.2 Isotherme d'adsorption .....	164

1.2.1	Protocole expérimental .....	165
1.2.2	Allures de l'isotherme .....	165
1.2.3	Modèle de Langmuir .....	166
1.2.4	Modèle de Freundlich .....	167
1.2.5	Modèle de Temkin .....	168
1.3	Désorption .....	169
1.3.1	Système gaz-solide .....	169
1.3.2	Système solide-liquide .....	171
2	Adsorption et désorption impliquant des matériaux apatitiques .....	171
2.1	Sites d'adsorption .....	172
2.2	Mécanismes d'adsorption .....	174
2.2.1	Hydroxyapatite .....	175
2.2.2	Apatite nanocristalline .....	175
2.3	Cinétiques d'adsorption .....	177
2.4	Réversibilité du processus .....	177
<b>B</b>	<b>ADN modèle utilisé pour l'adsorption .....</b>	<b>179</b>
1	Comportement de l'ADN lors de l'adsorption .....	179
1.1	Généralités .....	179
1.2	Revue bibliographique des phénomènes d'adsorption d'ADN .....	180
2	Caractérisation et quantification de l'ADN .....	182
2.1	Concentration de la solution commerciale d'ADN .....	183
2.2	Quantification .....	184
2.3	Taille des fragments .....	185
3	Protocoles de dégradation de l'ADN .....	186
3.1	Approches « <i>bottom-up</i> » .....	186
3.1.1	Synthèse de fragments par PCR .....	186
3.1.2	Clonage d'ADN recombinant .....	186
3.2	Approche « <i>top-down</i> » .....	187
3.2.1	Techniques enzymatiques .....	187
3.2.2	Techniques mécaniques .....	188
<b>C</b>	<b>Protocoles d'adsorption entre ADN et apatite biomimétique .....</b>	<b>190</b>
1	Historique du protocole .....	190
1.1	Influence de l'agitation .....	190
<i>Essais préliminaires</i> .....	<i>190</i>	
<i>Développement du protocole final</i> .....	<i>191</i>	
1.2	Influence du rapport solide/liquide .....	192
2	Etude expérimentale de l'adsorption d'ADN de thymus de veau partiellement fragmenté sur des nanocristaux d'apatite nanocristalline, utilisée comme modèle du minéral osseux et dentinaire .....	193
3	Expériences additionnelles .....	198
3.1	Essai de désorption en milieu acide .....	198
1.1	Eléments de caractérisation du solide .....	199
3.1.1	Réponse infrarouge de l'ADN .....	199

3.1.2	Maturation différentielle en présence d'ADN .....	200
3.2	Données complémentaires relatives à l'effet de cations divalents sur l'adsorption.....	201
<b>D</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>204</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>206</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>		<b>210</b>
<b>ANNEXES.....</b>		<b>237</b>
<b>A</b>	<b>Analyses physico-chimiques .....</b>	<b>238</b>
1	Diffraction des rayons X sur poudre .....	238
2	Analyses chimiques.....	239
2.1	Préparation de la solution mère pour le dosage du calcium et des ions phosphate	239
2.1.1	Echantillons synthétiques.....	239
2.1.2	Echantillons osseux ou dentaires (estimation de la quantité de matière organique)	239
2.2	Dosage du calcium.....	239
2.2.1	Volumétrie en retour .....	239
2.2.2	Absorption atomique.....	240
2.3	Dosage des ions phosphate .....	240
2.3.1	Dosage du solide .....	240
2.3.2	Dosage des surnageants .....	240
2.4	Dosage des carbonates .....	241
3	Analyses spectroscopiques infrarouge et post-traitements de données IR.....	242
3.1	Apodisation de Happ-Genzel du domaine spectral $\nu_3\nu_1$ ( $\text{PO}_4$ ).....	242
3.2	Décomposition spectrale du domaine $\nu_4(\text{PO}_4)$ ( <i>curve-fitting</i> ) .....	242
4	Mesure de surface spécifique .....	243
5	Microscopie électronique à balayage (MEB) équipé d'une sonde EDX ( <i>Energy Dispersive X-ray spectrometry</i> ) .....	244
6	Spectroscopie Raman .....	244
<b>B</b>	<b>Figures annexes (kit d'extraction d'ADN ancien) .....</b>	<b>245</b>
<b>C</b>	<b>Rapport de l'isotherme BET de l'hacS4.....</b>	<b>250</b>

## LISTE DES FIGURES

---

- Figure G-1 Interdépendance des problématiques liées à l'étude de l'ADN ancien (ADNa).... 20
- Figure G-2 Représentation simplifiée d'une hypothèse d'évolution post mortem possible des brins d'ADN (nucléaire) libérés en solution suite à la mort de l'organisme et à la lyse des cellules osseuse..... 22
- Figure I-1 Structure cristallographique de la maille d'hydroxyapatite représentée en projection selon le plan (001). Les cercles représentent les tunnels (pointillés fins : tunnel parallèle à l'axe ternaire, contenant les ions colonnaires  $\text{Ca}^{2+}$  I ; pointillés larges : tunnel parallèle à l'axe sénaire, bordés par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  II)..... 29
- Figure I-2 Représentation schématique des modifications cristallines liées au phénomène de maturation. Les ions labiles en surface sont progressivement incorporés dans la structure apatitique aux dépens de la couche hydratée. Certaines espèces chimiques seront préférentiellement incorporées dans le domaine apatitique, d'autres sont plus facilement échangeables au niveau de la couche hydratée..... 37
- Figure I-3 Cliché en MET d'os cortical bovin d'après Li et Aparicio, 2013. (A) et (B) Section d'os longitudinale mettant en évidence des cristallites individualisés (traits noirs), agencés en paire de faisceaux (longueur 20-190 nm, épaisseur 2-4 nm, espace entre deux faisceaux ~2,5 nm). (C) et (D) Os bovin broyé montrant des fragments de cristallites (largeur 5,7 - 10 nm)..... 41
- Figure I-4 Modélisations possibles de l'organisation du collagène osseux. (a) Modèle classique proposant l'alignement d'une extrémité à l'autre des molécules de collagène et la nucléation des cristaux d'apatite dans les *gap*. (b) La minéralisation finale prend place dans les espaces intermoléculaires et à la surface des fibrilles. (c) La mise à jour du modèle suite aux analyses Synchrotron décrit une torsion en hélice droite des molécules de collagène associées. (d) Faute d'espace suffisant entre les molécules de collagène, ce modèle estime un agencement des cristallites d'apatite au niveau des *gap*. D'après Alexander *et al.*, 2012 ..... 42
- Figure I-5 Représentation schématique d'une section transversale et longitudinale d'os long. Les ostéons, unité élémentaire de l'os compact, sont centrés sur des canaux de Havers, contenant le paquet vasculo-nerveux (veine en bleu, artère en rouge et nerf en jaune). Les canaux de Volkmann connectent les canaux de Havers entre eux dans un plan transversal. Entre les lamelles d'un ostéon, les ostéocytes, logés dans des lacunes ostéocytaires, envoient des prolongements interconnectés. En périphérie, le périoste est un tissu conjonctif dense recouvrant l'os. L'os trabéculaire, ou spongieux, apparaît au centre, sous la forme d'un réseau de trabécules osseuses contenant notamment le tissu hématopoïétique (moelle) (Servier Medical Art - *Creative Commons*)..... 43
- Figure I-6 Les unités de remodelage (BMU, *basic multicellular unit*) se situent sous la bordure (*canopy*) des cellules bordant les cavités (os trabéculaire dans l'encadré du haut,

canaux de Havers dans l'encadré du bas). Les ostéoclastes (OC) et ostéoblastes dérivent de souches (respectivement hématopoïétiques HSC, mésenchymateuses MSC) en provenance du sang et de la moelle. Les cellules bordantes peuvent également se différencier en ostéoblastes. Lymphocytes T et macrophages accèdent à la BMU par la vascularisation. D'après Sims et Martin, 2014.....	44
Figure I-7 Schéma en coupe d'une dent monoradiculée au sein de son alvéole.....	47
Figure I-8 Cliché TEM, agrandissement x20 000 d'une section longitudinale d'un tubule dentinaire au niveau du tiers interne (pulpaire) de la dentine radulaire. Le prolongement odontoblastique, noté O, présente de nombreux microfilaments orientés selon l'axe du prolongement. Une petite mitochondrie est également visible. L'espace P représente l'espace périodontoblastique. D'après Frank et Steuer, 1988 .....	48
Figure I-9 Cliché HRTEM de cristallites individualisés d'apatite nanocristalline dentinaire. Orientation de l'axe <i>c</i> (A) perpendiculaire et (B) parallèle, au plan d'observation. (A) Section hexagonale d'une cristallite, faisant apparaître un alignement de 10-12 plan cristallins, espacés de 0,82 nm, dans l'épaisseur de la cristallite. En périphérie, la zone diffuse, sans motif cristallin, est attribuée à la couche hydratée. (B) Les cristallites peuvent atteindre plus de 80 nm de longueur selon l'axe <i>c</i> , pour une épaisseur de 10 à 15 nm (A). D'après (Sanchez-Navas <i>et al.</i> , 2013) .....	49
Figure I-10 Représentation schématique de la synthèse d'apatite nanocristalline biomimétique (Equipe PPB, CIRIMAT) .....	57
Figure I-11 Résumé des techniques de caractérisation du minéral osseux/dentaire et de leurs analogues utilisées au cours de ce travail (en gris), et des techniques présentées en perspectives (en blanc). Les techniques où figure un astérisque sont susceptibles d'être utilisées en microscopie, pour recueillir des indications topographiques (cartographie IR, cartographie Raman).....	59
Figure I-12 Diagrammes de diffraction aux rayons X d'un os compact humain (vert) et des apatites nanocristallines de synthèse biomimétiques maturées 1 semaine : apatite carbonatée (hac S4, rouge) ; apatite non carbonatée synthétisée (hap S3, bleue) (anticathode au cobalt) (JCPDS, 9-432).....	60
Figure I-13 Diffractogramme d'une hydroxyapatite stœchiométrique de synthèse calcinée (anticathode au cuivre) (JCPDS, 9-432).....	60
Figure I-14 Spectre infrarouge et indication des principaux groupements. Os compact humain (vert), apatite nanocristalline carbonatée hac S4 (rouge) et hydroxyapatite stœchiométrique (noir) .....	64
Figure I-15 Zoom sur les principaux domaines des phosphates et des carbonates et mise en évidence de groupements apatitiques et labiles après traitement du spectre de l'apatite hacS4 (rouge) et d'un os compact humain (vert) par apodisation de Happ-Genzel.....	66
Figure I-16 Décomposition spectrale de la bande $\nu_4(\text{PO}_4)$ du spectre FTIR de l'apatite hac S4. Ligne grise épaisse : résultat global du <i>curve-fitting</i> . Ligne noire fine : données FTIR. ....	67

Figure I-17 Modèle d'histoire taphonomique indiquant les relations aux sous-disciplines de la taphonomie (selon Behrensmeyer et Kidwell, 1985) .....	70
Figure I-18 Traceurs isotopiques analysés d'après des échantillons squelettiques ayant une utilité en paléontologie, modifié d'après Benazzi <i>et al.</i> , 2011 et Tütken et Vennemann, 2011 .....	73
Figure I-19 – Gauche (a, b) : sections transversales annotées d'un os long moderne (Fernandez-Jalvo <i>et al.</i> , 2010) – Droite : Os médiévaux, (c) dégradés par des micro-organismes et (d) bien préservés. Dans l'insert, des motifs framboïdes liés à la précipitation de minéraux secondaires révèlent la présence de bactéries sulfato-réductrices, dans un environnement d'enfouissement anoxique (Turner-Walker et Jans, 2008).....	76
Figure I-20 Exemples de conservation exceptionnelle liée au froid : à gauche, mammouth laineux (40 000 BP) ; à droite, couteau en silex de Ötzi (4500 BP) avec son fourreau en teille (écorce de tilleul) .....	78
Figure I-21 Clichés MEB de dentine et email archéologiques – a, b : dent fossile (bovine) en imagerie des électrons rétrodiffusés. L'altération de la dentine est en relation avec la précipitation de minéraux secondaires à l'intérieur des microtubules (Kohn <i>et al.</i> , 1999) – c : incisive de rongeur fossile avec conservation de la structure prismatique et décussée de l'email après traitement à l'acide formique 5%, 2 min (Dauphin et Williams, 2004).....	81
Figure II-1 Modélisations possibles de l'ADN selon l'angle d'observation : séquence de paires de bases, succession de sites de liaison de facteurs de transcription, polymère chargé, polymère élastique, polymère agencé selon une marche aléatoire de segments rigides (« <i>nunchuk</i> »), d'après Phillips <i>et al.</i> , 2012 .....	96
Figure II-2 Guanidine mono-phosphate terminale impliquée dans une liaison phosphodiester. L'extrémité phosphate libre possèdent deux sites d'ionisation, aux valeurs de pKa respectivement de 1,5 et 6,5 .....	98
Figure II-3 Structure moléculaire d'une région d'ADN double-brin illustrant l'agencement des nucléotides formés par une base azotée (en couleur), un sucre à 5 carbones (en gris), et un groupement phosphate (sphère marron). <i>A gauche</i> : le squelette sucre - phosphate de chaque brin de l'ADN (représenté par deux flèches grises) est agencé de manière antiparallèle (alignement des extrémités 3'OH et 5'OPO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ). <i>A droite</i> : deux liaisons hydrogènes relient les bases T et A, trois liaisons hydrogènes relient G à C. Les groupements phosphate exposent leur charge négative vers l'extérieur de la double hélice © 2013 Nature Education .....	99
Figure II-4 <i>En haut</i> . Représentation schématique de l'enroulement de l'ADN nucléaire autour du nucléosome (d'après Pedersen <i>et al.</i> , 2014). <i>En bas</i> . Effet d'une digestion DNAsique d'un fragment de chromatine au niveau des sites internucléosomiques (pointés par des flèches) © Creative Commons .....	101
Figure II-5 Formules chimiques développées des polyamines d'origine biologique et de la poly-L-ornithine.....	107

Figure II-6 Fragments d'ADN adsorbés sur une surface de mica visualisés par AFM (A) Fragments d'ADN double-brin de 538 pb en présence de 2 mM NaCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 2,5 mM NiCl <sub>2</sub> , 8 mM HEPES, pH 8 (Lysetska <i>et al.</i> , 2002) (B) Les molécules d'ADN de 896 pb sur une surface prétraitée à la poly-L-ornithine de 49 kDa sont plus compactes en présence de 100 µg/ml (B1) qu'en présence de 0,018 µg/ml de polyamine (B2) (Podesta <i>et al.</i> , 2005).....	108
Figure II-7 Représentation schématique des conséquences de la nature polyélectrolytique de l'ADN sur sa conformation et ses propriétés d'adsorption.....	110
Figure II-8 Types de dommages subis par l'ADN. Sites de dommage hydrolytiques (en rouge) : dépurination par rupture de la liaison β-osidique, fragmentation par clivage de la liaison phosphodiester favorisée au niveau des sites a-puriques. Sites préférentiels d'oxydation indiqués par une flèche bleue. Exemples de modifications chimiques des bases (désamination et oxydation). Crosslinks ADN-ADN ou ADN-protéine.....	118
Figure II-9 Formule chimique de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) sous sa forme acide.....	127
Figure II-10 Spectre infrarouge (2300-200 cm <sup>-1</sup> ) d'un résidu osseux après lyse (tampon d'extraction : EDTA 0,5M, DTT 1M, protéinase K 20 mg/mL) (trait plein), et de l'EDTA utilisé dans ce même protocole (trait pointillé) .....	129
Figure II-11 Effet d'un traitement physique (vide) sur l'enveloppe d'hydratation d'une particule sphérique de silice. La disparition du caractère multicouche de l'enveloppe est réversible en présence d'eau en excès. ....	138
Figure II-12 Modélisation possible de l'interaction du guanidinium formant un pont ionique entre les groupements phosphates négatifs des acides nucléiques et les groupements hydroxyles de la silice (silanol) (Xu <i>et al.</i> , 2011) .....	139
Figure II-13 Cliché MEB, après métallisation, du filtre de la colonne du kit, agrandissement x200 (à gauche) et x2000 (à droite).....	141
Figure II-14 Cliché MEB (LEO 435VP) de la membrane située sous le filtre de la colonne du kit commercial de purification de l'ADN.....	142
Figure II-15 Cliché MEB (LEO 435VP) des solutions d'accrochage lyophilisées (A) et de lavage (B) en agrandissement x20, issues du kit de purification de l'ADN.....	143
Figure II-16 Spectre EDS du filtre d'une colonne neuve du kit commercial de purification de l'ADN.....	143
Figure II-17 Formule développée du polyéthylène .....	145
Figure II-18 Formule développée du thiocyanate de guanidinium. L'ion thiocyanate existe sous forme de deux isomères.....	147
Figure II-19 Spectre EDS de la solution d'accrochage ( <i>binding</i> ).....	148
Figure II-20 Représentation schématique des deux types d'élongation, sens et anti-sens, sur deux molécules d'ADN double-brin. La synthèse du brin complémentaire à l'un et l'autre	

brin d'un fragment d'ADN bicaténaire permet une amplification théorique d'une séquence de $2^n$ ( $n$ , nombre de cycles), modifiée d'après Richard Wheeler ( <a href="http://www.calculatedimages.blogspot.fr/">http://www.calculatedimages.blogspot.fr/</a> ) .....	149
Figure III-1 Représentation schématique du processus de sorption <sup>1</sup> (adsorption « simple » ou échange ionique) à l'interface solide-liquide .....	158
Figure III-2 Classification des isothermes selon leur forme générale, d'après (Sumner, 1999) .....	166
Figure III-3 Représentation schématique de la classification IUPAC des hystérèses de sorption avec $\theta_v$ , taux de recouvrement et $p/p^0$ , pression relative du gaz .....	170
Figure III-4 Modélisation simplifiée de l'hypothèse d'Okasaki <i>et al.</i> qui explique l'affinité des acides nucléiques (DNA) pour les cristaux d'apatite (HAp) (Okasaki <i>et al.</i> , 2001).....	173
Figure III-5 Représentation schématique de la couche hydratée et de son implication dans les phénomènes d'échanges ioniques et de maturation (Eichert <i>et al.</i> , 2007; Rey <i>et al.</i> , 2007) .....	174
Figure III-6 Exploration de l'isotherme d'adsorption de l'ADN de thymus de veau Invitrogen® sur l'apatite non carbonatée maturée 1 semaine hapS0, et modélisation selon l'équation de Freundlich.....	184
Figure III-7 Courbe d'étalonnage du NanoDrop <sup>TM</sup> 2000c à partir de solutions standards d'ADN Trevigen®.....	185
Figure III-8 Répartition de la taille des fragments d'ADN sur gel agarose 1%. A gauche, ADN Invitrogen®. Au milieu, ADN Trevigen®. A droite, 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas®).....	185
Figure III-9 Electrophorèse sur gel d'agarose 1,2% de 6 solutions d'ADN Worthington® concentrées à 50 ng/ $\mu$ L après fragmentation de l'ADN par sonification (Diagenode® Bioruptor). Les échantillons 2, 4, 5 et 6 ont été déposés 2 fois (20 puis 15 $\mu$ L) ; C, contrôle (non soniqué) ; L, 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas®) .....	189
Figure III-10 Influence de l'agitation magnétique à $T_{amb}$ sur l'adsorption d'ADN en présence de 5, 10 ou 20 mg d'apatite nanocristalline non carbonatée (hapS0) maturée 1 semaine, dans un volume 5 mL de solution d'ADN (Invitrogen®) concentrée ~90 mg/mL.....	191
Figure III-11 Influence du rapport solide/solution à $T_{amb}$ avec agitation magnétique constante ou horizontalisation des tubes pour 5, 10 ou 20 mg d'apatite carbonatée maturée 1 semaine (hacS4) et une solution d'ADN commercial Trevigen® concentrée à ~80 $\mu$ g/mL (temps de mise en contact = 3 jours).....	192
Figure III-12 Influence du type d'agitation sur la quantité d'ADN adsorbé à $T_{amb}$ sur 10 mg d'apatite carbonatée hac S4 ( $[ADN]_{initiale} \sim 170 \mu\text{g/mL}$ , $V_{solution} = 7,5 \text{ mL}$ ) (temps de mise en contact = 3 jours) .....	192
Figure III-13 Scénarios possibles d'adsorption entre l'ADN et la surface de l'apatite (se référer au texte pour les détails) .....	195

Figure III-14 Isothermes d'adsorption et de « désorption » à $T_{amb}$ (ADN Trevigen ®, hac S4), par dilution par 5 en présence d'une solution de phosphate ( $[P]=20$ mM, pH5,5) pour trois points de l'isotherme SF1, SF2 et SF3 (normal : adsorption ; <i>italique</i> , désorption).....	198
Figure III-15 Corrélation entre la quantité d'ADN adsorbé $N_{ads}$ et le ratio des aires sous la courbe de la bande à $1225\text{ cm}^{-1}$ ( $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ de l'ADN) et de la $\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$ pour les trois points de l'isotherme de désorption <i>SF1</i> , <i>SF2</i> et <i>SF3</i> (cf. Figure III-14).....	200
Figure III-16 Données FTIR dans le domaine $3800 - 2800\text{ cm}^{-1}$ mettant en évidence la vibration symétrique des ions $\text{OH}^-$ apatitique ( $3572\text{ cm}^{-1}$ ).....	201
Figure III-17 Données FTIR dans le domaine $800-400\text{ cm}^{-1}$ avec indication de la vibration de libration des ions $\text{OH}^-$ apatitique à $631\text{ cm}^{-1}$ .....	201
Figure III-18 Adsorption à $T_{amb}$ d'ADN sur hacS4 en présence de KCl 0,1M (carrés cyans), NaCl 0,1M (triangles verts) et $\text{BaCl}_2$ 0,1M (losanges rouges) .....	202
Figure B-1 Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration en phosphore, en présence (losanges rouges) ou en absence (carrés bleus) d'ADN. Les étalons contenant de l'ADN ont été préparés par clarification préalable des solutions par centrifugation, pour éviter l'interférence de l'ADN dans la lecture de la D.O .....	241

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau I-1 Exemples de cations bivalents et de leurs rayons ioniques, en coordination VI, pouvant s'insérer dans la structure apatitique, d'après Shannon et Prewitt, 1969.....	30
Tableau I-2 Composition chimique et paramètres de réseau cristallin de l'apatite des différents tissus minéralisés chez l'Homme, d'après Iyengar et Tandon, 1999.....	35
Tableau I-3 Types, localisation et fonction des différentes cellules du tissu osseux.....	44
Tableau I-4 Structure, composition et propriétés des principaux types de dentine, d'après Goldberg, 2008; Kinney <i>et al.</i> , 2001; Weiner <i>et al.</i> , 1999.....	49
Tableau I-5 Caractéristiques physico-chimiques comparatives du minéral amélaire et de l'hydroxyapatite stœchiométrique, d'après McDowell <i>et al.</i> , 1977; Simmer et Fincham, 1995.....	52
Tableau I-6 Dimensions apparentes (selon équation de Scherrer) des cristallites d'apatites utilisées dans cette étude, en comparaison aux dimensions d'une apatite biologique (os compact, fémur, homme 57 ans).....	61
Tableau I-7 Composition chimique globale des échantillons d'apatites synthétiques utilisées dans cette étude, comparée à un échantillon d'apatite biologique extrait d'un os compact humain (homme, 57 ans).....	62
Tableau I-8 Position, intensité relative et attributions des bandes IR dans le domaine 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ pour des composés apatitiques naturels (apatite et matière organique) et synthétiques (apatite seule).....	64
Tableau I-9 Attribution et position des bandes de vibration infrarouge dans le domaine 800-400 $\text{cm}^{-1}$ .....	67
Tableau I-10 Surfaces spécifiques des apatites synthétiques.....	68
Tableau II-1 Caractéristiques spatiales idéales des différentes conformations de la double hélice d'ADN d'après S. Mainlt Arnott S. dans S. Neidle (Ed.), <i>Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure</i> , p.35, Oxford University Press, 1999.....	98
Tableau II-2 Activités endonucléasiques impliquées dans la mort cellulaire selon Alaeddini <i>et al.</i> , 2010.....	114
Tableau II-3 Exemples d'études de l'ADN ancien employant des méthodes pour décontaminer la surface d'un spécimen osseux avant réduction en poudre (etOH : éthanol).....	124
Tableau II-4 Exemples de composition du tampon d'extraction utilisés dans des études de l'ADN ancien à partir d'os ou de dents réduits en poudre.....	131

Tableau II-5 Caractéristiques de trois technologies de purification des acides nucléiques sur support solide (Résine anionique, membrane de silice et particules magnétiques), modifiées d'après Qiagen® ( <a href="http://www.qiagen.com/">http://www.qiagen.com/</a> ) .....	134
Tableau II-6 Etudes mettant en œuvre un protocole de purification d'acides nucléiques à base de silice : formulation, spécificités de l'étude et nature du sel chaotrope employé (Gimat <i>et al.</i> , 2012).....	134
Tableau II-7 Etapes du protocole de préparation (préparation destructrice ou plus conservatrice), d'extraction et de purification d'ADN ancien à partir de spécimens dentaires ou osseux, pratiqué au laboratoire AMIS (CNRS UMR 5288).....	140
Tableau II-8 Attributions des bandes après analyse de la membrane en spectroscopies vibrationnelles. Les différentes liaisons impliquant le carbone sont caractéristiques du polyéthylène.....	145
Tableau II-9 Caractéristiques physico-chimiques des trois tampons du kit commercial de purification de l'ADN, en fonction des moyens techniques mis en œuvre .....	146
Tableau II-10 Précautions liées à la sélection, la manipulation et l'authentification de séquences d'ADN ancien, modifié d'après Orlando et Hänni (2000) .....	150
Tableau III-1 Résumé des modèles cinétiques (équations intégrées) testés sur les données expérimentales de l'adsorption d'ADN sur apatite nanocristalline carbonatée .....	164
Tableau III-2 Résumé des modèles d'isothermes que nous avons testés pour décrire l'adsorption de l'ADN sur apatite nanocristalline carbonatée (dont formes linéarisées) ...	169
Tableau III-3 Synthèse de quelques études d'adsorption impliquant l'ADN et des matériaux inorganiques naturels (sols) .....	180
Tableau III-4 Descriptif technique des solutions d'ADN commerciales citées, selon les fabricants .....	183
Tableau III-5 Effet de la nature des cations mono- ou divalents sur la quantité d'ADN adsorbée par unité de masse d'apatite (exprimée en mg ADN/ g hac ) après désorption, par comparaison avec les valeurs théoriques d'ADN après dilution par 5 de la concentration à l'équilibre (avant désorption potentielle) .....	203

# INTRODUCTION GENERALE

## 1 Contexte de l'étude

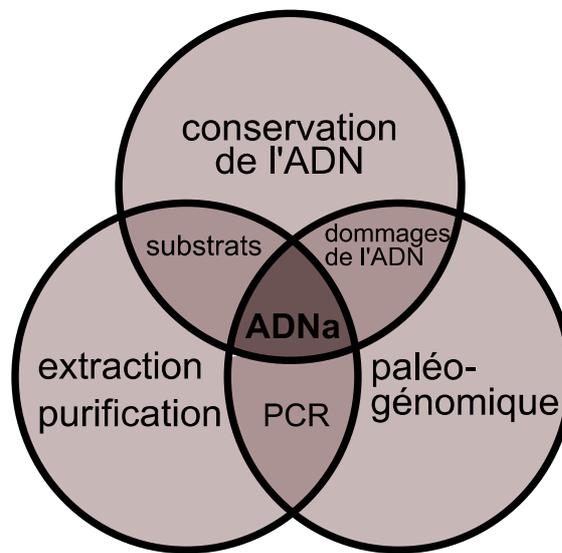
L'étude de l'ADN ancien s'inscrit dans la démarche méthodologique de l'Anthropologie biologique<sup>[1]</sup>. Afin d'étudier les populations passées et présentes, celle-ci vise au développement et à l'étude comparative de marqueurs basés sur des aspects biologiques, plutôt que socio-culturels, pour étudier les populations passées et présentes. La possibilité nouvelle de comparaison d'anciennes séquences d'ADN entre elles, ou avec des séquences modernes, a de nombreuses répercussions transversales. En médecine légale, il s'agira d'identifier les individus, en s'aidant le cas échéant des séquences d'ADN pouvant être apparentées, extraites à partir de membres potentiels de leur famille, voire de leur lignée. Cette performance a donné lieu à des applications des études d'ADN ancien dans le champ de l'Histoire. Ainsi, les restes du Tsar Nicolas II, de la Tsarine Alexandra et de leurs enfants, exécutés en 1918, ont pu être identifiés<sup>[2]</sup>. Plus récemment, l'ADN extrait de restes squelettiques d'une tombe découverte sous un parking de Leicester est en cours d'étude<sup>[3]</sup> : il pourrait s'agir du défunt Richard III (1452-1485), décrit comme un roi sanguinaire dans la pièce de William Shakespeare du même nom<sup>[4]</sup>.

Les nouvelles perspectives de recherche offertes par l'ADN ancien, depuis le milieu des années 1980, s'appliquent plus largement à l'étude de populations. Seul l'ADN ancien permet d'estimer comparativement la divergence génétique qui existe entre une population et ses ascendants. Ceci explique la richesse des conclusions qui ont été tirées de l'étude de quelques molécules, extraites à partir d'un petit nombre de spécimens. Ces renseignements précieux permettent en effet de mieux comprendre l'évolution des génomes (eucaryotes, mais aussi procaryotes) et la dynamique migratoire des populations humaines.

L'étude de l'ADN ancien n'est donc pas l'apanage des Hominidés : elle s'étend à l'ensemble du règne animal ou végétal, pour peu qu'une bonne conservation de ces vestiges ait empêché la dégradation totale de l'ADN qu'il contenait. Ainsi, les premières études d'ADN ancien ont été réalisées à partir de tissus mous d'un spécimen taxidermisé d'*Equus Quagga Quagga*<sup>[5]</sup> - espèce qui n'a pas survécu à la colonisation hollandaise en Afrique

australe au 19<sup>ème</sup> siècle - pour finalement se pencher, presque conjointement, sur ceux d'une momie égyptienne de 2 500 ans<sup>[6]</sup>. Par la suite, les paléogénéticiens spécialisés dans l'étude des Vertébrés se sont détournés des tissus ayant subi des traitements conservateurs pour s'intéresser aux vestiges les plus représentés dans les sédiments, c'est-à-dire les os et les dents, en s'apercevant que ceux-ci leur fournissaient en fait un ADN de meilleure qualité, et surtout sur des périodes de temps plus anciennes.

Trois problématiques, hiérarchisées sur la Figure G-1, ont pu se dégager au cours du développement des études d'ADN ancien d'origine squelettique.



**Figure G-1 Interdépendance des problématiques liées à l'étude de l'ADN ancien (ADNa)**

Considérant l'état de fragmentation de l'ADN ancien, la collecte et l'analyse de ces molécules s'appuient historiquement sur la mise au point de nouvelles techniques de biologie moléculaire (biotechnologies), et sur la caractérisation de marqueurs courts de l'ADN, qui présente un polymorphisme, sans être soumis à une pression sélective<sup>1</sup>.

Au préalable, l'étape d'extraction de l'ADN à partir de son substrat ancien se développe dans un compromis constant entre une bonne solubilisation des molécules d'ADN à partir des tissus minéralisés et la protection de ces molécules vis-à-vis de traitements trop invasifs qui risquent de les endommager. Cette solubilisation est un prérequis nécessaire pour la mise en œuvre des biotechnologies qui permettent l'analyse des séquences. Par la suite, la purification

---

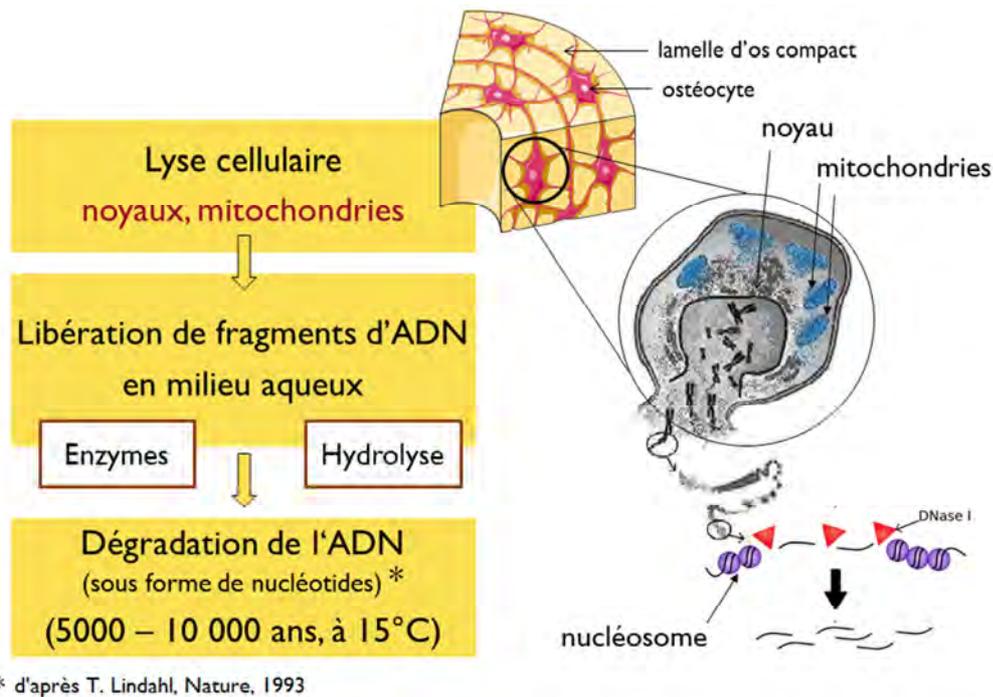
<sup>1</sup> La sélection naturelle décrit, au sein de la théorie darwinienne de l'évolution des êtres vivants, la sélection qui s'opère entre les différents génotypes en fonction de la survie et du succès reproducteur des individus.

de l'ADN doit permettre la collecte d'un maximum de fragments, tout en évitant de copurifier des substances indésirables, qui peuvent inhiber les réactions enzymatiques en aval.

L'amplification de fragments d'ADN, par une réaction enzymatique de polymérisation en chaîne (ou PCR pour *Polymerase Chain Reaction*), est la révolution technique qui a permis de synthétiser *in vitro* de multiples copies d'un fragment-cible de l'ADN afin d'en obtenir une quantité suffisante à son analyse. Mais la dégradation *post mortem* de l'ADN en fragments très courts, et les modifications chimiques des bases, sont parfois à l'origine d'artefacts de l'amplification, qui gênent la lecture de la séquence originelle de l'ADN.

En amont de tout cela, c'est le potentiel exceptionnel de conservation de l'ADN qui détermine son étude à partir de spécimens anciens. Ce potentiel dépend simultanément de la stabilité intrinsèque de l'ADN et de son substrat, et donc très vraisemblablement des interactions ADN-substrat. Le soulèvement de cette problématique par les paléogénéticiens est le point de départ de cette étude. Si l'hypothèse d'une adsorption de l'ADN à l'apatite présente dans les tissus durs a été formulée suite aux premières extractions d'ADN ancien d'origine squelettique<sup>[7]</sup>, la localisation de l'ADN ancien dans les restes squelettiques continue d'être discutée<sup>[8,9]</sup>, faute d'éléments concrets permettant de conclure sur l'environnement dit « diagénétique » de l'ADN ancien.

Sur la base des travaux de Tomas Lindahl<sup>[7]</sup>, la persistance à long terme de l'ADN ancien dans les restes squelettiques n'a pu être envisagée qu'en tant que conséquence d'une conjoncture exceptionnelle. La possibilité d'extraction de fragments d'une centaine de paires de bases (pb), sur une période qui s'étend jusqu'à plus de 500 000 ans, est incompatible avec les vitesses de dégradation de l'ADN en solution, évaluées *in vitro* par Lindahl. D'après son estimation du taux de dépurination de l'ADN complètement hydraté en solution, il prédit la dégradation totale d'un fragment de 800 bp à 15°C en 5000 à 10 000 ans (Figure G-2). La protection particulière dont bénéficie l'ADN ancien d'origine osseuse et dentaire a donc été évoquée sous la forme d'une adsorption des fragments d'ADN à l'apatite qui compose la fraction minérale des tissus durs. Cette hypothèse, formulée au début des années 1990, n'a toutefois jamais été validée (ou invalidée) en s'appuyant sur des éléments physico-chimiques expérimentaux et ce, en dépit des progrès impressionnants réalisés dans la discipline de l'ADN ancien jusqu'à nos jours.



**Figure G-2 Représentation simplifiée d'une hypothèse d'évolution post mortem possible des brins d'ADN (nucléaire) libérés en solution suite à la mort de l'organisme et à la lyse des cellules osseuse**

L'étude du rôle de l'interaction entre ADN et apatite dans la conservation de l'ADN est complexe, tant au niveau des propriétés des matériaux étudiés, qu'au niveau des facteurs environnementaux, et des effets qu'ils peuvent avoir sur ces matériaux. Sans perdre de vue le rôle potentiellement crucial de l'apatite, il s'agit d'une part d'identifier quelles sont les interactions organo-minérales possibles au sein des tissus minéralisés, par des données concrètes qualitatives et quantitatives, ce qui ne saurait se faire sans déterminer par quels moyens nous allons les étudier. Il s'agit d'autre part de comprendre comment un système biologique peut conserver certaines de ses propriétés initiales, une fois intégré à un milieu géologique, et comment des variables de cet environnement vont pouvoir jouer en faveur ou en défaveur de cette conservation.

Par conséquent, ce travail de thèse, qui n'a pas de précédent à notre connaissance, se répercute sur de nombreux domaines scientifiques, dans une dynamique fortement exploratoire. L'analyse pluridisciplinaire des tenants et des aboutissants d'une étude des mécanismes de préservation de l'ADN ancien d'origine squelettique nous a permis de dégager trois objectifs principaux : (i) une meilleure compréhension des phénomènes dits « diagénétiques » qui sont à l'origine de la conservation ou de la dégradation de l'ADN des tissus squelettiques *post mortem*, une fois enfouis, (ii) l'exploration de méthodes d'extraction

de l'ADN ancien à partir de substrats anciens diagénétiques, et (iii) la mise en évidence et l'étude physico-chimique détaillée des interactions entre ADN et apatite.

## 2 Présentation du mémoire

D'un point de vue fondamental, une meilleure compréhension du rôle de la diagenèse des tissus squelettiques et de son impact sur la conservation de l'ADN ancien est la seule voie d'étude qui prenne en compte l'ensemble des variables simultanément. Cette étude fait l'objet du **chapitre I**, où nous décrivons notamment quels types de modifications peuvent subir l'apatite et les tissus dans lesquels elle se trouve. Une revue bibliographique décrit au préalable l'histologie des tissus osseux et dentaire, et surtout les propriétés physico-chimiques de leur fraction minérale apatitique. Une partie expérimentale est consacrée à la synthèse et à la caractérisation d'apatites dites « biomimétiques », seuls matériaux synthétiques à pouvoir nous éclairer sur certains aspects des propriétés physico-chimiques particulières du minéral osseux et dentaire, ce qui est difficile à évaluer *in situ*, notamment en raison de l'association intime des cristaux d'apatite avec le collagène. Une de ces apatites sert ainsi d'apatite modèle dans le troisième chapitre. Enfin, nous avons souhaité contribuer à l'étude de la diagenèse squelettique, par la caractérisation physico-chimique de spécimens osseux et dentaires recueillis dans divers contextes archéologiques et médico-légaux. Cette partie est présentée sous la forme de l'article scientifique récemment accepté par la revue *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, où nous présentons l'ensemble des conclusions tirées de cette caractérisation.

Dans le **chapitre II**, il est question d'élucider quelles sont les propriétés physico-chimiques de l'ADN qui sont susceptibles d'influer sur sa propre stabilité, sur les interactions qu'il peut former avec différents substrats et sur sa dégradation ; les principaux types de dommages subis par l'ADN seront détaillés. Concernant les méthodes d'analyse de l'ADN ancien, une attention toute particulière a été apportée à la compréhension de la phase d'extraction des molécules d'ADN ancien, ce qui pourrait nous renseigner sur le type d'interaction de l'ADN avec son substrat naturel. Dans ce but, nous avons également initié l'identification expérimentale des différents composants d'un kit d'extraction, afin d'élucider les mécanismes mis en jeu lors de l'étape de purification, basée sur l'interaction de l'ADN avec un substrat de nature différente, en l'occurrence silicique.

Le **chapitre III**, quant à lui, se consacre à l'étude de l'adsorption et de la désorption d'ADN, en prenant comme substrat une de nos apatites biomimétiques de synthèse, nanocristalline carbonatée et non stœchiométrique, qui présente des analogies importantes avec le minéral osseux et dentinaire. L'étude de l'adsorption d'ADN sur une apatite nanocristalline biomimétique n'a jamais encore été réalisée à notre connaissance. La description préalable des phénomènes d'adsorption généraux, ou impliquant l'un ou l'autre des composants, permet d'établir un référentiel de comparaison avec nos résultats expérimentaux. Ces derniers sont notamment reportés ici sous la forme de l'article rédigé par nos soins et publié dans la revue *Applied Surface Science*.

Les dernières pages de ce mémoire seront destinées à poser les jalons des futures études physico-chimiques, dans la poursuite logique de l'étude du rôle du minéral osseux dans la préservation de l'ADN ancien, à l'interface entre Science des Matériaux et Anthropologie moléculaire.

### **3 Références bibliographiques**

- [1] Crubézy, E., Braga, J. & Larrouy, G. *Anthropobiologie: évolution humaine*. (Elsevier Masson, 2008).
- [2] Coble, M. D. *et al.* Mystery Solved: The Identification of the Two Missing Romanov Children Using DNA Analysis. *PLoS ONE* **4**, e4838 (2009).
- [3] Doubts remain that the Leicester body is Richard III. *New Sci.* **217**, 6 (2013).
- [4] Shakespeare, W. *The Life and Death of King Richard the Third*. (1592).
- [5] Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O. A. & Wilson, A. C. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* **312**, 282–284 (1984).
- [6] Pääbo, S. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* **314**, 644–645 (1985).
- [7] Orlando, L. *et al.* Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature* **499**, 74–78 (2013).
- [8] Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709–715 (1993).
- [9] Sosa, C. *et al.* Association between ancient bone preservation and DNA yield: A multidisciplinary approach. *Am. J. Phys. Anthropol.* **151**, 102–109 (2013).
- [10] Campos, P. F. *et al.* DNA in ancient bone - Where is it located and how should we extract it? *Ann. Anat.-Anat. Anz.* **194**, 7–16 (2012).

## **Chapitre I. Substrats minéraux de l'ADN ancien et analogues synthétiques. Contribution à l'étude de la diagenèse osseuse**

---

### **A Données bibliographiques sur l'identification de tissus biologiques minéralisés en tant que substrats de l'ADN ancien**

- 1 Généralités
- 2 Le tissu osseux
- 3 L'organe dentaire

### **B Modèles synthétiques des minéralisations biologiques et biomimétisme**

- 1 Synthèse d'analogues biomimétiques
- 2 Caractérisation physico-chimique
- 3 Remarques conclusives

### **C Contribution à l'étude de la diagenèse squelettique**

- 1 Généralités
- 2 Acteurs de la diagenèse
- 3 Diagenèse des tissus squelettiques en tant que substrats d'ADN ancien
- 4 Indices diagénétiques utilisés dans les études de l'ADN ancien
- 5 Caractérisation physico-chimique de spécimens anciens

## **A DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR L'IDENTIFICATION DE TISSUS BIOLOGIQUES MINERALISES EN TANT QUE SUBSTRATS DE L'ADN ANCIEN**

### **1 Généralités**

#### **1.1 Notions de biominéralisation**

La minéralisation biologique est un processus commun qui s'applique à bon nombre d'espèces du règne animal en permettant l'association, à une trame organique, d'un dépôt minéral qui est contrôlé par des mécanismes cellulaires (de Ricqlès et Livage, 2004), et qui est également sous la dépendance de facteurs extrinsèques très variés, liés notamment à l'environnement (régime alimentaire, habitat, pollution) et aux contraintes mécaniques appliquées au tissu squelettique. La biominéralisation est caractérisée par une association organo-minérale intime, siégeant le plus souvent au sein de la matrice extracellulaire (de Ricqlès et Livage, 2004).

Les premières biominéralisations sont datées du Cambrien (~600 millions d'années), sous la forme d'organismes à coquille. Les principaux éléments mobilisés, à partir du milieu environnant, par les organismes vivants sont représentés par le carbone, l'oxygène, le silicium, le soufre, le phosphore, le calcium et le magnésium. Chez les Vertébrés, la minéralisation du squelette est réalisée, sauf rare exception, sous la forme d'apatite principalement phosphocalcique. Silicates (diatomite) et carbonates (ex. calcite, aragonite) sont également représentés parmi des plantes terrestres, éponges, algues et assez largement au sein des Invertébrés pour les carbonates, en raison de l'abondance du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) dans la biosphère (Sigel *et al.*, 2008). Les carbonates sont d'ailleurs présents en tant qu'éléments de substitution partielle des phosphates dans le squelette des Vertébrés (ex. Boskey, 2007).

Dans tous les cas, la précipitation des minéraux signe le passage des éléments d'un état dissous à un état solide (de Ricqlès et Livage, 2004), passage qui dépend des conditions micro-environnementales, ce qui a une double implication en termes de régulation :

- une régulation de nature physico-chimique : les conditions de pH, force ionique, potentiel d'oxydoréduction, ainsi que la présence d'autres ions (citrate, ions

métalliques : ex. strontium, magnésium) influencent le processus de minéralisation et/ou la composition des précipités formés,

- une régulation de nature biologique : de nombreuses protéines (collagène) et autres biopolymères de la matrice extracellulaire jouent un rôle dans la nucléation et la croissance cristalline du minéral (Boskey, 2007; Sigel *et al.*, 2008).

Chez l'Homme, à l'exception de l'émail dentaire et de calcifications ectopiques, les tissus minéralisés se forment par la minéralisation d'une matrice collagénique, selon une organisation microstructurale encore mal élucidée. L'agencement cellulaire et histologique, ainsi que les rapports anatomiques du tissu, constitueront les principales sources de variabilité d'un tissu à l'autre.

Un degré de complexité supplémentaire provient de la composition même des phosphates de calcium, dont le motif apatitique se révèle en réalité très accueillant, avec l'intervention simultanée de nombreux substituants ioniques (ex. Cazalbou, 2000; Legros, 1984). Enfin, compte tenu du processus de remodelage osseux qui prend place tout au long de la vie de l'individu, une même portion de minéral osseux est susceptible de contenir des cristaux apatitiques plus ou moins anciens, qui présenteront par conséquent des états de maturation divers.

Une fois les acteurs de la biominéralisation réunis, les cristaux précipitent dans les tissus biologiques, dans des conditions de pression, de température (de Ricqlès et Livage, 2004) et de présence d'ions minéraux qui peuvent être reproduites (bien que de manière simplifiée) en laboratoire. Cette simplicité relative a su être exploitée par les physico-chimistes pour la synthèse de phosphates de calcium apatitiques dits « biomimétiques » ou encore « analogues » aux minéraux biologiques considérés (Roveri et Iafisco, 2011; Vandecandelaere *et al.*, 2012). Toutefois, une caractérisation physico-chimique la plus exhaustive possible doit être réalisée afin de valider l'utilisation de ces composés de synthèse en tant que modèles ou « analogues » plus ou moins fidèles des biominéraux apatitiques (Drouet, 2013). Ces composés apatitiques dérivent de la structure et de la composition d'un composé défini stœchiométrique : l'hydroxyapatite phosphocalcique (notée HAp). Une description générale des apatites, et plus particulièrement de l'HAp, fait l'objet de la section suivante.

## 1.2 Définition et propriétés générales de l'hydroxyapatite stœchiométrique

Les composés à structure apatitique ont pour formule générale:



dans laquelle :

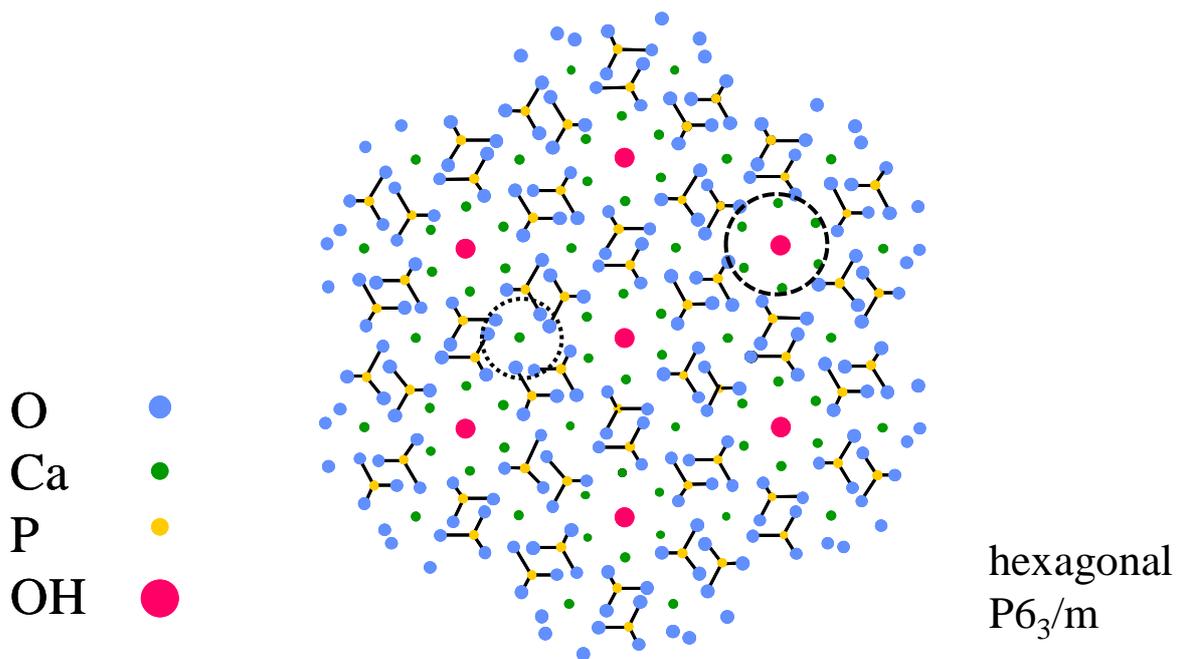
- Me représente un cation métallique bivalent, généralement l'ion calcium  $\text{Ca}^{2+}$ , mais aussi strontium  $\text{Sr}^{2+}$ , baryum  $\text{Ba}^{2+}$ , plomb  $\text{Pb}^{2+}$  ...
- $\text{XO}_4$  est un groupement anionique trivalent comme l'ion phosphate  $\text{PO}_4^{3-}$ , voire arséniate  $\text{AsO}_4^{3-}$ , vanadate  $\text{VO}_4^{3-}$  ...
- Y est un anion monovalent, comme l'ion hydroxyle  $\text{OH}^-$ , chlorure  $\text{Cl}^-$ , fluorure  $\text{F}^-$  ...

*Remarque* : Le cas de substitutions ioniques avec des ions qui présentent des valences différentes de +2, -3 et -1 sera traité dans la section suivante.

Les composés apatitiques ont cela de particulier qu'ils impliquent, comme d'autres oxydes complexes, de nombreux ions dans la maille cristalline, dont la mise en place et l'organisation sont susceptibles d'être chronophages. Ceci est particulièrement vrai dans le cas d'apatites biologiques, qui précipitent à température très modérée, et somme toute sur des échelles de temps courtes. Dans ces conditions, la précipitation du biominéral apatitique débute par le dépôt de composés métastables de faible cristallinité, qui évoluent progressivement vers des compositions plus proches de la stœchiométrie, plus stables et moins réactives d'un point de vue chimique. Cette évolution spontanée, souvent acceptée de manière relativement empirique, a récemment été étudiée sur une base thermodynamique expérimentale (dont le fondement est une étude calorimétrique) (Rollin-Martinet *et al.*, 2013). Pour des apatites phosphocalciques nanocristallines biomimétiques, cette étude a mis en évidence (et quantifié) l'existence d'une force directrice thermodynamique qui conduit systématiquement vers la stœchiométrie les apatites non-stœchiométriques qui présentent les mêmes caractéristiques que le minéral osseux jeune et que l'émail dentaire immature.

Au niveau des apatites naturelles, ces minéraux phosphatés évoluent donc spontanément vers leur forme la plus stable, en l'occurrence sous la forme d'une apatite phosphocalcique stœchiométrique. Les plus stables sont la fluoroapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3\text{F}_2$ , dans le règne minéral, voire animal (émail de requin), et l'émail dentaire chez l'Homme, sous une forme proche de l'hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_2$  (notée HAp, à ne pas confondre avec les notations hac ou hap qui dénoteront systématiquement les apatites nanocristallines).

Les composés apatitiques cristallisent généralement dans le système hexagonal (groupe d'espace  $P6_3/m$ ) et peuvent être représentés par un empilement de tétraèdres (ions  $PO_4^{3-}$ ), formant des interstices partiellement remplis d'ions  $Ca^{2+}$ . La projection sur le plan (001) de la structure de l'HAp, illustrée dans la Figure I-1, fait apparaître deux types de tunnels, parallèles à l'axe  $c$ . Les tunnels centrés sur l'axe sénaire, figurés en pointillés larges, sont les plus volumineux (0,3-0,45 nm) et sont occupés de manière axiale par les anions monovalents ( $OH^-$ ,  $F^-$ ). Ces tunnels sont bordés par six ions  $Ca^{2+}$ , notés calcium II, qui s'organisent en deux triangles équilatéraux décalés. Ce sont des voies d'accès privilégiées aux substitutions en site anionique (en remplacement des ions  $OH^-$ ,  $F^-$ ) ou cationique (en remplacement des ions  $Ca^{2+}$  II), voire à de petites molécules ( $H_2O$ , glycine) (Montel *et al.*, 1980). Les tunnels centrés sur l'axe ternaire, plus petits (0,25 nm), contiennent les quatre autres ions  $Ca^{2+}$  de la maille élémentaire, notés calcium I (figurés en pointillés fins), organisés en colonnes calciques.



**Figure I-1** Structure cristallographique de la maille d'hydroxyapatite représentée en projection selon le plan (001). Les cercles représentent les tunnels (pointillés fins : tunnel parallèle à l'axe ternaire, contenant les ions colonnaires  $Ca^{2+}$  I ; pointillés larges : tunnel parallèle à l'axe sénaire, bordés par les ions  $Ca^{2+}$  II)

Ces composés ont des propriétés structurales qui leur confèrent une grande adaptabilité, notamment vis-à-vis des substitutions ioniques possibles et des écarts par rapport à la stœchiométrie. Ces particularités fondent probablement l'un des intérêts majeurs des

squelettes apatitiques, dont la physico-chimie peut s'adapter à leur rôle à jouer dans l'organisme (ex. stabilité et très faible dissolution pour l'émail dentaire, capacité de remodelage pour le minéral osseux). Les systèmes squelettiques plus primitifs, constitués notamment par des carbonates de calcium ou des silicates, ne permettent pas cette grande adaptabilité.

### 1.2.1 Substitutions ioniques

De nombreuses substitutions sont possibles dans la structure apatitique, au niveau des trois sites (calcium, phosphate et hydroxyde), par des ions de charge équivalente ou non.

#### *Substitutions cationiques*

En fonction de leur taille, de leur charge et de leur configuration électronique (voir Tableau I-1), certains cations pourront se substituer à l'élément calcium dans la structure de l'hydroxyapatite. Pour les apatites biologiques, ce phénomène est quantitativement restreint, et ces éléments (magnésium  $Mg^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ...) sont le plus souvent retrouvés à l'état de traces (Iyengar et Tandon, 1999), bien qu'ils puissent jouer des rôles biologiques notables. Cependant, ces éléments traces offrent une perspective de recherches très intéressante pour la reconstruction des paléo-environnements et des paléo-diètes des espèces disparues (voir chapitre C, section 3.2). En effet, certains de ces éléments sont incorporés sous contrôle de l'alimentation (ex.  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ) (Balter *et al.*, 2012), alors que d'autres éléments exogènes pourront être un indicateur du degré de modification qu'une apatite biologique a subi dans son environnement diagénétique (ex. uranium  $U^{3+}$ , thorium  $Th^{4+}$ ) (Grün *et al.*, 2008).

**Tableau I-1 Exemples de cations bivalents et de leurs rayons ioniques, en coordination VI, pouvant s'insérer dans la structure apatitique, d'après Shannon et Prewitt, 1969**

Ions	$Na^+$	$Mg^{2+}$	$Zn^{2+}$	$Cd^{2+}$	$Ca^{2+}$	$Sr^{2+}$	$Pb^{2+}$	$Ba^{2+}$	$U^{3+}$	$Th^{4+}$
Rayon (nm)	0,102	0,072	0,075	0,095	<b>0,100</b>	0,116	0,118	0,136	0,106	0,100

Notons que pour des charges équivalentes, la capacité d'incorporation d'ions minéraux bivalents en substitution du calcium ne dépend pas seulement de la taille ionique. Sur la base d'une revue bibliographique des propriétés thermodynamiques d'apatites phosphatées suivie du développement d'une approche analytique, Drouet<sup>2</sup> a pu en particulier mettre en évidence

---

<sup>2</sup> Travaux en cours de publication

le rôle prépondérant de l'électropositivité des éléments, devant l'effet de taille qui est souvent le seul à être considéré. Par ailleurs, la composition d'une telle phase solide, en environnement aqueux, va rester en étroite relation avec la composition de la phase aqueuse environnante. D'un point de vue thermodynamique, la recherche de l'énergie la plus basse d'un système peut s'accompagner d'une incorporation d'ions dans l'apatite malgré l'obtention d'une phase solide moins stable. Ces incorporations s'appuient sur un bilan globalement favorable qui prend en compte les ions aqueux formés, ou ceux ayant disparu, selon le processus d'échange ionique. Un exemple est celui de l'incorporation d'ions plomb  $Pb^{2+}$  qui mène pourtant à une phase apatitique moins stable qu'une phase purement calcique : l'avantage réside dans le remplacement des ions  $Pb^{2+}_{(aq)}$  en solution, qui sont très instables, par des ions  $Ca^{2+}_{(aq)}$ , beaucoup plus stables. Les éléments zinc  $Zn^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  ou cadmium  $Cd^{2+}$ , pourront ainsi être incorporés. D'un point de vue biomédical, l'incorporation de métaux lourds (ex. Pb, Cd) au sein de l'apatite osseuse se répercute par des pathologies de type ostéoporose, ostéomalacie et autres intoxications.

Dans une moindre mesure, l'incorporation de cations de charges différentes (sodium  $Na^+$ ,  $U^{3+}$ ,  $Th^{4+}$ ) est également observée ; elle induira d'autres substitutions ou lacunes qui viendront compenser la perte ou le gain de charge pour préserver l'électroneutralité du solide.

### ***Substitutions anioniques***

L'apatite phosphocalcique d'origine biologique est invariablement modifiée en sites anioniques, en remplacement des ions  $PO_4^{3-}$  ou  $OH^-$ . Les ions carbonate  $CO_3^{2-}$  et les ions hydrogénophosphate  $HPO_4^{2-}$  sont les groupements anioniques qui vont préférentiellement être incorporés à la place des ions phosphate (ex. carbonatation de type B).

Les ions  $HPO_4^{2-}$  peuvent notamment être identifiés par plusieurs techniques telles que la spectroscopie infrarouge (Rey *et al.*, 1989, Rey *et al.*, 1990, Vandecandelaere *et al.*, 2012) ou la résonance magnétique nucléaire du phosphore 31 (RMN  $^{31}P$ ) sur poudre d'os lyophilisé (Roberts *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1994).

Les ions  $CO_3^{2-}$  peuvent également se substituer – bien que moins préférentiellement, sauf dans des conditions de synthèse bien précises – à la place des anions monovalents, en cas de carbonatation de type A. De la même façon, les substitutions par des ions de charges différentes seront accompagnées d'un mécanisme de compensation de charge (substitutions, lacunes). L'ensemble de ces modifications structurales résulte de la mise en jeu des phénomènes d'équilibre solide-solution de l'apatite dans son milieu et des phénomènes de

compensation de charge. Suite à cela, les teneurs relatives des différents constituants initiaux ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{OH}^-$ ) peuvent changer, et d'autres éléments apparaissent au sein de la structure apatitique (ex.  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ), ce qui peut induire des modifications des propriétés de surface.

### 1.2.2 (Non) stœchiométrie

Pour l'hydroxyapatite, la stœchiométrie est caractérisée par le rapport Ca/P, idéalement égal à  $10/6 = 1,66-1,67$ . Pourtant, il est rare d'obtenir un tel ratio dans l'émail dentaire, comme pour des composés de synthèse. Les hypothèses qui tentent d'expliquer la variation du rapport Ca/P sont nombreuses.

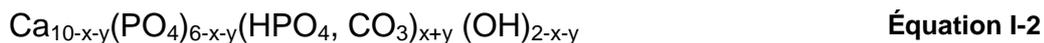
La sur-stœchiométrie ( $\text{Ca/P} > 1,67$ ) peut être liée à la présence de calcium adsorbé ou d'oxyde/hydroxyde de calcium non détecté (Diallo-Garcia, 2012; Elliott, 1994; Ducheyne, 2011). En général, elle découle de l'absence de prise en compte de la carbonatation du composé, pour lequel la stœchiométrie est définie par le rapport  $\text{Ca}/(\text{P}+\text{C})$ .

La sous-stœchiométrie ( $\text{Ca/P} < 1,67$ ) est un phénomène plus complexe, mais très courant, le plus souvent interprété par une déficience en calcium, associée à des lacunes en sites anioniques monovalents et à un changement de spéciation  $\text{PO}_4^{3-}/\text{HPO}_4^{2-}$  en sites phosphate. Un rapport Ca/P – ou Ca/(P+C) pour des systèmes carbonatés – inférieur à 1,5 peut aussi être observé pour des apatites très immatures. Cette valeur correspond au phosphate tricalcique apatitique, dérivation apatitique du phosphate de calcium amorphe (Rollin-Martinet, 2011).

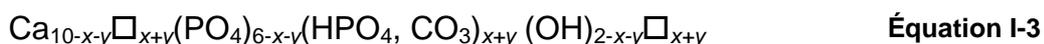
L'ensemble de ces observations aboutit à la formulation générale des apatites selon diverses équations, du type de l'Équation I-1 ou de l'Équation I-2, qui doivent ensuite être confrontées au cas du composé d'intérêt. Le terme  $u$  représente la possibilité d'incorporation additionnelle de  $\text{Ca}^{2+}$  et d'ions  $\text{OH}^-$  dans le réseau d'une apatite carbonatée, en particulier à pH alcalin (Ducheyne, 2011), mais il peut généralement être négligé pour les apatites biologiques.



avec  $0 \leq x \leq 2$  et  $0 \leq 2u \leq x$



Cette seconde équation est généralement considérée comme caractéristique. Compte tenu d'un manque d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{OH}^-$  dans leurs sites respectifs, en comparaison avec la composition de l'hydroxyapatite stœchiométrique, cette formule implique l'existence de lacunes sur ces deux types de sites. Pour insister sur leur présence, on peut représenter ces lacunes par le symbole  $\square$  dans l'écriture de la formule chimique globale, menant à l'Équation I-3:



Cette formule s'applique particulièrement à l'apatite d'origine osseuse, carbonatée et de formule non-stœchiométrique. La carbonatation de l'apatite est dépendante de l'âge des cristaux déposés sur la matrice extracellulaire. Le minéral osseux est donc un minéral évolutif, qui présente un certain nombre d'imperfection en raison de son importance biologique.

## 2 Le tissu osseux

L'os *in vivo* se compose en moyenne de 65 à 70% de minéral (50-85%), 20% de collagène, 8 % d'eau et 2 % de composants organiques non collagéniques (Legros, 1984).

La phase inorganique est représentée par une apatite carbonatée non-stœchiométrique, agencée sous forme de nanocristaux. Ces cristaux sont intimement associés à une matrice extracellulaire collagénique pour former un tissu composite, aux fonctions étendues (soutien, protection mais aussi réservoir d'ions mobilisables en fonction des besoins métaboliques, homéostasie).

### 2.1 Composition du tissu conjonctif osseux

#### 2.1.1 Phase organique

La partie organique se compose à 90% de fibres de **collagène de type I**. Le collagène de type I est une protéine fibrillaire qui s'assemble selon différentes étapes (Cau et Seité, 1999) :

1) Le *procollagène* est un précurseur de la molécule de collagène, dont les extrémités N et C terminales sont formées de résidus solubles. Le procollagène est une chaîne

polypeptidique en hélice, constituée par la répétition d'un motif caractéristique Glycine-Proline-X et Glycine-X-Hydroxyproline (X pouvant représenter n'importe quel acide aminé).

- 2) Le *tropocollagène* associe trois chaînes (deux chaînes  $\alpha_1$  et une chaîne  $\alpha_2$ ) grâce à la répétition périodique des acides aminés et mesure environ 300 nm pour un diamètre de 1,2 nm. En effet, la glycine est un petit acide aminé sans chaîne latérale, qui peut se positionner au centre de l'architecture (Pollard et Earnshaw, 2004). Les chaînes latérales des autres acides aminés peuvent exposer des fonctions hydroxyle -OH, acide carboxylique -COOH, ou amine -NH<sub>2</sub> vers la surface. Ces fonctions stabilisent la conformation du collagène, mais sont également susceptibles de réagir selon des liaisons chimiques de différents types (hydrogène, covalente ou électrostatique) (Wang, 2012)
- 3) La maturation de la *triple hélice* fait suite au clivage enzymatique des extrémités. Ceci permet un alignement des molécules de collagène au sein de la matrice extracellulaire sous forme de fibres.
- 4) La *fibrille* est formée par la juxtaposition des fibres, avec un décalage périodique d'environ  $\frac{1}{4}$  de leur longueur, pour un diamètre de  $\sim 0,1 \mu\text{m}$  (variable selon les tissus). Ce phénomène est à la base de la striation périodique caractéristique de la fibrille d'environ 60 nm, ce qui crée des lacunes (*gap*) qui pourront accueillir les nanocristaux d'apatite. En effet, ces lacunes seraient un lieu privilégié de nucléation cristalline, en plus de la surface des fibrilles (Landis *et al.*, 1996). La matrice collagénique est stabilisée par des modifications post-traductionnelles et des liaisons croisées à l'intérieur des molécules et entre molécules adjacentes. La transformation, par désamination oxydative, de résidus lysine et hydroxylysine spécifiques en aldéhydes réactifs est à l'origine de liaisons réductibles intra- et intermoléculaires. Un pontage non réductible est obtenu suite au réarrangement avec un troisième dérivé aldéhydique, sous la forme de pyridinoline ou désoxypyridinoline. Ces liaisons peuvent servir de cibles pour déterminer l'importance de la dégradation collagénique (en cas de pathologie, ou au cours du temps) (Paschalis *et al.*, 2004), notamment lors d'une analyse par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (voir chapitre B2.3).
- 5) Les *faisceaux* de collagène s'agencent par association de fibrilles.

Les **constituants organiques non collagéniques**, dits « minéralisants » (Wang, 2012), représentent environ 10% de la fraction organique de l'os. Ils comprennent la substance

fondamentale qui est formée de protéoglycanes et de glycoprotéines, ainsi que d'autres protéines non collagéniques (ostéocalcine, albumine...) mais aussi des lipides, notamment retrouvés dans la moelle osseuse.

## 2.1.2 Phase minérale

### Composition

Comme précédemment décrit, l'apatite osseuse est une apatite nanocristalline non-stœchiométrique qui présente donc de nombreuses lacunes et substitutions ioniques dans son réseau cristallin (Legros, 1984), ce qui n'altère pas le motif cristallographique global, mais modifient les paramètres de maille (voir paramètres *a* et *c*, dans le Tableau I-2) (Elliott, 1994). La formule de l'apatite osseuse (Équation I-4), pour un os long cortical (Legros, 1984), peut être généralisée par l'Equation I-4. D'autres éléments sont présents à l'état de traces. La composition chimique moyenne du minéral osseux, comparée à celle de l'émail dentaire et de la dentine, figure dans le Tableau I-2.



**Tableau I-2 Composition chimique et paramètres de réseau cristallin de l'apatite des différents tissus minéralisés chez l'Homme, d'après Iyengar et Tandon, 1999**

Composition	Poids (%)		
	Os	Dentine	Email
Calcium (Ca <sup>2+</sup> )	8,62-28,9	25-28,2	36-37,4
Phosphore (P)	7,1-12,5	12,1-13,5	10-18,3
<b>Rapport Ca/P<sup>3</sup></b>	<b>1,65-1,7</b>	<b>1,61-1,67</b>	<b>1,54-1,64</b>
Sodium (Na <sup>+</sup> )	0,32-0,8	0,53-0,75	0,39-1,16
Potassium (K <sup>+</sup> )	0,05-0,62		0,04
Magnésium (Mg <sup>2+</sup> )	0,01-0,39	0,62-0,87	0,17-0,28
Carbonate (CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )	4-7	2,4-4,2	4-5,6
Fluor (F <sup>-</sup> )	0,06-0,21	0,014-0,016	0,03-0,26
Chlore (Cl <sup>-</sup> )	0,02-0,27	0,035-0,039	0,32-0,65
Traces de Zn, Cu, Sr, Fe, Pb...			
Total inorganique	65	70	97
Total organique	25	20	1,5
Paramètres ( <i>a</i> , <i>c</i> ) Å	(9,441 ; 6,880)	(9,421 ; 6,887)	(9,41-6,89)

<sup>3</sup> Etant donnée la formule (Équation 1), le rapport Ca/P n'est pas significatif de la stœchiométrie pour des apatites carbonatées : dans ce cas, le rapport Ca/(P+C) est le rapport à considérer pour évaluer le degré de stœchiométrie.

### ***Dimensions***

Les dimensions des cristallites sont donc aussi sujettes à variation. En première approximation, il s'agirait pour l'os de nanoplaquettes dont les dimensions moyennes, généralement estimées à l'aide d'analyses en diffraction des rayons X (DRX), sont de l'ordre de 20 à 60 nm de longueur, pour 2 à 5 nm d'épaisseur et 10 à 20 nm de largeur (Daculsi *et al.*, 1997). Ces dimensions sont variables en fonction de l'âge du minéral et de sa localisation, comme l'illustre la Figure I-3. Les cristaux de l'os, de taille nanométrique, sont parmi les plus petits de tous les cristaux biologiques : le rapport masse/surface est favorable à la réactivité de ces cristaux (grande surface spécifique) vis-à-vis du milieu environnant (Trueman *et al.*, 2008). Sur la Figure I-3, il est possible de dénombrer, grâce à la microscopie électronique en transmission à haute résolution (HRTEM pour *High Resolution Transmission Electron Microscopy*), le nombre de mailles dans l'épaisseur d'une cristallite d'os bovin dans un intervalle réduit de 5 à 15 (~7 pour une cristallite de 5,7 nm, et ~12 pour une cristallite de 10 nm) (Li et Aparicio, 2013).

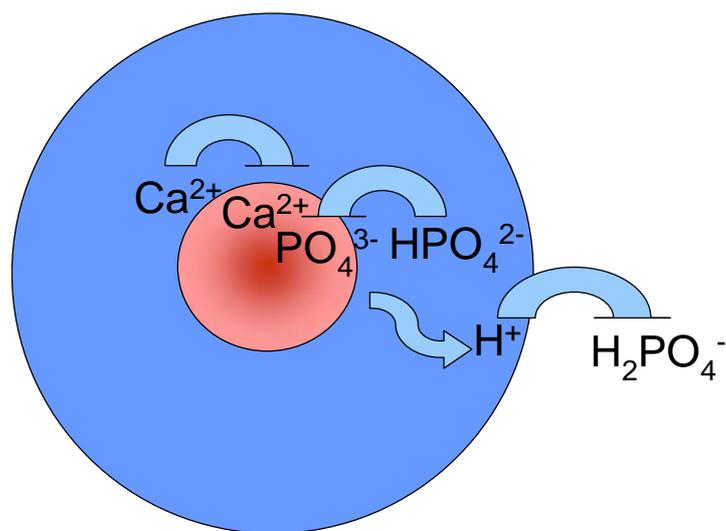
### ***Propriétés de surface***

Outre une grande surface spécifique, la réactivité des cristaux d'apatite est attribuée à la nature physico-chimique particulière de la surface. Différentes méthodes d'identification des groupements ioniques (ex. RMN  $^{31}\text{P}$ , déconvolution spectrale en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, ou FTIR pour *Fourier Transform Infrared spectroscopy*) ont en effet permis l'identification d'environnements chimiques dits « non-apatitiques » à la surface des cristaux d'apatite immatures, qui ne correspondent à aucun des environnements ioniques d'une apatite bien cristallisée. Sur la Figure I-2, la zone périphérique sans motif de maille, visible sur les clichés HRTEM de cristallites individualisées d'apatite dentinaire, est attribuée à ces environnements non-apatitiques. Ces environnements peuvent être modélisés sous la forme d'une couche hydratée phosphocalcique à la surface des cristaux immatures.

La couche hydratée, représentée schématiquement sur la Figure I-2, contient des molécules d'eau mais également une proportion importante d'ions minéraux labiles (principalement  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$ ), faiblement liés en surface, aisément mobilisables, qui peuvent donc interagir avec d'autres espèces chimiques en solution dans le milieu (Rey *et al.*, 1989). Cette couche hydratée est dite « métastable », car elle évolue inexorablement au cours de la maturation (vieillesse) du cristal en solution, en faveur d'une plus grande stabilité thermodynamique. En effet, le cœur apatitique des nanocristaux néoformés est encore très

largement non-stœchiométrique et contient des ions  $\text{HPO}_4^{2-}$  dits « apatitiques ». Au cours de la maturation, le cœur apatitique va avoir tendance à incorporer certains ions de la couche hydratée, de préférence ceux qui sont les moins mobilisables et/ou qui confèrent le plus de stabilité au réseau cristallin (ex.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , cf. Figure I-2). En parallèle, il va avoir tendance à libérer des ions  $\text{HPO}_4^{2-}$ , ce qui augmente le rapport Ca/P de l'apatite. Par conséquent, la couche hydratée des nanocristaux va avoir tendance à disparaître progressivement, au profit du cœur apatitique.

*Remarque :* L'analyse combinée d'apatite nanocristalline de synthèse lacunaire par HRTEM, RMN et diffraction aux rayons X (DRX), a permis d'estimer à quelques nm l'épaisseur moyenne de cette couche hydratée de surface, en périphérie d'un cristallite de dimensions plus grandes, d'environ 10 nm de large pour 40 nm de long (Jäger *et al.*, 2006). Toutefois, ceci dépend de l'état de maturation de la cristallite étudiée.



**Figure I-2 Représentation schématique des modifications cristallines liées au phénomène de maturation. Les ions labiles en surface sont progressivement incorporés dans la structure apatitique aux dépens de la couche hydratée. Certaines espèces chimiques seront préférentiellement incorporées dans le domaine apatitique, d'autres sont plus facilement échangeables au niveau de la couche hydratée**

Les ions hydrogénophosphate sont donc surtout présents dans un os jeune, à l'intérieur ou en surface des cristallites (Roberts *et al.*, 1992). Ceci est en fait lié au mode de formation aqueux et à température modérée de telles apatites. En effet, dans les fluides biologiques comme en milieu biomimétique simulé, le pH proche de la neutralité implique que les ions

phosphates en solution ne peuvent être que protonés (sous forme  $\text{HPO}_4^{2-}$  ou  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , voir Figure I-2), puisque la forme  $\text{PO}_4^{3-}$  n'existe de façon prépondérante en solution qu'en milieu très alcalin. Ainsi, les premiers précipités formés comportent un grand nombre d'ions phosphate encore protonés ; leur déprotonation va se réaliser au fur et à mesure de la progression de la maturation apatitique. Il a en effet été démontré (Jäger *et al.*, 2006) que la couche hydratée présente un contenu en phosphore équivalent au cœur du cristal, sous la forme d'ions  $\text{HPO}_4^{2-}$ , tandis que l'espèce phosphatée majoritaire du domaine cristallin apatitique est représentée par les ions  $\text{PO}_4^{3-}$ .

A l'inverse des ions  $\text{HPO}_4^{2-}$ , le taux de carbonatation d'une apatite biologique tend à augmenter avec la maturation du cristal, qui garde toutefois un rapport  $\text{Ca}/(\text{P}+\text{C})$  relativement constant (McElderry *et al.*, 2013; Rey *et al.*, 1995).

Le comportement des apatites biologiques, et notamment osseuses, est donc complexe : il s'agit d'un minéral évolutif, loin d'être inerte, qui ne présente pas une composition figée, que ce soit au moment de sa formation ou lors de son évolution ultérieure. Cette évolution dépend du tissu considéré et de son métabolisme : dans l'os, l'activité cellulaire sera prépondérante, dans un équilibre constant entre activité de destruction (ostéoclasie) et activité de régénération de l'os (ostéosynthèse). D'un point de vue apatitique, le remodelage osseux est donc un processus qui tend à détruire les cristaux anciens, et donc d'une réactivité moindre, ce qui diminue la fonction du minéral osseux dans l'homéostasie, aux profits des cristaux plus jeunes, néoformés. Ce processus peut être interprété à la lumière de travaux récents (Rollin-Martinet *et al.*, 2013), qui démontrent l'évolution thermodynamique inexorable en milieu humide d'apatites lacunaires, de caractéristiques proches de celles du minéral osseux. On peut donc penser que le phénomène de remodelage osseux est aussi largement une nécessité dictée par la thermodynamique (d'origine non biologique). En revanche, les cristaux immatures néoformés présentent de nouveau une forte réactivité de surface, exploitable dans l'homéostasie.

Comme mentionné en introduction de ce chapitre, le phénomène de remodelage est à l'origine d'une certaine hétérogénéité d'états de maturation de la phase apatitique qui constitue le tissu osseux. C'est pourquoi il est difficile d'assigner au minéral osseux une composition bien définie, homogène, propriétés qui sont plutôt l'apanage des apatites naturelles bien cristallisées (Trueman *et al.*, 2008).

## 1.1 Organisation du tissu osseux

### 2.1.3 Interface organo-minérale

#### *A l'échelle moléculaire*

L'organisation du tissu osseux repose sur la minéralisation d'une **matrice collagénique** préalablement constituée. Les résidus  $\gamma$ -glutamyl-phosphate<sup>4</sup> et les groupements carboxylates ( $-\text{COO}^-$ ) de la glycine sont potentiellement impliqués dans cette interaction collagène – minéral, par le biais d'interactions avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$  en surface de l'apatite (Collins *et al.*, 1995). En effet les ions  $\text{Ca}^{2+}$  pourraient lier deux groupements chargés négativement, comme les groupements carboxylates, et ainsi créer un pont entre le collagène et l'apatite (Fantner *et al.*, 2005). De plus, les tunnels structurels de l'apatite (sur l'axe sénaire), peuvent potentiellement accueillir un résidu glycine ( $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ).

La minéralisation complète est obtenue par le remplacement des **molécules d'eau** entre les fibrilles de collagène par des cristaux d'apatite (Campos *et al.*, 2012). L'eau constitue ~10% du poids de l'os et joue un rôle essentiel à l'interface organo-minérale. Les molécules d'eau se localisent à plusieurs niveaux de la structure (Wang, 2012) :

- Eau dite « libre » : circule dans les macropores de l'os (100-600 nm) et permet la diffusion des nutriments. En analyse thermogravimétrique (ATG), on observe la disparition, de façon réversible, de l'eau libre, pour des températures de l'ordre de 100°C, et dans tous les cas inférieures à 200°C (LeGeros *et al.*, 1978).
- Eau interstitielle : se situe entre les espaces mésoscopiques à l'interface organo-minérale et joue un rôle essentiel dans l'organisation spatiale des fibrilles de collagène et la stabilisation de surface des cristallites. Elle disparaît de façon irréversible entre 200 et 400°C (LeGeros *et al.*, 1978).
- Eau « structurale » : stabilise les cristaux d'apatite, au niveau de la couche non-apatitique de surface des nanocristaux, voire de lacunes cationiques ou des tunnels centrés sur l'axe sénaire (Rey, 1984).

Les environnements non apatitiques, en particulier les groupements carbonate et phosphate labiles de la couche hydratée des cristaux d'apatite, jouent potentiellement un rôle important dans cette interaction organo-minérale (Rey *et al.*, 1994). La composition d'autres

---

<sup>4</sup> Ces résidus sont spécifiques des chaînes collagéniques  $\alpha 2$  de l'os et du cartilage minéralisé mais pas de celles existant dans le collagène des tissus mous

**protéines non collagéniques** sont évocatrices du rôle essentiel des groupements phosphates (ex. sialoprotéine osseuse ou dentinaire) et des groupements carboxylates (portés par l'acide glutamique) de ces protéines dans la minéralisation osseuse (Boskey, 2007).

Les groupements carboxylates des **ions citrate** (3 groupements  $\text{COO}^-$  par ion) sont également invoquées en tant que principal groupement à l'origine de l'interaction citrate – nanocristaux d'apatite. La mise en évidence des ions citrate en surface des nanocristaux d'apatite repose sur l'identification d'un carbone quaternaire non protoné relié à un atome d'oxygène, cette réponse associe plusieurs déplacements chimiques ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  et  $^1\text{H}$ ) en RMN du solide. Les ions citrate représenteraient 1 à 5 % de la fraction organique osseuse et sont susceptibles de recouvrir la quasi-totalité des nanocristaux. En effet, si l'ion citrate en lui-même est trop grand pour pouvoir être incorporé dans la structure apatitique, il n'est pas exclu qu'un échange ionique entre groupement carboxylate et ions (hydrogène)phosphate de la couche hydratée des cristaux d'apatite puisse avoir lieu (Hu *et al.*, 2010, Gómez-Morales *et al.*, 2013).

#### ***A l'échelle nano- micromorphologique***

D'un point de vue structurel, il n'existe pas de consensus sur l'agencement hiérarchique entre les cristallites apatitiques et les fibrilles de collagène. Le modèle classique décrit des sites de nucléation des cristaux apatitiques de taille nanométrique à l'intérieur (au niveau des *gap*) des fibrilles de collagène ; la minéralisation se poursuit dans les espaces interfibrillaires puis en surface des fibrilles (Landis *et al.*, 1996). Les dépôts des cristaux d'apatite carbonatée sont ainsi répartis à l'intérieur et en surface des fibrilles, leur axe cristallographique *c* apparaissant parallèle à la direction des fibrilles de collagène (Landis *et al.*, 1996; Li et Aparicio, 2013), comme l'illustrent les faisceaux les clichés en HRTEM d'un os cortical bovin (Li et Aparicio, 2013) sur la Figure I-3.

Suite aux investigations plus poussées à l'échelle nanométrique par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS, pour *small angle X-ray scattering*), une organisation tridimensionnelle plus complexe, hélicoïdale, des fibrilles, schématisée dans la Figure I-4 (c, d), est également proposée (Alexander *et al.*, 2012). L'optimisation de la micro-imagerie SAXS à balayage pour l'investigation du tissu osseux par Fratzl *et al.* (1997) permet d'évaluer l'épaisseur et l'orientation préférentielle des cristaux ; de récents travaux tendent à réévaluer nettement la proportion extrafibrillaire de minéral au sein du tissu osseux à l'aide de cette technique (Alexander *et al.*, 2012, Figure I-4b).

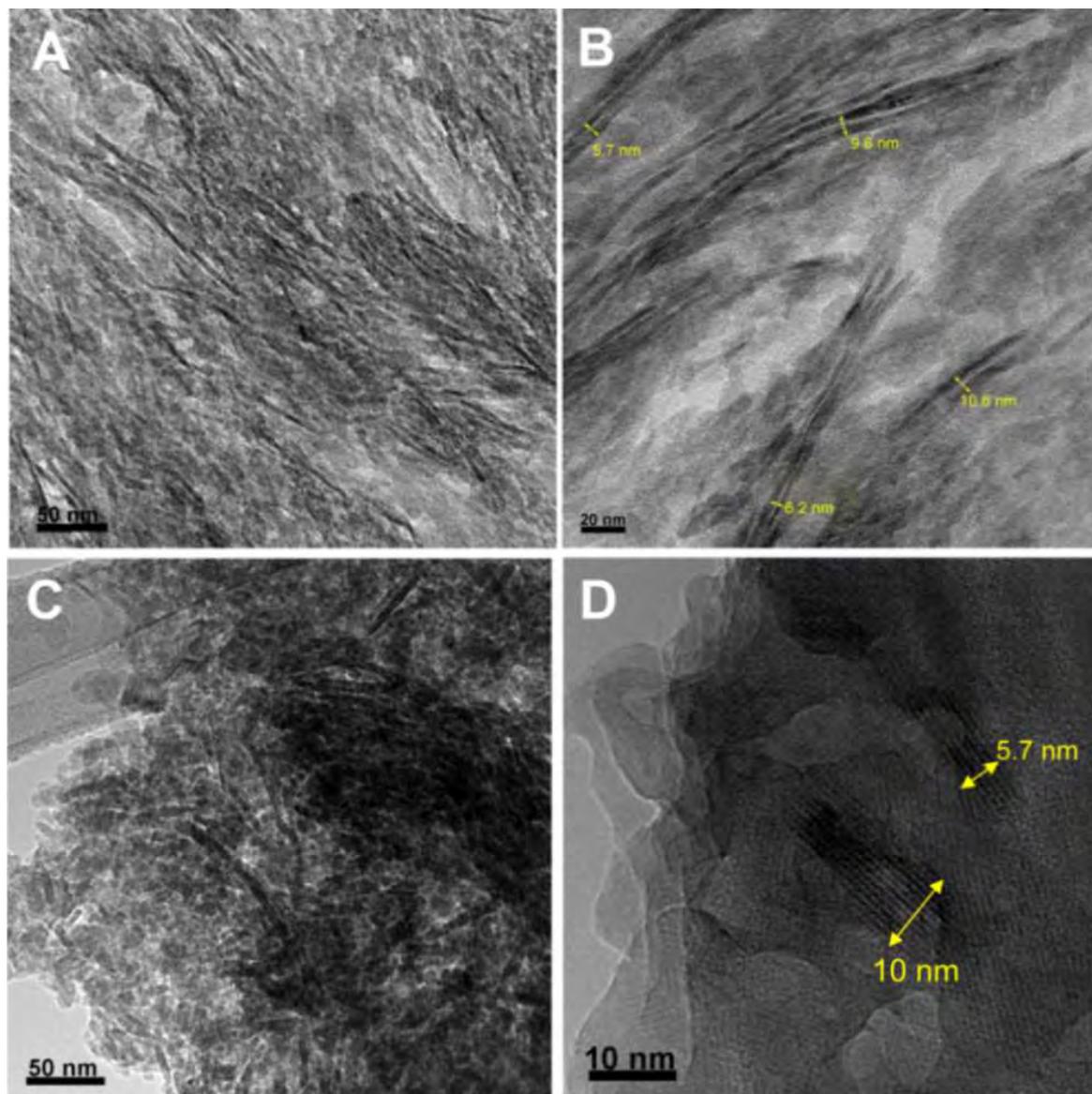
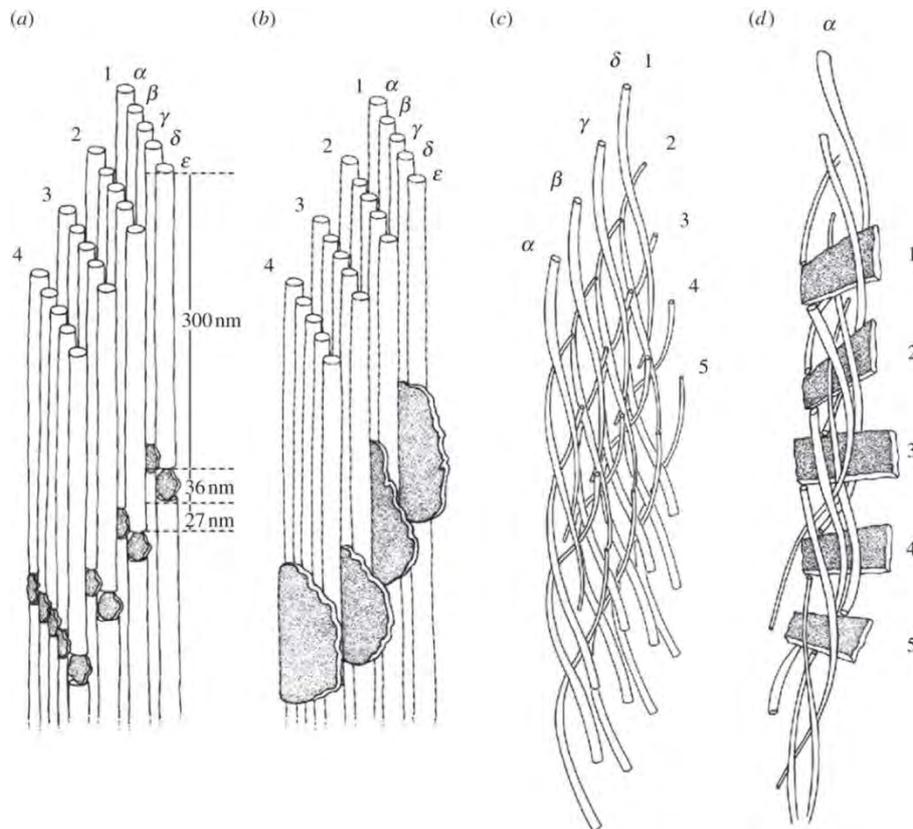


Figure I-3 Cliché en MET d'os cortical bovin d'après Li et Aparicio, 2013. (A) et (B) Section d'os longitudinale mettant en évidence des cristallites individualisés (traits noirs), agencés en paire de faisceaux (longueur 20-190 nm, épaisseur 2-4 nm, espace entre deux faisceaux ~2,5 nm). (C) et (D) Os bovin broyé montrant des fragments de cristallites (largeur 5,7 - 10 nm)

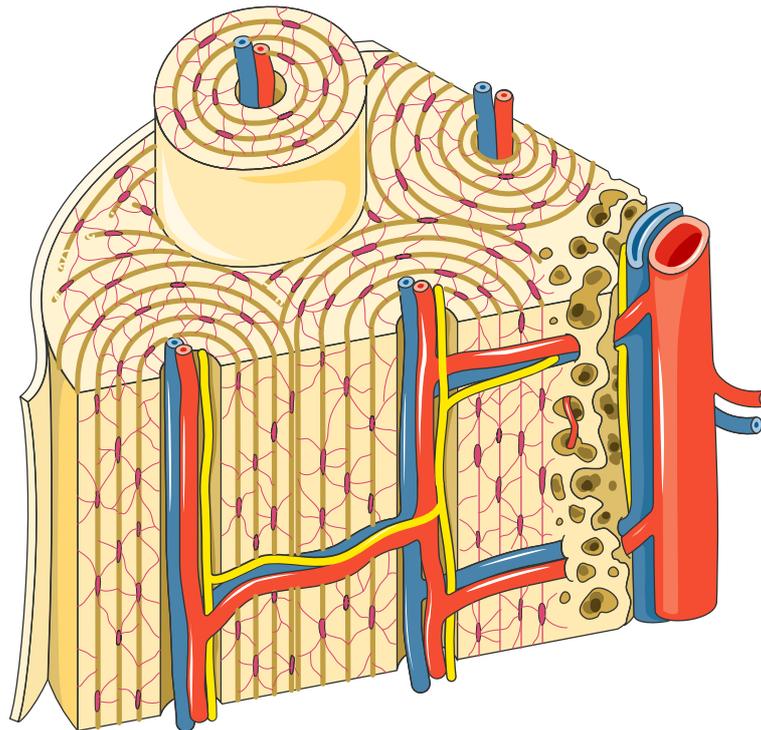


**Figure I-4** Modélisations possibles de l'organisation du collagène osseux. (a) Modèle classique proposant l'alignement d'une extrémité à l'autre des molécules de collagène et la nucléation des cristaux d'apatite dans les *gap*. (b) La minéralisation finale prend place dans les espaces intermoléculaires et à la surface des fibrilles. (c) La mise à jour du modèle suite aux analyses Synchrotron décrit une torsion en hélice droite des molécules de collagène associées. (d) Faute d'espace suffisant entre les molécules de collagène, ce modèle estime un agencement des cristallites d'apatite au niveau des *gap*. D'après Alexander *et al.*, 2012

En plus d'une adaptation aux contraintes mécaniques essentielle du vivant de l'organisme, cette imbrication intime de la phase minérale et de la phase organique confère à l'os une résistance particulière face aux dégradations *post mortem*.

#### 2.1.4 Organisation histologique

En périphérie des pièces osseuses (voir schéma d'un os long, Figure I-5), l'*os cortical* ou *os compact* (Coujard et Poirier, 1980) constitue la partie la plus dense de l'os. Il s'organise en unités appelées ostéons ou systèmes de Havers, centrés sur un canal central.



**Figure I-5 Représentation schématique d'une section transversale et longitudinale d'os long. Les ostéons, unité élémentaire de l'os compact, sont centrés sur des canaux de Havers, contenant le paquet vasculo-nerveux (veine en bleu, artère en rouge et nerf en jaune). Les canaux de Volkmann connectent les canaux de Havers entre eux dans un plan transversal. Entre les lamelles d'un ostéon, les ostéocytes, logés dans des lacunes ostéocytaires, envoient des prolongements interconnectés. En périphérie, le périoste est un tissu conjonctif dense recouvrant l'os. L'os trabéculaire, ou spongieux, apparaît au centre, sous la forme d'un réseau de trabécules osseuses contenant notamment le tissu hématopoïétique (moelle) (Servier Medical Art - Creative Commons)**

Chaque unité est formée de plusieurs couches de lamelles concentriques formées de matrice osseuse. La direction des ostéons est parallèle à l'axe longitudinal de l'os. L'orientation des fibres de collagène est différente dans les différentes lamelles, par conséquent les lamelles se renforcent mutuellement. Des lamelles interstitielles occupent les intervalles entre les ostéons, vestiges d'anciennes structures après remodelage osseux. Des lacunes sont présentes entre les lamelles, et parfois dans les lamelles. Ces lacunes contiennent des ostéocytes. Les lacunes sont connectées par des canalicules qui contiennent les prolongements cytoplasmiques des ostéocytes. Chez le fœtus, l'organisation du tissu osseux n'est pas lamellaire (tissu osseux dit « tissé »). Ce type d'os est moins solide, de par son degré d'organisation et sa moindre densité minérale.

Les ostéocytes sont des cellules quiescentes. L'os est remodelé dans une unité de temps et de lieu où ostéoclastes et ostéoblastes, en provenance des zones vascularisées (os trabéculaire, canaux de Havers, voir Figure I-6) agissent séquentiellement pour

respectivement dégrader et reformer l'os. L'ensemble des cellules actives sera localisé dans les tissus vasculaires, à l'exception des cellules bordantes qui tapissent les cavités et qui pourront se différencier en ostéoblastes fonctionnels (voir Tableau I-3, Figure I-6).

Tableau I-3 Types, localisation et fonction des différentes cellules du tissu osseux

Type de cellule	Description	Fonction	Localisation
Ostéoblastes	mononuclées, immature	sécrétion de la matrice protéique (ostéoïde)	précurseurs dans le sang ou en bordure de l'os, action en surface de l'os
Ostéocytes	mononuclées, prolongements cytoplasmiques	récepteurs sensoriels activité de synthèse réduite	lacunes ostéocytaires à l'intérieur de l'os, prolongements dans canalicules
Ostéoclastes	multinuclées	résorption osseuse	précurseur hématopoïétique (moelle) action en surface de l'os

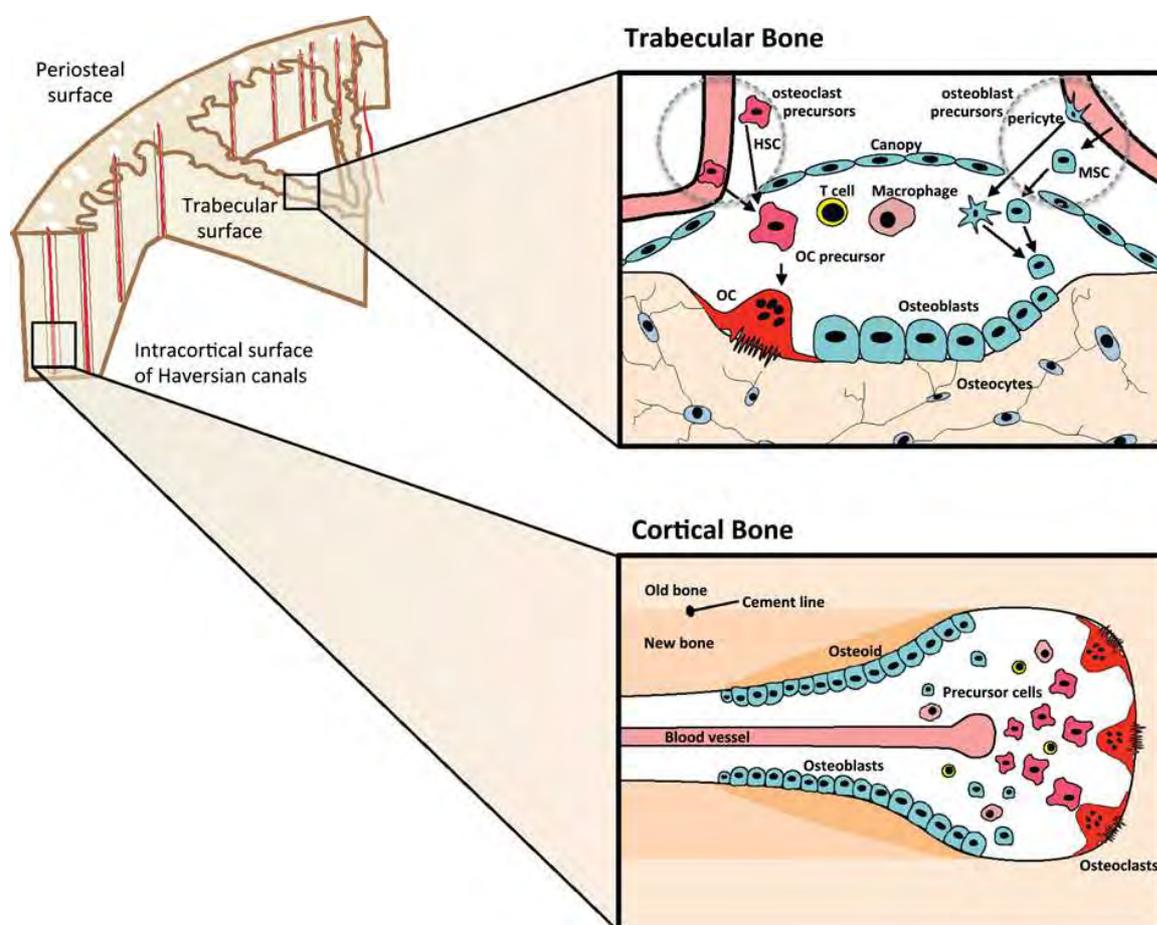


Figure I-6 Les unités de remodelage (BMU, *basic multicellular unit*) se situent sous la bordure (*canopy*) des cellules bordant les cavités (os trabéculaire dans l'encadré du haut, canaux de Havers dans l'encadré du bas). Les ostéoclastes (OC) et ostéoblastes dérivent de souches (respectivement hématopoïétiques HSC, mésenchymateuses MSC) en provenance du sang et de la moelle. Les cellules bordantes peuvent également se différencier en ostéoblastes. Lymphocytes T et macrophages accèdent à la BMU par la vascularisation. D'après Sims et Martin, 2014

L'os trabéculaire ou os spongieux est composé de trabécules osseuses séparées par des espaces médullaires qui contiennent de la moelle osseuse (voir Figure I-5). La moelle osseuse est un tissu conjonctif lâche, riche en adipocytes et en cellules hématopoïétiques. Dans les trabécules épaisses, on trouve des ostéons. Dans les trabécules moins épaisses, on trouve simplement des lamelles irrégulières, des lacunes et des canalicules contenant les ostéocytes et leurs prolongements (Coujard et Poirier, 1980).

## 2.2 Substrats osseux d'ADN ancien

Malgré une densité cellulaire plus importante de l'os spongieux, les prélèvements sur les spécimens osseux sont préférentiellement réalisés à partir de l'os compact, qui présente une meilleure densité minérale (Hagelberg et Clegg, 1991; Keyser-Tracqui et Ludes, 2005; Tuross, 1994). Si possible, la partie moyenne de l'épaisseur corticale est ciblée : un meilleur rendement y est généralement observé (Kaiser *et al.*, 2008). Cette partie, plus isolée par rapport au milieu environnant, est moins susceptible d'être contaminée par de l'ADN exogène (surtout d'origine humaine), et par de l'ADN bactérien, ce qui peut être à l'origine d'une dégradation accrue de l'ADN endogène. Cette meilleure conservation est certainement corrélée à la densité minérale : la probabilité d'extraction d'ADN est en effet réduite à partir de spécimens immatures, dont le tissu osseux est moins organisé (Amory, 2007)

Cependant, les pièces squelettiques contenant une proportion d'os spongieux importante (ex. os courts) ont permis de bons rendements d'extraction. L'extraction d'ADN à partir de phalanges ou de petits os du pied s'avère satisfaisante, dans des contextes médico-légaux, comparativement à d'autres pièces du squelette (Mundorff et Davoren, 2014), et dans des contextes anthropologiques. La caractérisation fine du génome nucléaire et mitochondrial de l'Homme de Denisova (Meyer *et al.*, 2012; Reich *et al.*, 2010) a récemment été effectuée à partir d'une phalange d'une jeune hominidé ayant vécu il y a 30 à 50 000 ans. La quantité d'ADN endogène contenu dans cette phalange a été estimée à ~70% (contre ~1% pour les autres spécimens échantillonnés) et moins de 0,5% des séquences d'hominidés retrouvées sont attribuées à des contaminations humaines modernes. Outre des conditions environnementales favorables (climat froid du Sud de la Sibérie), la présence exceptionnelle d'une grande quantité d'ADN pourrait résulter simultanément de la protection offerte par l'os compact en périphérie, et de la richesse en ADN d'un tissu plus cellulaire comme l'os spongieux.

A l'inverse, d'autres protocoles d'extraction ciblent préférentiellement les fractions les plus minéralisées de l'os (Ginolhac *et al.*, 2012; Orlando *et al.*, 2011; Salamon *et al.*, 2005), qui sont censées représenter de véritables niches moléculaires (Geigl, 2002) où l'ADN est protégé vis-à-vis des agents destructeurs et/ou contaminants. Des agrégats cristallins sont préférentiellement collectés, après sédimentation pendant 5 minutes d'une poudre d'os (granulométrie <500µm) qui a subi une décontamination drastique<sup>5</sup> dans l'étude de Salamon *et al.* (2005). Les agrégats cristallins, de taille micronique, permettraient l'extraction de séquences mieux préservées – non contaminées par des inhibiteurs (voir chapitre I, section C4.2.2) ou par des molécules d'ADN exogènes –, par rapport à l'extraction à partir de poudre d'os total non traitée. De façon indépendante, il a été observé, par Orlando *et al.*, (2011) et Ginolhac *et al.* (2012), que des fragments osseux résiduels, issus d'une première extraction, représentent un meilleur substrat pour la collecte de brins d'ADN moins fragmentés et moins modifiés (taux inférieur de désamination des cytosines). Ces amas contiennent une plus grande quantité d'ADN endogène, ce qui potentialise l'efficacité des nouvelles méthodes de séquençage sans PCR préalable (voir chapitre I, section C4.3). Ces protocoles nourrissent l'hypothèse d'une préservation micro-locale de l'ADN en association avec le matériel apatitique.

Il n'est cependant pas exclu que la fraction collagénique de l'os puisse aussi être une source importante d'ADN ancien, compte tenu de la possibilité pour des fragments d'ADN de rester piégés dans les agrégats de fibrilles lors du remodelage osseux (Campos *et al.*, 2012). Cependant, il y a peu d'éléments concrets en faveur d'une affinité de l'ADN pour le collagène. Dans les travaux de Campos *et al.*, l'étude comparative du rendement d'extraction d'ADN ancien entre la partie dite « collagénique » de l'os, et la partie dite « apatitique » est en faveur d'une localisation minérale des fragments d'ADN, à partir de la première année d'enfouissement. L'extraction d'ADN a été réalisée après la déminéralisation de l'échantillon osseux, soit à partir du surnageant (fraction « apatitique »), soit à partir de la fraction insoluble à l'EDTA, considérée comme collagénique (Campos *et al.*, 2012). A l'heure actuelle, les protocoles d'extraction combine l'action d'agents déminéralisants (chélateurs de ions calcium) et dénaturants, protéolytiques, pour un rendement optimal (cf. chapitre II, section C.2)

---

<sup>5</sup> Traitement de la poudre d'os selon Salamon *et al.* (Salamon *et al.*, 2005), agitation, centrifugation et élimination du surnageant après chaque nouveau lavage : 1) NaOCl 2,5% (2h à T<sub>amb</sub>) 2) Rebroyage 3) NaOCl 2,5% (1h) (x2) 4) Eau distillée saturée par HAp et filtrée 5) Ethanol 95% saturé par HAp (x2) 6) Ethanol absolu 5) Séchage (55°C, 12h) 6) Ethanol 95% saturé par HAp 7) Sonification (55.10<sup>3</sup> cycles/s, 2 minutes)

### 3 L'organe dentaire

De par sa structure, sa localisation, et sa composition, la dent (voir Figure I-7) est de fait souvent le seul vestige utilisable, en contexte archéologique ou suite à des conditions extrêmes de conservation.

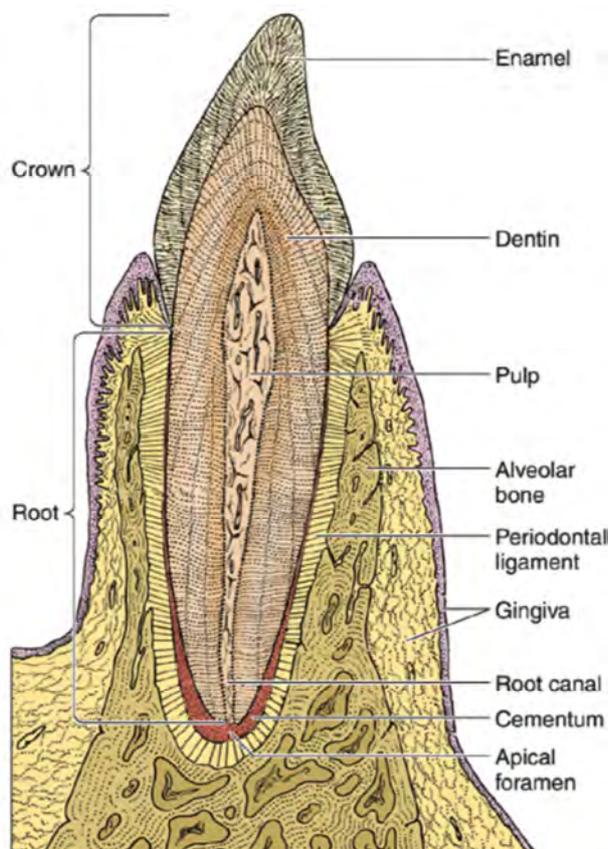


Figure I-7 Schéma en coupe d'une dent monoradiculée au sein de son alvéole

*In vivo*, sauf exception<sup>6</sup>, seule la couronne dentaire émerge de l'os maxillaire ou mandibulaire, plus dense. La couronne est recouverte d'émail, l'émail étant le tissu le plus fortement minéralisé au sein du corps humain. La racine est protégée dans l'os, la partie externe est recouverte de ciment. La dentine présente des analogies avec l'os, tout en étant plus minéralisée. Les cellules qui contiennent de l'ADN sont abritées au centre, au sein du complexe pulpo-dentinaire, véritable « coffre-fort » à ADN (Calvo *et al.*, 2001; Grimoud *et al.*, 2004).

<sup>6</sup> dent incluse ou à l'inverse, pathologies parodontales qui sont à l'origine de l'exposition des racines dentaires.

### 3.1 Complexe pulpo-dentinaire

#### 3.1.1 Dentine

De par sa composition, la dentine (Goldberg, 2008) appartient à la même famille de matériaux que l'os. Ce tissu conjonctif présente une forte teneur minérale représentée par des cristaux d'apatite carbonatée (70%) reposant sur une matrice organique (20%), essentiellement collagénique (90% de collagène de type I, 10% de protéines non collagéniques), le reste étant composé d'eau.

La dentine est en contact étroit avec la pulpe par l'intermédiaire des prolongements cytoplasmiques des odontoblastes, logés dans des tubuli dentinaires. Ces tubuli s'étendent sur la presque totalité de l'épaisseur dentinaire, et représentent 10 à 30% de son volume (65 000-45 000/mm<sup>2</sup> dans le corps de la racine, 15 000-20 000/mm<sup>2</sup> au niveau apical), leur diamètre et leur nombre diminuent depuis la jonction pulpo-dentinaire jusqu'à l'émail (de 2,5 à 0,8 µm). Ils sont le siège de sécrétions de prédentine (visible sous la forme de matériel granulaire sur la Figure I-8) et de l'internalisation de résidus métaboliques.

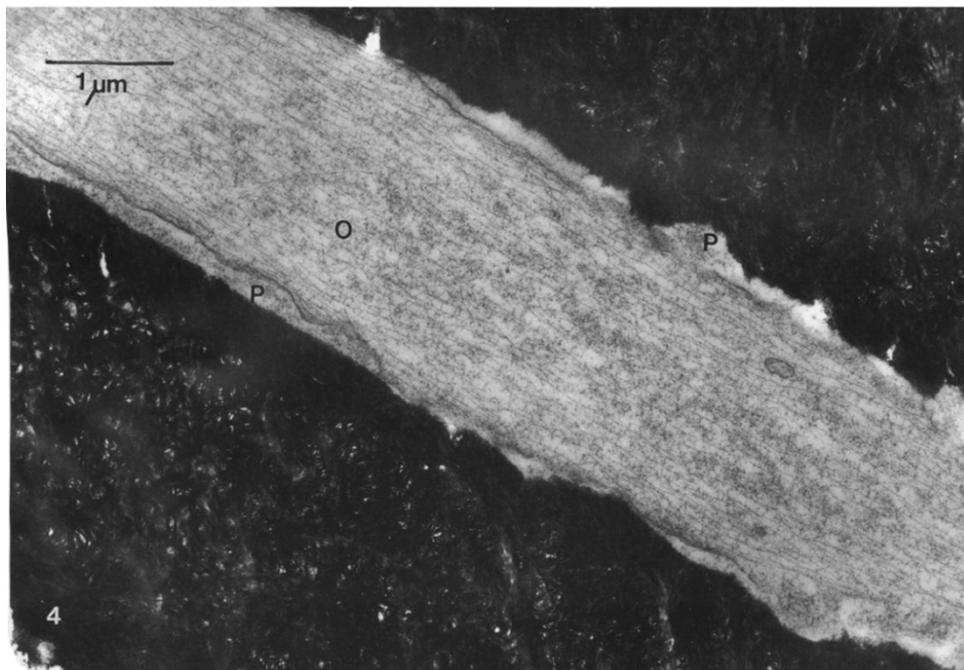


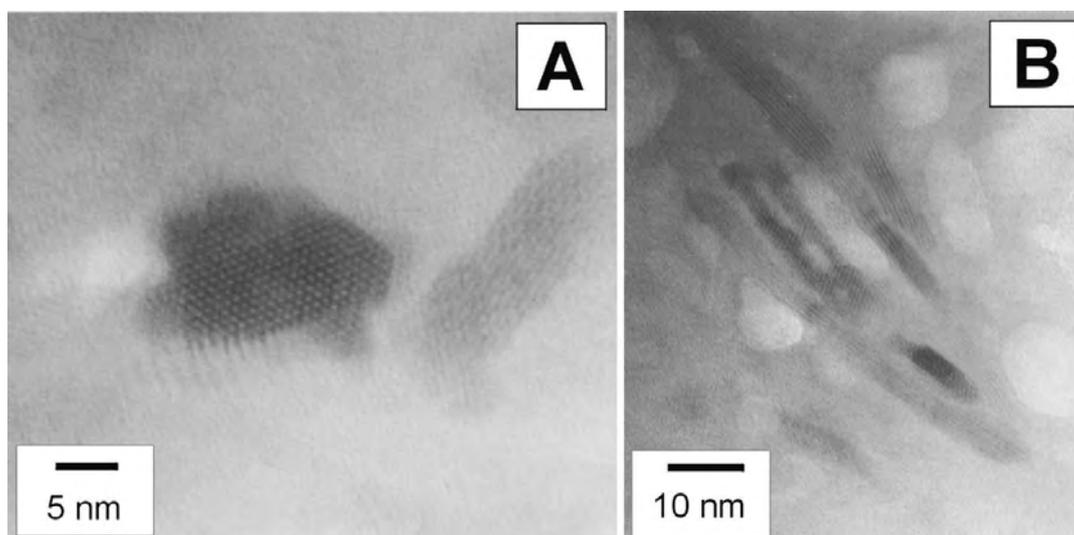
Figure I-8 Cliché TEM, agrandissement x20 000 d'une section longitudinale d'un tubule dentinaire au niveau du tiers interne (pulpaire) de la dentine radiculaire. Le prolongement odontoblastique, noté O, présente de nombreux microfilaments orientés selon l'axe du prolongement. Une petite mitochondrie est également visible. L'espace P représente l'espace périodontoblastique. D'après Frank et Steuer, 1988

Chaque tubule est entouré par une dentine hyperminéralisée, appelée dentine pérítubulaire, qui ne contient pas de collagène. Les compositions respectives des dentines pérítubulaires et intertubulaires figurent dans le Tableau I-4.

**Tableau I-4 Structure, composition et propriétés des principaux types de dentine, d'après Goldberg, 2008; Kinney et al., 2001; Weiner et al., 1999**

	Dentine intertubulaire	Dentine pérítubulaire
<b>Matrice protéique</b>	Collagène de type I (90%) Autres (10%)	Peu de collagène Autres phosphoprotéines (maille de 30 nm)
<b>Minéralisation</b>	70 % wt.	Plus minéralisée (entre 70-80%)
<b>Composition</b>	Apatite carbonatée et magnésiée Ca/P=1,59-1,61	Apatite plus carbonatée et magnésiée, Ca/P=1,49 Dissolution plus rapide en milieu acide
<b>Dimension moyenne cristallites</b>	60 nm de diamètre pour 2 à 5 nm d'épaisseur	
<b>Organisation</b>	Orientation de l'axe c perpendiculaire à l'axe des tubuli	Pas d'orientation préférentielle des cristallites

Les clichés HRTEM des cristallites dentinaires, visibles sur la Figure I-9, mettent en évidence un pourtour diffus, qui se distingue du cœur du cristal où l'organisation cristalline se présente sous la forme d'un alignement régulier de mailles. Cette zone sans motif cristallin visible peut être assignée aux environnements non-apatitiques de la couche hydratée.



**Figure I-9 Cliché HRTEM de cristallites individualisés d'apatite nanocristalline dentinaire. Orientation de l'axe c (A) perpendiculaire et (B) parallèle, au plan d'observation. (A) Section hexagonale d'une cristallite, faisant apparaître un alignement de 10-12 plan cristallins, espacés de 0,82 nm, dans l'épaisseur de la cristallite. En périphérie, la zone diffuse, sans motif cristallin, est attribuée à la couche hydratée. (B) Les cristallites peuvent atteindre plus de 80 nm de longueur selon l'axe c, pour une épaisseur de 10 à 15 nm (A). D'après (Sanchez-Navas et al., 2013)**

L'analyse SAXS de la dentine réalisée sur une coupe dentaire passant par la pulpe et par la jonction amélo-dentinaire a permis la mise en évidence d'une variation dans la forme des cristallites. Près de la pulpe, la forme est plutôt de type aciculaire, tandis qu'elle devient plus plate près de l'émail (Kinney *et al.* 2001).

La dentinogenèse est également un phénomène continu, qui ralentit en fonction de l'âge (Goldberg, 2008; Mount et Hume, 2002). L'apatite dentinaire est donc également sujette aux remaniements. L'observation a montré que le minéral dentinaire, par sa structure et sa composition, ressemble fortement à celui de l'os (Daculsi *et al.*, 1997).

### **3.1.2 Pulpe**

La pulpe est un tissu conjonctif lâche, de composition et structure semblables aux autres tissus conjonctifs de l'organisme. Elle assure la nutrition et la sensibilité de la dentine par l'apport du réseau vasculo-nerveux, et comble la cavité centrale de la dent qui s'étend depuis la couronne (chambre pulpaire) aux racines (canaux radiculaires). Les corps cellulaires des odontoblastes tapissent la face interne de la cavité pulpaire, sans être emmurés dans la matrice qu'ils sécrètent (la pré-dentine) à l'inverse des ostéoblastes et des cémentoblastes. A l'exception des fibroblastes, les autres cellules proviennent principalement du réseau vasculaire.

Le volume pulpaire n'est pas fixe. Avec l'âge, du fait de l'apposition de dentine secondaire et tertiaire, ce volume diminue voire disparaît dans les cas extrêmes. De même, la composition pulpaire change avec un enrichissement fibreux au détriment des éléments cellulaires nucléés qui peuvent représenter une source d'ADN (Grimoud *et al.*, 2004).

## **3.2 Cément**

Ce tissu conjonctif non vascularisé recouvre la dentine au niveau des racines : son épaisseur augmente d'environ 30  $\mu\text{m}$  à  $\sim 1$  mm, depuis la zone cervicale (collet) jusqu'aux apex (extrémités) des racines. Ce tissu accueille les fibres de Sharpey qui assurent l'ancrage de la dent à l'alvéole (ligament alvéolodentaire). Le cément est un tissu minéralisé parmi les plus mal caractérisés chez les Vertébrés. Sa fraction minérale est inférieure aux autres tissus durs (entre 55 et 65%) (Ho *et al.*, 2009; Stutz, 2002), avec une taille de cristallites voisine de celle de l'os. La partie organique du cément est composée de collagène de type I (21%), dont

les fibres sont tissées à la surface de la racine (Ho *et al.*, 2009). Les cémentoblastes se localisent au niveau du cément cellulaire qui occupe le tiers apical des racines et les furcations des dents pluriradiculées. Le cément peut être utilisé comme substrat pour l'extraction de l'ADN ancien, avec parfois de meilleurs résultats que pour la dentine (Adler *et al.*, 2011).

Avec l'âge, mais aussi en raison des maladies parodontales, les récessions de la gencive exposent le cément à un risque accru de caries, ce tissu étant moins résistant que l'émail au processus de déminéralisation.

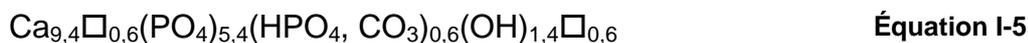
### **3.3 Email**

L'émail permet d'assurer la mastication. Ce tissu, tout en étant le plus dur de l'organisme, présente également une certaine élasticité. Sa dureté est comprise entre celle du fer et celle de l'acier ; elle est liée à l'importance de sa minéralisation agencée sous une forme cristalline à l'architecture complexe. L'élasticité, quant à elle, résulte de l'indépendance cristallographique d'un grand nombre de cristaux qui restent néanmoins en contacts étroits (Cole et Eastoe, 1988).

L'émail mature est composé de trois grandes phases : une phase minérale (inorganique) comptant pour 95% du poids contre seulement 1 à 2 % de matière organique sous forme de matrice protéique non collagénique. Le reste est constitué d'eau. L'observation microscopique met ainsi en lumière, au niveau de l'émail proprement dit, des cristaux organisés en bâtonnets, ou prismes. Ceux-ci sont entourés d'une gaine (gaine du prisme), et séparés par de l'émail interprismatique (voir Figure I-21). Les prismes sont des structures grossièrement cylindriques, de 4 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre, qui s'étendent en rangées plus ou moins superposées depuis l'émail de jonction jusqu'à la surface de la dent selon un trajet flexueux (en S). Cette organisation confère une grande résistance mécanique à l'émail (un exemple de conservation diagénétique du motif amélaire est visible sur la Figure I-21).

Le volume des cristallites amélares est d'ordre micronique, ce qui représente une augmentation d'un facteur  $10^3$  par rapport aux dimensions des cristallites osseux. Le minéral amélaire est constitué de phosphates de calcium, sous forme de cristaux d'hydroxyapatite dont la composition est proche de la stœchiométrie (Elliott, 1994). Ceci lui permet d'être plus stable thermodynamiquement que l'apatite osseuse ou dentinaire, et donc de mieux résister aux attaques acides de la flore bactérienne buccale. L'écart par rapport à la stœchiométrie résulte de l'incorporation relativement faible d'autres ions, principalement  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,

Mg<sup>2+</sup>, potassium K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>. Environ 30 % des groupements OH<sup>-</sup> sont substitués avec d'autres ions (F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) ; les carbonates, quant à eux, représentent 3 à 4% du poids du minéral amélaire, et se substituent principalement aux ions PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (Young, 1974). La formule générale de l'émail s'écrit (Équation I-5):



Ces modifications ont des conséquences sur les propriétés physico-chimiques de l'émail, dont les principales sont citées dans le Tableau I-5, en comparaison avec l'hydroxyapatite stœchiométrique.

**Tableau I-5 Caractéristiques physico-chimiques comparatives du minéral amélaire et de l'hydroxyapatite stœchiométrique, d'après McDowell *et al.*, 1977; Simmer et Fincham, 1995**

	Email dentaire	Hydroxyapatite
Groupe d'espace	P6 <sub>3</sub> /m	P6 <sub>3</sub> /m
Composition chimique	Légèrement non stœchiométrique	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>
Produit de solubilité K <sub>SP</sub>	K <sub>SP</sub> = 11x10 <sup>-110</sup>	K <sub>SP</sub> ~ 10 <sup>-118</sup>
Rapport Ca/P	Ca/P = 1,62	Ca/P = 1,67
Paramètres de maille cristalline	a = 9.418 Å c = 6.884 Å	a = 9.432 Å c = 6.881 Å

### 3.4 Substrat dentaire d'ADN ancien

Avec le recul, la dent s'avère être le substrat le plus résistant et le plus apte à fournir des échantillons d'ADN ancien humain, en termes de quantité et de qualité (Adler *et al.*, 2011; Higgins et Austin, 2013; Mundorff et Davoren, 2014; Rohland et Hofreiter, 2007). Pour exemple, les travaux de S. Amory (2007) fournissent des données quantitatives de l'analyse d'ADN ancien issu de différents tissus (os, cheveux, dents). Les résultats de cette étude indiquent que, dans des conditions taphonomiques identiques et favorables (*permafrost*), ce sont les dents qui permettent d'obtenir les extraits d'ADN les plus concentrés<sup>7</sup>, et les moins

<sup>7</sup> 89% des extraits dentaires ont montré une concentration d'ADN supérieure à 100 pg/μL contre 38% pour les échantillons osseux et 27% pour les cheveux

dégradés<sup>8</sup>. L'incidence des substances inhibitrices de la PCR co-extraites avec l'ADN paraît également réduite par rapport à l'os.

Cependant, les racines peuvent constituer une voie de contamination possible (Grimoud *et al.*, 2004) en raison :

- de la porosité du ciment, par rapport à celle de l'émail, bien que le ciment ait pu parfois montrer un rendement en ADN ancien meilleur que les autres tissus dentaires (Adler *et al.*, 2011)
- des tubuli dentinaires (Adler *et al.*, 2011)
- de la présence des canaux pulpaire principaux et accessoires
- des lésions *ante mortem* (caries, fractures, usures) ou *post mortem* (cassures, ouvertures des canaux).

Parmi les méthodes utilisées pour le recueil de l'ADN d'origine dentaire, les plus courantes sont le broyage intégral de la dent ou la section – horizontale ou longitudinale – de la dent suivie de la récupération du matériel présent dans la cavité pulpaire, à l'aide d'une pointe rotative ou d'un scalpel (Calvo *et al.*, 2001; Keyser-Tracqui et Ludes, 2005; Lacan, 2011; Rudbeck *et al.*, 2005; Tran-Hung *et al.*, 2007). La méthode de section dentaire permet la reconstitution de la dent pour préserver une partie de l'information anatomique et donne de bons résultats quantitatifs et qualitatifs dans l'extraction d'ADN ancien. Dans le cas d'un recueil exclusivement pulpaire, l'étape de décalcification préalable n'est pas nécessaire, ce qui limite la co-extraction de substances inhibitrices. Cependant, la méthode de broyage total génère une quantité plus importante de matériel génétique pouvant être amplifié (Baker *et al.*, 2001; Lacan, 2011). Ce dernier résultat peut être mis sur le compte de l'adsorption possible de fragments d'ADN à la matrice minérale dentinaire, soit directement au niveau des tubuli (ADN provenant des mitochondries du prolongement odontoblastique), soit par diffusion *post mortem* des molécules dans les fluides environnants (Higgins et Austin, 2013). Cependant, l'effet délétère sur l'ADN des instruments rotatifs, utilisés pour la section ou le recueil du tissu pulpaire, a été mis en évidence pour des vitesses de rotation rapides (Adler *et al.*, 2011), ce qui peut également compromettre l'efficacité du recueil intrapulpaire direct.

---

<sup>8</sup> L'efficacité de typage est proche de 100%, en incluant des marqueurs de grande taille (300-400pb). La taille des fragments d'ADN extraits à partir de dents semble donc supérieure à celle habituellement rencontrée (250 pb)

#### **4 Remarques conclusives**

L'association organo-minérale intime qui siège dans les tissus minéralisés cellulaires complique l'investigation détaillée des différents composants de ces tissus, de leur agencement et de la nature de leurs interactions. Le terme « nanocomposite » est parfois utilisé lors de l'étude de l'interaction du minéral osseux avec les ions citrate (Hu Y.-Y *et al.* 2010). Cependant les composantes organique et minérale suivent des voies métaboliques et diagénétiques relativement distinctes, respectivement du vivant de l'organisme et après sa mort.

Compte tenu de l'impossibilité de disposer d'une apatite nanocristalline biologique (osseuse ou dentinaire) purifiée – après élimination des composants organiques – sans altérer profondément ses propriétés, la synthèse d'une apatite qui mime les caractéristiques physico-chimiques des apatites biologiques ouvre des perspectives particulièrement intéressantes pour l'étude des interactions du minéral avec d'autres molécules organiques (protéines, ADN...).

En plus des éléments physico-chimiques concrets en faveur d'une interaction ADN-apatite, la prépondérance de la fraction minérale (60-70%) dans les tissus durs, même les plus riches en cellules, fait de l'apatite une cible privilégiée pour l'étude des substrats d'ADN ancien d'origine squelettique.

## **B MODELES SYNTHETIQUES DES MINERALISATIONS BIOLOGIQUES ET BIOMIMETISME**

La diversité des structures des tissus minéralisés est depuis longtemps décrite grâce aux méthodes histologiques puis elle l'a été grâce à la diffraction des rayons X. Ainsi l'identification d'une structure de type apatitique de type  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  a été effectuée très tôt dans les os et dans les dents (Basset, 1917; Bowes et Murray, 1935). Cependant, la composition chimique a rapidement révélé une grande variabilité dans les proportions des trois composants majeurs (calcium, phosphate et carbonate) selon la nature, la localisation, l'âge ou le type de tissu, ce qui a pu parfois mener à l'identification erronée de plusieurs types de phosphates de calcium (ex. phosphate tricalcique ou whitlockite, phosphate octocalcique, carbonate de calcium) (Bowes et Murray, 1935; Meinke *et al.*, 1979; Montel *et al.*, 1980). Les sels de calcium de l'acide orthophosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) présentent en effet diverses compositions chimiques et des structures cristallines très variées. Le modèle qui incluait dans l'os un mélange d'une phase apatitique stœchiométrique et de phases additionnelles a par la suite été abandonné au profit de l'identification et la caractérisation d'un minéral apatitique non stœchiométrique et « faiblement » cristallisé, ayant une grande capacité d'évolution et d'adaptation (Elliott, 1994; Glimcher, 1987; Rey *et al.*, 1989). Cette flexibilité, qui s'exprime notamment sous la forme de la variation du rapport Ca/P et de l'incorporation d'ions  $\text{HPO}_4^{3-}$  et  $\text{CO}_3^{2-}$ , a été prise en compte au sein d'un modèle unifié d'apatite phosphocalcique non stœchiométrique, métastable.

La préparation d'analogues de synthèse de ce type d'apatite est relativement aisée et peut, par exemple, se faire par précipitation directe dans des domaines de concentration ionique, de température et de pH assez larges (Drouet, 2013; Posner *et al.*, 1975; Rey *et al.*, 1995; Roveri et Iafisco, 2011). Cependant une fois formé, le réseau cristallin évolue spontanément, en solution, vers la stœchiométrie (Eichert, 2001; Rey *et al.*, 1995; Rollin-Martinet *et al.*, 2013). C'est pourquoi cette forme d'apatite nanocristalline est celle qui compose l'os et la dentine - dont le métabolisme phosphocalcique se poursuit tout au long de la vie par le biais d'un remaniement.

## 1 Synthèse d'analogues biomimétiques

Il est possible de synthétiser des apatites dites « analogues » au minéral osseux/dentinaire, qui présentent une structure, microstructure composition qui en sont proches. De tels analogues peuvent présenter, à la demande, différents états de maturation afin de mimer un biominéral apatitique « jeune » ou plus mature. Il est bien entendu également possible d'obtenir une forme proche de l'hydroxyapatite stœchiométrique afin de se rapprocher plus des caractéristiques de l'émail dentaire. Que la synthèse soit effectuée en présence ou en absence de carbonates, les diagrammes de diffraction des rayons X indiquent systématiquement une phase unique de nature apatitique.

Nous avons dans ce travail synthétisé plusieurs composés visant une analogie au minéral osseux/dentinaire :

### Synthèse en absence de carbonates:

L'apatite nanocristalline de synthèse non carbonatée (notée hap) a été préparée par précipitation, à température ambiante et à un pH de 7.2 (proche du pH physiologique grâce à un excès d'ions phosphates), entre une solution d'un sel de calcium (solution 1) et une solution d'un sel de phosphate (solution 2). Pour obtenir environ 25 grammes de poudre d'apatite, les solutions sont composées comme suit :

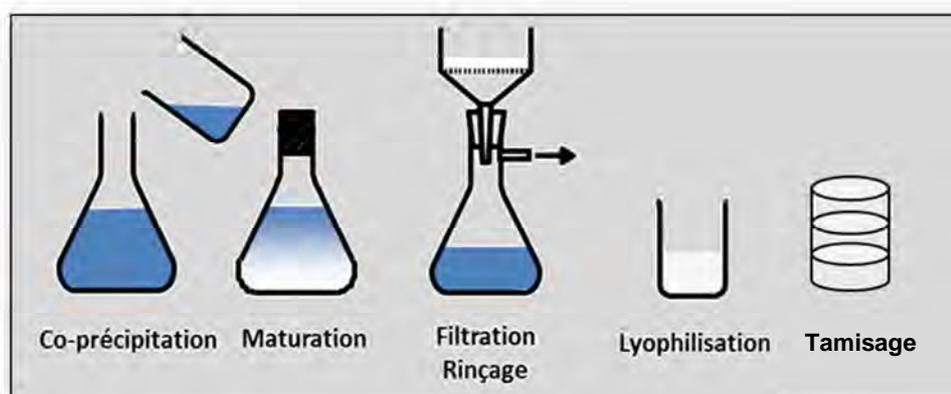
- Solution 1 (cationique) : 52,2 g de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  dans 750 mL d'eau
- Solution 2 (solution anionique): 120 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  dans 1500 mL d'eau

### Synthèse en présence de carbonates:

Les apatites biologiques sont carbonatées, bien que les formes immatures néoformées le soient peu. Sans que la nature exacte de cette substitution soit élucidée dans tous les cas, entre les substitutions de type A (en site anionique monovalent) ou de type B (en site anionique trivalent) (Wopenka et Pasteris, 2005), la substitution en sites B demeurent préférentielle dans les apatites biologiques. Des analogues de synthèse carbonatés (notés hac), dont l'incorporation des ions  $\text{CO}_3^{2-}$  se fait aussi préférentiellement en site B, peuvent être préparés en utilisant le même principe que précédemment mais en incorporant dans la solution 2 (qui devient 2') une quantité déterminée d'ions carbonate, telle que :

- Solution 2' : 90 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 90 g de  $\text{NaHCO}_3$  dans 1500 mL d'eau

Dans les deux cas, la solution 1 est versée rapidement dans la solution 2 (voir Figure I-10). Comme indiqué précédemment, cette dernière comporte un excès d'ions phosphates permettant d'exploiter le pouvoir tampon du couple d'ions  $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$  à un pH 7,2 très proche du pH physiologique. Le mélange est fortement agité pendant quelques instants. Le temps d'incubation du milieu de précipitation, à température ambiante, sans agitation et dans un récipient hermétique (pour éviter le dégagement ou l'incorporation de  $\text{CO}_2$ ), dépend du degré de maturation souhaitée. Nous avons synthétisé dans cette étude des cristaux d'apatite métastables mais avec un degré de maturation suffisant (1 semaine) pour négliger l'influence de la maturation en milieu aqueux qui peut se produire lors de nos expériences. Par ailleurs, cette apatite présente, comme nous le montrerons, des caractéristiques proches de celles d'une apatite biologique « moyenne ».



**Figure I-10 Représentation schématique de la synthèse d'apatite nanocristalline biomimétique (Equipe PPB, CIRIMAT)**

La maturation s'arrête avec la filtration du précipité, suivi de son lavage abondant à l'eau déionisée pour éliminer les ions phosphate en excès, ainsi que les contre-ions solubles de la solution de précipitation (voir Figure I-10). Les contre-ions ammonium et nitrate ont été choisis en raison de leur faible impact sur la phase apatitique. Le rayon ionique des ions ammonium  $\text{NH}_4^+$ , et la faible charge des ions nitrate  $\text{NO}_3^-$ , ne les prédisposent pas à être incorporés durablement dans la structure cristalline, ou à être simplement retenus par interaction ionique en surface des cristaux. L'ion sodium  $\text{Na}^+$  a par ailleurs été sélectionné comme contre-ion de l'ion bicarbonate, de préférence au contre-ion ammonium, compte tenu de la possible formation de carbamate dans ce dernier cas. Les ions  $\text{Na}^+$  sont susceptibles

d'être incorporés dans la structure, mais ce phénomène est mineur et reflète également une réalité biologique.

Le gel a été ensuite lyophilisé pendant 3 jours pour faire cesser toute maturation (voir Figure I-10). La poudre très fine obtenue a été ensuite systématiquement stockée au congélateur afin de conserver sa réactivité et éviter toute évolution vers des états mieux cristallisés.

#### Hydroxyapatite stœchiométrique :

Une hydroxyapatite de référence (HAp) a été synthétisée au laboratoire, également par précipitation à partir d'une source d'ions calcium et phosphates et en milieu alcalin. La précipitation s'effectue en ajoutant progressivement une solution ammoniacquée de phosphate d'ammonium, à une solution de nitrate de calcium, portée à ébullition. La réaction théorique de précipitation de l'HAp s'écrit :



L'analyse chimique a montré que le composé obtenu était légèrement sous-stœchiométrique (Ca/P~1,64). Ce composé a servi de référence lors de la caractérisation physico-chimique des composés nanocristallins non stœchiométriques.

## **2 Caractérisation physico-chimique**

Une série de techniques de caractérisation physico-chimique doit être mise en œuvre pour apporter des éléments quantitatifs et qualitatifs concrets susceptibles de montrer les analogies de structure, de taille et de composition chimique des apatites de synthèse, par rapport au minéral osseux et dentinaire (Drouet, 2013). Un tableau non exhaustif des techniques disponibles pour la caractérisation du minéral osseux et dentaire et de leurs analogues est représenté sur la Figure I-11.

Morphologie, structure	Autres propriétés de surface		BET (surface spécifique)	Potentiel zêta
	Microscopie	AFM	Contraste topographique, conformation moléculaire	
		HRTEM	Association organo-minérale, taille des cristallites	
	Diffraction Diffusion	SAXS*	Organisation spatiale et dimension des cristallites	
		DRX	Phase(s) cristalline(s), dimension des cristallites	
Composition chimique	Liaisons chimiques	Spectroscopie vibrationnelles	FTIR*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phase minérale :                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• environnements ioniques apatitiques, non apatitiques</li> <li>• carbonatation</li> </ul> </li> <li>• Phase organique :                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• collagène</li> <li>• éléments adsorbés (ADN)</li> </ul> </li> </ul>
			Raman*	
		Spectroscopie RMN		
		Dosage	Ca, P, CO <sub>3</sub> : stœchiométrie, carbonatation	
Eléments chimiques	MEB-EDX*	Eléments traces, contamination organique		
	ATG/ATD	Eau (adsorbée, interstitielle, structurale...), composés organiques et inorganiques		

**Figure I-11** Résumé des techniques de caractérisation du minéral osseux/dentaire et de leurs analogues utilisées au cours de ce travail (en gris), et des techniques présentées en perspectives (en blanc). Les techniques où figure un astérisque sont susceptibles d'être utilisées en microscopie, pour recueillir des indications topographiques (cartographie IR, cartographie Raman)

## 2.1 Diffraction des rayons X

Les diffractogrammes X obtenus pour les composés que nous avons synthétisés, à savoir une apatite nanocristalline carbonatée (hac S4) et non carbonatée (hap S3), sont compilés sur la Figure I-12. Ils montrent des raies relativement larges et mal définies, en comparaison au diagramme de l'hydroxyapatite stœchiométrique, reporté en Figure I-13. Cette faible résolution est caractéristique des états de faible cristallinité, de manière analogue à des travaux précédents (Vandecandelaere *et al.*, 2012) ayant montré que cette faible cristallinité pouvait être reliée à la taille nanométrique des cristallites et à un désordre cristallin du cœur

apatitique non stœchiométrique des cristaux. L'indexation des pics de diffraction obtenus après analyse des composés synthétisés permet néanmoins d'identifier la structure cristalline comme appartenant au groupe des apatites, qui cristallisent dans le système hexagonal  $P6_3/m$  (JCPDS, 9-432). Aucune phase secondaire ne peut être mise en évidence, que ce soit pour les apatites biologiques ou pour les composés de synthèse.

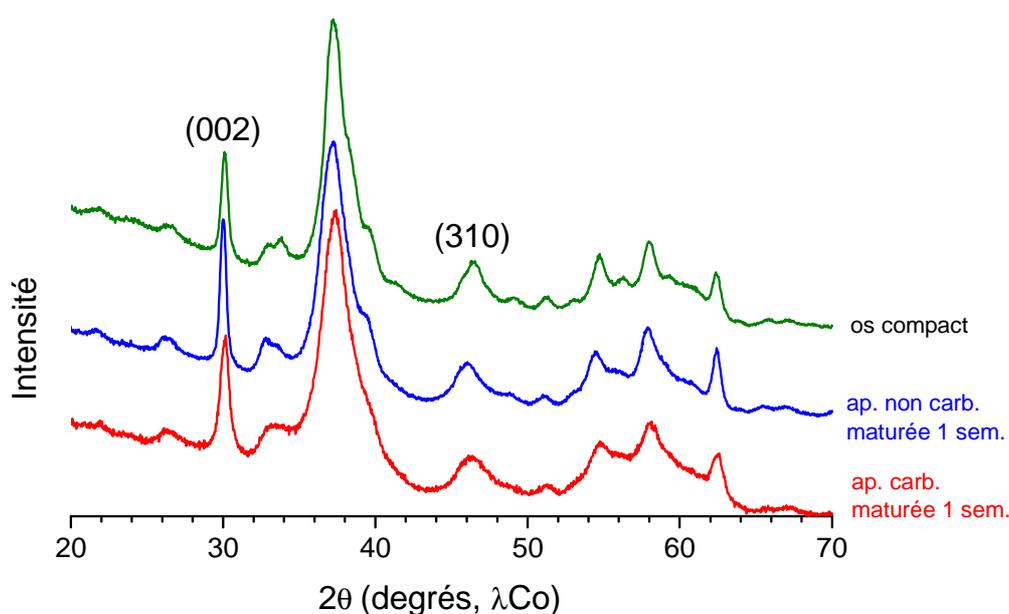


Figure I-12 Diagrammes de diffraction aux rayons X d'un os compact humain (vert) et des apatites nanocristallines de synthèse biomimétiques maturées 1 semaine : apatite carbonatée (hac S4, rouge) ; apatite non carbonatée synthétisée (hap S3, bleue) (anticathode au cobalt) (JCPDS, 9-432)

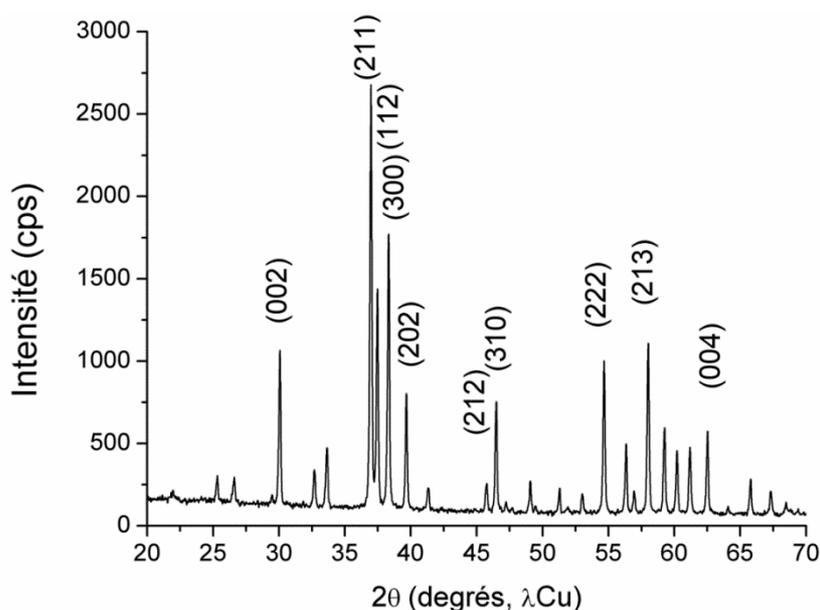


Figure I-13 Diffractogramme d'une hydroxyapatite stœchiométrique de synthèse calcinée (anticathode au cuivre) (JCPDS, 9-432)

A temps de maturation équivalent, l'apatite carbonatée (hacS4) apparaît moins bien cristallisée, ce qui s'explique par la présence des carbonates. Ceux-ci inhibent le phénomène de maturation qui se déroule spontanément en faveur d'une augmentation de l'organisation cristalline du composé apatitique.

Cette caractérisation fait aussi apparaître que de telles apatites synthétiques obtenues avec un temps de maturation d'une semaine, sont très proches cristallographiquement parlant des caractéristiques d'un échantillon d'os compact humain (homme, 57 ans).

Les dimensions apparentes des cristallites, que la formule de Scherrer (Scherrer, 1918, voir méthode en Annexe A) permet d'estimer en particulier sur la base des raies (002) et (310), sont nanométriques et résumées dans le Tableau I-6. Toutefois, pour des phosphates de calcium de faible cristallinité, un degré d'incertitude dans cette estimation résulte de la largeur et de la dissymétrie des raies (Cazalbou, 2000). La largeur à mi-hauteur de ces raies fournit des indications sur les dimensions des cristallites selon l'axe  $c$  pour la (002), et selon une direction perpendiculaire à celle-ci pour la (310). Bien qu'approximative, cette estimation permet d'accéder à une évaluation de la taille des cristallites constitutives de l'échantillon et de mettre en évidence le caractère allongé des cristallites le long de l'axe  $c$  de la maille cristalline apatitique, avec un rapport entre la longueur moyenne et une largeur moyenne qui se situe aux alentours de 3,5 pour l'ensemble des composés (entre 2,8-3,8). Une morphologie en nanoplaquettes a en effet pu être confirmée précédemment par l'observation de clichés en microscopie électronique en transmission sur des composés similaires (Pascaud *et al.*, 2013; Vandecandelaere *et al.*, 2012).

**Tableau I-6 Dimensions apparentes (selon équation de Scherrer) des cristallites d'apatites utilisées dans cette étude, en comparaison aux dimensions d'une apatite biologique (os compact, fémur, homme 57 ans)**

Echantillon	L(002) Å	L(310) Å	L(002)/L(310)
Os compact humain	201	72	2,8
hapS3	223	59	3,76
hacS4	157	49	3,21

L'inhibition de la maturation en présence de carbonates tend à diminuer les dimensions des cristallites. Ce phénomène est plus marqué selon l'axe  $c$ , qui est considéré comme l'axe préférentiel de croissance cristalline des apatites biomimétiques comme des apatites

biologiques (Elliott, 1994; Glimcher, 1987; Okazaki *et al.*, 2001). Notons que l'épaisseur de la couche hydratée non apatitique en surface des cristaux n'est pas prise en compte dans cette estimation qui se fonde uniquement sur les domaines cristallins bien ordonnés contenus dans le cœur apatitique des cristaux. La taille des cristallites pourrait donc être sous-estimée.

## 2.2 Analyses chimiques

Les résultats des dosages du calcium, des phosphates (sous forme d'ions  $\text{PO}_4^{3-}$  ou d'ions  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) et des carbonates sont résumés dans le Tableau I-7. Ces dosages permettent en premier lieu de recueillir des éléments sur la stœchiométrie des échantillons, par la comparaison du rapport Ca/P (ou Ca/(P+C) en cas d'apatites carbonatées) avec celui de l'hydroxyapatite stœchiométrique.

A l'exception des carbonates, les ions ont été dosés dans une solution-mère qui a été préparée à partir d'une quantité connue, soit de poudre d'apatite, soit d'os réduit en poudre après cryobroyage, en fonction de l'échantillon à analyser. Dans ce dernier cas, on retranche à notre masse initiale la quantité de matière organique que l'on a récupérée et pesée après filtration. En première approximation, on considère cette matière organique entièrement insoluble en milieu acide, en raison de la fraction importante du collagène.

**Tableau I-7 Composition chimique globale des échantillons d'apatites synthétiques utilisées dans cette étude, comparée à un échantillon d'apatite biologique extrait d'un os compact humain (homme, 57 ans)**

Echantillons	Calcium (%wt.) $\pm 0,5$	Phosphore (% wt.) $\pm 0,5$	Carbonates (% wt.) $\pm 1$	Ca/P	Ca/(P+C)
Os compact	39,42	17,73	3,2	1,72	<b>1,57</b>
hap S3	34,76	19,26	-	<b>1,40</b>	-
hac S4	33,2	16,6	3,6	1,56	<b>1,36</b>

Les données quantitatives issues de ces analyses chimiques sont en accord avec les données de la littérature sur la composition des apatites biologiques (apatites carbonatées). Un taux de carbonatation bien supérieur à celui observé pour l'échantillon d'os et pour les apatites de synthèse, peut néanmoins être reporté (~7% dans Roveri et Iafisco, 2011, entre 4 et 7% dans Iyengar et Tandon, 1999, 7,4% dans Kolmas *et al.*, 2007, 4-6% dans Leventouri, 2006). Cependant, un consensus est établi au sujet de la grande variabilité du taux de

carbonatation (Dorozhkin, 2009), en fonction notamment de l'âge du cristal (biologique ou synthétique) à l'instant de l'échantillonnage. Il en est de même pour la composition en ions  $\text{HPO}_4^{2-}$  d'une apatite nanocristalline. Ces deux espèces ( $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{CO}_3^{2-}$ ) peuvent être présentes à la surface des nanocristaux au sein d'environnements chimiques non apatitiques, et sont susceptibles d'être échangées en fonction de la composition du milieu environnant.

### 2.3 Analyse spectroscopique vibrationnelle

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permet d'apporter des informations sur les environnements chimiques des groupements moléculaires d'après les modalités de vibrations des liaisons interatomiques qui les composent et qui absorbent dans le domaine de l'infrarouge. Ces connaissances proviennent de travaux antérieurs sur la caractérisation infrarouge de nombreux phosphates de calcium de synthèse et de biominéraux (Boskey et Mendelsohn, 2005; Eanes et Meyer, 1977; Montel *et al.*, 1980; Paschalis *et al.*, 1997; Rey *et al.*, 1991, 1990, 1989).

Les groupements appartenant à la structure de l'apatite, qu'elle soit naturelle ou synthétique, peuvent être directement mis en évidence sur les spectres ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$  dans une moindre mesure), comme illustré sur la Figure I-14. La mise en évidence des environnements chimiques non apatitiques de surface (labiles) est également possible par FTIR, notamment par l'observation d'épaulements dans les domaines  $\nu_3(\text{PO}_4)$ ,  $\nu_4(\text{PO}_4)$ ,  $\nu_2(\text{CO}_3)$  et  $\nu_3(\text{CO}_3)$ , qui viennent s'ajouter aux caractéristiques purement apatitiques. Un post-traitement du spectre peut s'avérer particulièrement intéressant afin d'explorer plus avant les données spectrales, et ce principalement via deux méthodes : l'*apodisation* (ou déconvolution spectrale) (Rey *et al.*, 1991, 1990), surtout utilisée pour décortiquer le domaine spectral  $\nu_3(\text{PO}_4)$  qui est particulièrement complexe, et le *curve-fitting* (que l'on peut traduire par « ajustement de courbe » ou décomposition spectrale), qui est en particulier utilisé pour étudier les domaines spectraux  $\nu_4(\text{PO}_4)$  (Vandecandelaere *et al.*, 2012) ou encore  $\nu_2(\text{CO}_3)$  et  $\nu_3(\text{CO}_3)$ . Dans le cas des échantillons biologiques, en raison de la présence de matière organique (principalement collagénique, voir Figure I-14), un troisième traitement de soustraction spectrale du spectre IR du collagène s'avère nécessaire afin de s'affranchir des bandes amides qui se superposent principalement au niveau de certaines bandes attribuées aux carbonates.

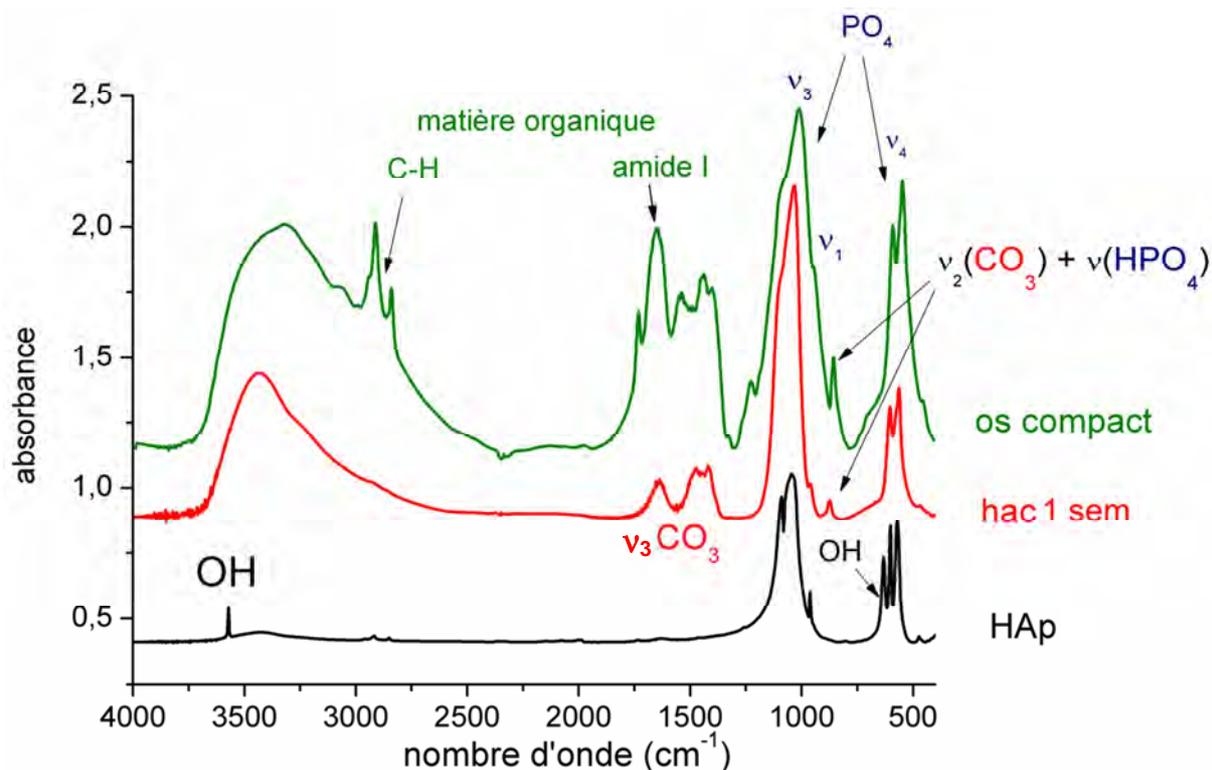


Figure I-14 Spectre infrarouge et indication des principaux groupements. Os compact humain (vert), apatite nanocristalline carbonatée hac S4 (rouge) et hydroxyapatite stœchiométrique (noir)

L'attribution des bandes de vibration des groupements qui constituent les composés apatitiques synthétiques et biologiques, est résumée dans le Tableau I-8.

Tableau I-8 Position, intensité relative et attributions des bandes IR dans le domaine 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  pour des composés apatitiques naturels (apatite et matière organique) et synthétiques (apatite seule)

Positions des bandes (et intensité)	Attribution ( $\text{cm}^{-1}$ )	Type de vibration
<b>I <math>\text{PO}_4^{3-}</math> apatitiques</b>		
$v_3$ (forte)	deux pics à 1045 et 1090	élongation antisymétrique
$v_1$ (faible)	pic unique à 962	élongation symétrique
$v_4$ (forte)	– deux pics à 601 et 560 – un épaulement à 575	déformation angulaire
$v_2$ (faible)	un pic unique à 470	déformation angulaire
<b>II <math>\text{CO}_3^{2-}</math> apatitiques</b>		
$v_3$ (forte) type B	pic à 1415	vibration $\text{CO}_3$ et $\text{HPO}_4$
type A et B	pic à 1450-1475	
type A	pic à 1540	
$v_2$ (faible)	pic à 870	
<b>III <math>\text{HPO}_4^{2-}</math> apatitiques</b>		
$v(\text{HPO}_4^{2-})$ (faible)	pic à 870	élongation de P-OH
autres	épaulement à 1145 et 550	

<b>IV OH apatitiques</b>		
$\nu_L(\text{OH})$ (fort)	630	libration
$\nu_s(\text{OH})$ (faible)	3570	étirement ( <i>stretching</i> )
<b>V Matière organique</b>		
<b>a. Collagène</b>		
amide I, II et III (fort)	1655, 1545 et 1240	
$\delta\text{CH}_2/\text{CH}_3$ (faible)	1500-1400	cisaillement
hydroxyproline (faible)	815-630	vibration C-O
<b>b. Autres</b>		
C-H (fort)	deux pics fins à 2915 et 2850	étirement

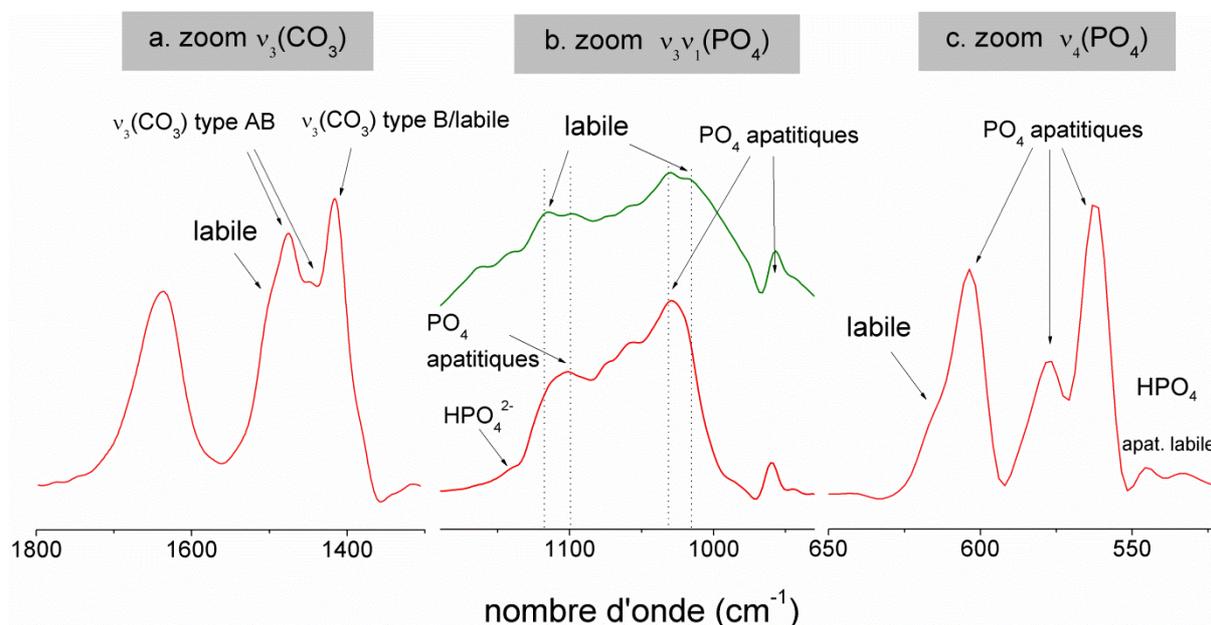
Il est intéressant de noter que les bandes attribuées aux ions  $\text{OH}^-$  (donc purement apatitiques) ne sont pas visibles sur le spectre hac S4, alors qu'ils sont visibles en tant que bandes bien individualisées sur le spectre de l'hydroxyapatite. Cet état est caractéristique des apatites non stœchiométriques, souvent lacunaires en site anionique monovalent pour compenser les lacunes cationiques et la substitution des ions  $\text{PO}_4^{3-}$  par des ions  $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{CO}_3^{2-}$ .

La complexité du spectre IR des apatites lacunaires augmente, par rapport à celui de l'HAp stœchiométrique, avec la présence de bandes de vibration additionnelles liées aux environnements chimiques non apatitiques dits « labiles ». Ces groupements carbonate, phosphate et hydrogénophosphate labiles sont présents au sein de la couche hydratée et disparaissent avec la maturation du composé. Ces bandes sont parfois visibles sous la forme d'un épaulement, accentué à l'aide du traitement par apodisation, comme l'illustre la Figure I-15 pour l'apatite hac S4, en ajustant les paramètres  $\rho$  (largeur du pied de bande) et  $k$  (amélioration) selon Rey *et al.* (1990, 1991).

Les ions  $\text{CO}_3^{2-}$  labiles sont détectables en tant que contributions au domaine  $\nu_3(\text{CO}_3)$  vers 1415 et 1480  $\text{cm}^{-1}$ .

Les ions  $\text{PO}_4^{3-}$  labiles peuvent être visibles sous la forme d'un épaulement au domaine  $\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$  et  $\nu_4(\text{PO}_4)$ , respectivement vers 1110 et 617  $\text{cm}^{-1}$  sur le spectre de l'apatite biomimétique. D'après les données de la littérature, l'investigation du domaine  $\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$  d'un spectre d'apatite biologique permet d'identifier deux groupements attribuables aux ions phosphates labiles à 1110 et 1020  $\text{cm}^{-1}$ . Le comportement différentiel de l'évolution du domaine  $\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$  en fonction de l'âge des cristallites des apatites synthétiques, par rapport aux apatites d'origine osseuse ou amélaire, a déjà été observé et rend compte d'une réalité

biologique complexe. Néanmoins, la présence d'un maximum à  $1020\text{ cm}^{-1}$  peut être mise en évidence après dissolution partielle à l'EDTA de composé synthétique (Rey *et al.*, 1991).



**Figure I-15 Zoom sur les principaux domaines des phosphates et des carbonates et mise en évidence de groupements apatitiques et labiles après traitement du spectre de l'apatite hacS4 (rouge) et d'un os compact humain (vert) par apodisation de Happ-Genzel**

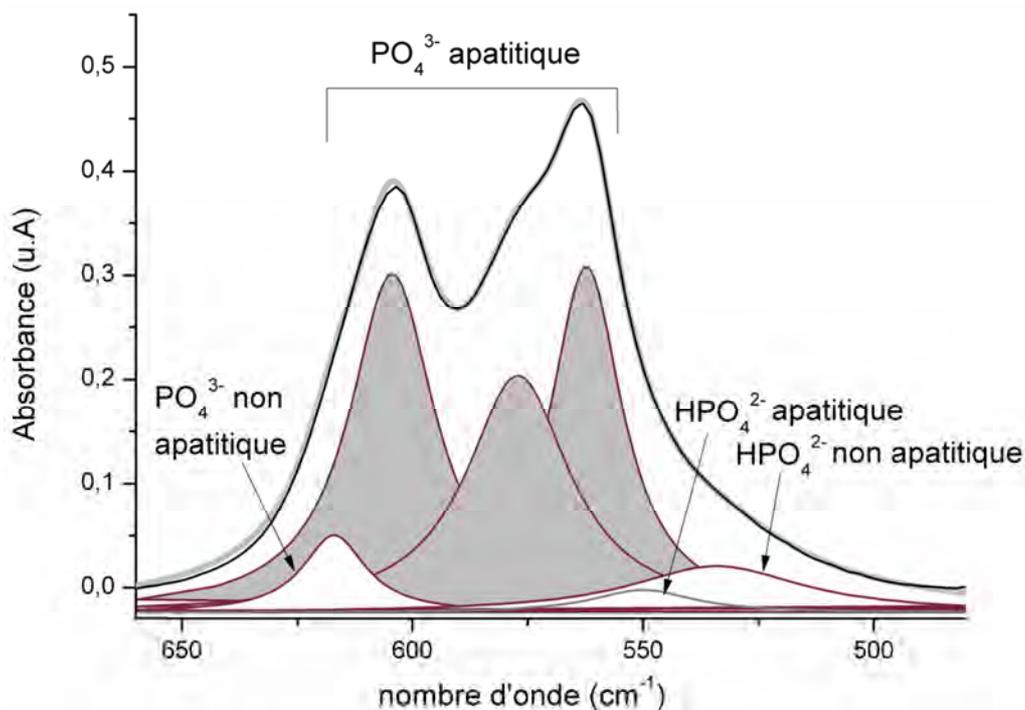
En revanche, les ions  $\text{HPO}_4^{2-}$  labiles ne peuvent être quantifiés qu'en procédant à une décomposition spectrale du domaine  $\nu_4(\text{PO}_4)$ , alors que la  $\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$  se prête mal à ce traitement, en raison des nombreuses contributions à l'intérieur de cette bande. La décomposition spectrale du domaine  $\nu_4$  des phosphates, dans le domaine  $800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ , permet de mettre en évidence la contribution relative des différents groupements apatitiques et non-apatitiques à l'intérieur de ce domaine, par l'ajustement de raies de positions connues (Cazalbou, 2000; Eichert, 2001; Vandecandelaere *et al.*, 2012). Les différentes bandes constitutives du domaine  $\nu_4(\text{PO}_4)$  sont résumées dans le Tableau I-9.

La décomposition spectrale de l'apatite carbonatée hac S4 maturée 1 semaine nous a permis de mettre en évidence l'absence d'ions  $\text{OH}^-$  détectable par cette technique, ce qui caractérise la non-stœchiométrie de l'apatite nanocristalline, ainsi que la présence d'environnements non apatitiques sous la forme d'ions  $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  labiles, représentés sur la Figure I-16.

**Tableau I-9 Attribution et position des bandes de vibration infrarouge dans le domaine 800-400  $\text{cm}^{-1}$**

Nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ )	Attribution des bandes	Intensité
470	$\nu_2(\text{PO}_4^{3-})$	faible, bien individualisée
530–534	$\text{HPO}_4^{2-}$ non apatitique	assez intense
550	$\text{HPO}_4^{2-}$ apatitique	assez intense
560		
575	$\text{PO}_4^{3-}$ apatitique	intense
601		
617	$\text{PO}_4^{3-}$ non apatitique	faible
631	$\nu_L(\text{OH})$	faible voire absent
670	$\text{H}_2\text{O}$ libration	accessoire

Notons que cette méthode est classiquement réalisée sur des apatites synthétiques. L'application de cette méthode à des apatites biologiques a permis dans cette thèse le recueil d'informations quantitatives sur la proportion de différentes espèces ioniques au sein d'échantillons osseux et dentaires plus ou moins anciens (voir section C5). A notre connaissance, il s'agit là de la première utilisation systématique de cette technique d'exploitation spectrale sur de tels échantillons biologiques.



**Figure I-16 Décomposition spectrale de la bande  $\nu_4(\text{PO}_4)$  du spectre FTIR de l'apatite hac S4. Ligne grise épaisse : résultat global du *curve-fitting*. Ligne noire fine : données FTIR.**

## 2.4 Mesures de surface spécifique

Les surfaces spécifiques des apatites biomimétiques utilisées pour les expériences d'adsorption, ayant toute subi une maturation d'une semaine, ont été mesurées à l'aide de la méthode Brunauer Emmett Teller, et sont reportées dans le Tableau I-10. Auparavant, les poudres ont été tamisées afin de recueillir une fraction granulométrique comprise entre 100 et 200  $\mu\text{m}$  (fraction la plus abondante) dans le but de limiter la variabilité du comportement de l'ADN lors de l'adsorption, variabilité liée à la taille des agrégats cristallins.

**Tableau I-10 Surfaces spécifiques des apatites synthétiques**

Type d'échantillon	Granulométrie ( $\mu\text{m}$ )	Surface spécifique ( $\text{m}^2/\text{g}$ )
hac S4	100-200	$178,74 \pm 0,17$
hap S3	non tamisée	$176,52 \pm 0,19$
hydroxyapatite stœchiométrique	200-355	$3,08 \pm 0,01$

Ces mesures peuvent être sujettes à discussion en raison de la méthode de dégazage préalable à la mesure BET. En effet, afin de ne pas altérer les propriétés de surface des cristallites liées à la présence de la couche hydratée, le dégazage a été effectué ici dans des conditions douces (33°C pendant une heure), ce qui ne garantit pas une élimination totale des molécules gazeuses adsorbées. Néanmoins, cette méthode permet d'obtenir un ordre de grandeur de surface spécifique, et permet notamment la comparaison entre échantillons.

Il est important de noter la différence fondamentale dans les propriétés de surface des apatites nanocristallines, qu'elles soient carbonatées ou non, avec celles de l'hydroxyapatite stœchiométrique (augmentation de la surface spécifique d'un facteur 60). La présence de la couche phosphocalcique hydratée, les dimensions nanométriques des cristallites, et le caractère aisément mobilisable (labile) des ions non-apatitiques de surface sont des paramètres importants à l'origine de cette différence. La légère augmentation de surface spécifique observée pour l'apatite nanocristalline carbonatée par rapport à la non carbonatée peut être mise sur le compte du moindre état de maturation de l'hac (nanocristalline carbonatée) par rapport à l'hap (nanocristalline mais non-carbonatée). Cet état est une conséquence de l'inhibition de la maturation par les ions  $\text{CO}_3^{2-}$  qui se substituent principalement aux ions phosphate.

### 3 Remarques conclusives

La phase minérale du tissu osseux ou dentinaire est bien décrite par une apatite déficiente en calcium carbonatée de type B contenant des ions hydrogénophosphate. La réactivité de cette apatite – qui résulte de la taille nanométrique des cristaux et surtout des environnements non-apatitiques de surface – évolue de façon spontanée en solution au profit d'une plus grande stabilité thermodynamique, par la disparition des environnements non-apatitiques et la réorganisation du cristal vers un meilleur état de cristallinité.

Pourtant, les caractéristiques physico-chimiques des apatites biologiques qui proviennent de spécimens anciens ne correspondent pas toujours à celles d'apatites plus stœchiométriques et plus maturées. En effet, il existe des phénomènes et des circonstances *post mortem* à l'origine des modifications observées et de leur grande variabilité. Il s'agit donc, dans la section suivante, de prendre en considération les modifications que les substrats apatitiques de l'ADN ancien peuvent subir dans leur milieu d'enfouissement.

## C CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA DIAGENESE SQUELETTIQUE

### 1 Généralités

#### 1.1 Définitions

Le terme « taphonomie » a été inventé en 1940 par le paléontologue Ivan Efremov pour désigner les lois qui gouvernent l'enfouissement des restes (ou produits) d'organismes, soit « leur transition de la biosphère à la lithosphère » (Efremov, 1940), comme schématisé sur la Figure I-17. La **taphonomie** (du grec *taphos*, mort et *nomos*, loi) s'intéresse aux altérations qu'a subies un organisme entre les moments de son dépôt et de sa découverte. Ce terme englobe la mort de l'organisme, la décomposition, le transport éventuel, l'enfouissement et les modifications suivant l'enfouissement, ainsi que la fossilisation éventuelle permettant la minéralisation des restes (remplacement des tissus vivants par des substances minérales) à l'intérieur d'une roche sédimentaire. La taphonomie englobe également les processus naturels (érosion, lessivage des sols) ou artificiels (fouilles) qui permettent la découverte de l'objet. Cette discipline se place à l'intersection de l'archéologie, de la biologie, de la géologie et de la chimie.

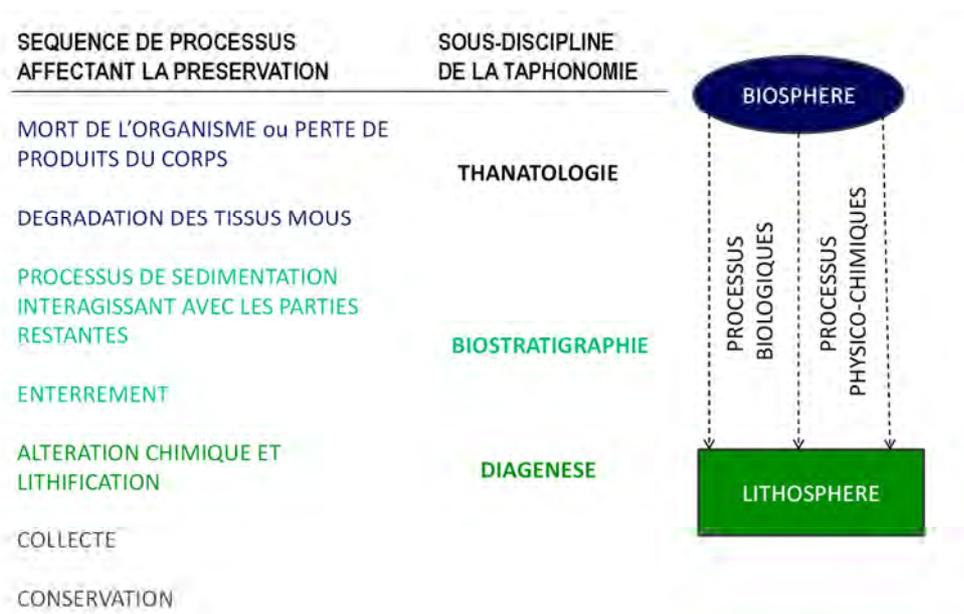


Figure I-17 Modèle d'histoire taphonomique indiquant les relations aux sous-disciplines de la taphonomie (selon Behrensmeyer et Kidwell, 1985)

La **diagenèse** décrit classiquement l'ensemble des processus physico-chimiques et biochimiques par lesquels les sédiments sont transformés en roches sédimentaires. Cependant, le sens de ce terme varie légèrement en fonction de son domaine d'application. Ainsi selon les archéologues Wilson et Pollard (2002), la diagenèse représente « *l'ensemble des processus physiques, chimiques et biologiques qui altèrent tout matériel archéologique dans le milieu d'enfouissement ; ces processus modifieront les propriétés chimiques et/ou structurelles originales d'un objet inorganique et gouverneront son destin ultime, en termes de préservation et de destruction* ».

## 1.2 A quoi sert l'étude de la diagenèse ?

L'application de ce terme en paléanthropologie consacre la diagenèse squelettique comme l'étude des phénomènes biologiques et physico-chimiques qui affectent les éléments du squelette après l'enfouissement. Le désir de comprendre les processus diagénétiques et surtout « *comment ils affectent l'information dans le registre fossile* » (Behrensmeyer et Kidwell, 1985) provient de la richesse des informations biologiques qui peuvent être extraites à partir de certaines molécules organiques ou éléments chimiques contenus dans ces vestiges. L'étude de la diagenèse comporte ainsi un ensemble d'analyses qui a pour but d'établir des références fiables se rapportant aux signaux originaux et d'écarter les échantillons pour lesquels la dégradation ou la contamination *post mortem* sont trop importantes (Chenorkian et Brugal, 2010; Malmstrom, 2005). Plus fondamentalement, la diagenèse a aussi un intérêt *per se* pour comprendre l'histoire taphonomique de l'organisme et la nature de l'environnement diagénétique, par l'identification des processus de préservation et de fossilisation des restes squelettiques (Trueman *et al.*, 2006; Turner-Walker et Jans, 2008), ce qui nous aidera à mieux appréhender les interactions organo-minérales, supposées jouer un rôle fondamental dans la préservation de l'ADN ancien. A terme, il s'agit d'élucider quelles pourraient être les modifications qui favorisent la conservation de l'ADN ancien ou celles en rapport avec sa dégradation. **Une meilleure connaissance des caractéristiques histologiques et physico-chimiques des substrats anciens de l'ADN pourra également contribuer à l'optimisation des méthodes d'extraction d'ADN ancien en fonction des spécimens.**

Lors de l'enfouissement des restes d'organisme, les échanges entre les éléments chimiques des os et des dents et le sol sont récurrents (Le Bras-Goude, 2007). L'étude de la

diagenèse nuance donc le concept généralement admis en radiochronologie<sup>9</sup> de « fermeture du système » qui permet de déduire la quantité initiale d'éléments radioactifs  $N_0$  à partir de la demi-vie de l'élément radioactif étudié, en considérant l'arrêt des échanges avec le milieu extérieur. Pour les roches, on estime que la « boîte » se ferme quand s'achève la cristallisation des minéraux (Trouillet, 2009). Pour la datation des ossements, le système est considéré comme clos au moment du décès de l'organisme. En réalité, ce sont les phénomènes diagénétiques de recristallisation qui vont permettre la fermeture du système dans le cas de spécimens osseux, en fonction de leurs caractéristiques initiales, en particulier la porosité du tissu et à la réactivité des apatites nanocristallines.

La complexité et la variabilité des motifs de diagenèse osseuse mènent souvent à la limitation de cette étude à des cas « *in situ* » (Boreham *et al.*, 2011; Cipollaro *et al.*, 1999; Marinho *et al.*, 2006; Trueman *et al.*, 2004) mais des tendances diagénétiques sont néanmoins mises en évidence. Cette investigation s'effectue à toutes les échelles, depuis l'analyse élémentaire (Buckley *et al.*, 2009; Poinar et Stankiewicz, 1999), en passant par l'analyse des fractions protéiques et minérales (Götherström *et al.*, 2002; Sosa *et al.*, 2013), la mesure de la porosité et l'histologie (Hagelberg et Clegg, 1991; Haynes *et al.*, 2002; Hoke *et al.*, 2011) jusqu'à l'observation à l'œil nu (Sosa *et al.*, 2013).

### 1.2.1 Fossiles moléculaires

La notion de fossiles moléculaires, par distinction aux fossiles morphologiques (Feuillie, 2012) fait référence aux polymères organiques d'origine biologique, issus de la dégradation cellulaire *post mortem* (acides nucléiques, protéines, polysaccharides, lipides). Ces molécules sont indubitablement dégradées et chimiquement modifiées au cours de la diagenèse (Eglinton *et al.*, 1991) et n'ont pas toutes le même potentiel informatif, notamment si l'on restreint l'étude aux êtres humains. En effet, la plupart des molécules fondamentales du vivant présentent très peu de divergences d'une espèce à l'autre, d'une population à une autre. En anthropologie, la seule molécule qui a ce pouvoir discriminant est l'ADN. Les autres composants organiques contenus dans les restes squelettiques peuvent néanmoins servir d'indicateurs diagénétiques, si leur conservation est corrélée à celle de l'ADN.

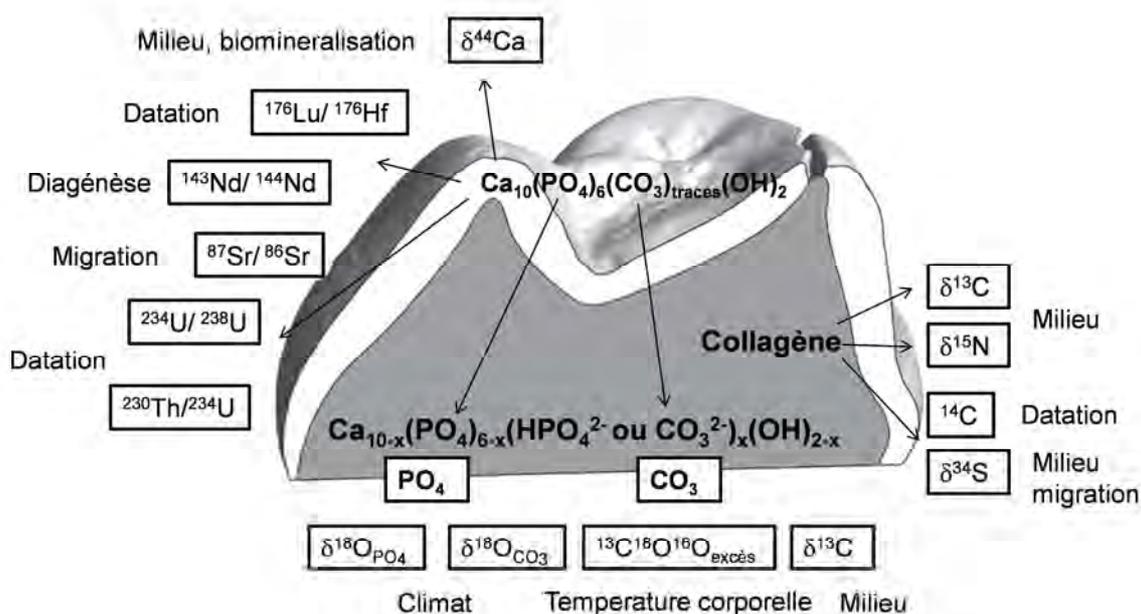
---

<sup>9</sup> Pour déterminer l'âge  $t$  de l'échantillon, on utilise la relation suivante  $t = \ln(N_0/N_t)/\lambda$  avec  $N_t$ , nombre d'atomes de l'isotope radioactif à l'instant  $t$  et  $\lambda$ , constante de radioactivité de l'isotope radioactif étudié.

## 1.2.2 Fossiles élémentaires

### *Isotopes stables et radioactifs*

L'ADN est un marqueur moléculaire mais d'autres éléments, atomiques en particulier, comme les isotopes stables ou radioactifs, peuvent servir à recueillir des informations biologiques précieuses sur le vivant de l'organisme lorsqu'ils sont bien conservés dans ses restes. Les signaux isotopiques renseignent sur de nombreux aspects des écosystèmes disparus (datation, alimentation, climat...); les plus courants sont schématisés sur la Figure I-18. En effet, les atomes utilisés lors de la formation de l'apatite et du collagène proviennent au final de l'alimentation, sous le contrôle des habitudes culturelles et de l'environnement, en plus de provenir de la physiologie propre à l'espèce. Etant donnée l'utilisation préférentielle par les organismes vivants des isotopes légers, ce sont les rapports  $\delta$  entre deux isotopes qui seront caractérisés.



**Figure I-18** Traceurs isotopiques analysés d'après des échantillons squelettiques ayant une utilité en paléontologie, modifié d'après Benazzi *et al.*, 2011 et Tütken et Vennemann, 2011

L'échange d'ions entre l'apatite et les fluides environnants affecte la composition isotopique de l'os fossile (Tütken et Vennemann, 2011), ce qui peut être à l'origine d'erreurs d'interprétation. De nombreuses études sur la radiochronologie au  $^{14}\text{C}$  sur substrat bioapatitique portent aujourd'hui sur les possibilités de traitement physico-chimiques préalable pour éliminer le carbone exogène (acide acétique, traitement thermique sous vide...)

et les possibilités d'analyses complémentaires pour authentifier les résultats (analyses des isotopes stables et bilans de masses, caractérisations apatitiques) (Zazzo et Saliège, 2011). L'utilisation du substrat apatitique est délicate, nécessitant souvent une élimination de la matière organique résiduelle par différents traitements chimiques (NaOCl, hydrazine, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>...) (Grimes et Pellegrini, 2013). Des critères de bonne conservation peuvent être définis : parmi eux, la cartographie des concentrations en éléments traces dans l'émail et dans la dentine (Grün *et al.*, 2008), selon un référentiel moderne bien défini (Jacques *et al.*, 2008). Il serait dans ce cas intéressant de pouvoir cibler une zone non remaniée, sans minéraux secondaires, pour l'étude des biomarqueurs originaux, via une microsonde ionique ou électronique ou ablation laser par ICP-MS.

Cependant, s'il est conservé dans les restes osseux, le collagène reste le substrat préférentiel en carbone et en azote pour la datation au radiocarbone et la détermination des rapports isotopiques du carbone et de l'azote (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C et <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N), car il subit moins les effets de la diagenèse. Là encore, une sélection rigoureuse des échantillons, et même des traitements préalables, sont réalisés avant leur analyse isotopique. Pour le carbone, les critères se fondent par exemple sur la différence entre le rapport isotopique du <sup>13</sup>C du collagène osseux et celui de l'acide humique, qui est un contaminant (Le Bras-Goude, 2007)

### ***Eléments traces***

L'analyse des éléments traces porte principalement sur la discrimination des éléments traces qui peuvent être incorporés du vivant de l'organisme, par rapport au calcium apatitique. Par exemple, le strontium et le baryum sont suivis sous la forme du rapport Sr/Ca, Ba/Ca, et servent à placer l'espèce au sein du réseau trophique par la décroissance de ce rapport selon la relation suivante : carnivores < herbivores < plantes (Balter, 2004).

## **2 Acteurs de la diagenèse**

Les éléments squelettiques collectés dans des contextes archéologiques sont indubitablement altérés. Mais leurs aspects macroscopiques (consistance, coloration, état de surface,...) présentent une grande variabilité. Cette variabilité reflète des modifications sous-jacentes à échelles plus petites, et résulte de l'effet combiné de facteurs intrinsèques, liés à la nature composite des tissus durs et d'agents diagénétiques extrinsèques, en fonction de l'histoire et du milieu taphonomique.

## 2.1 Histoire taphonomique

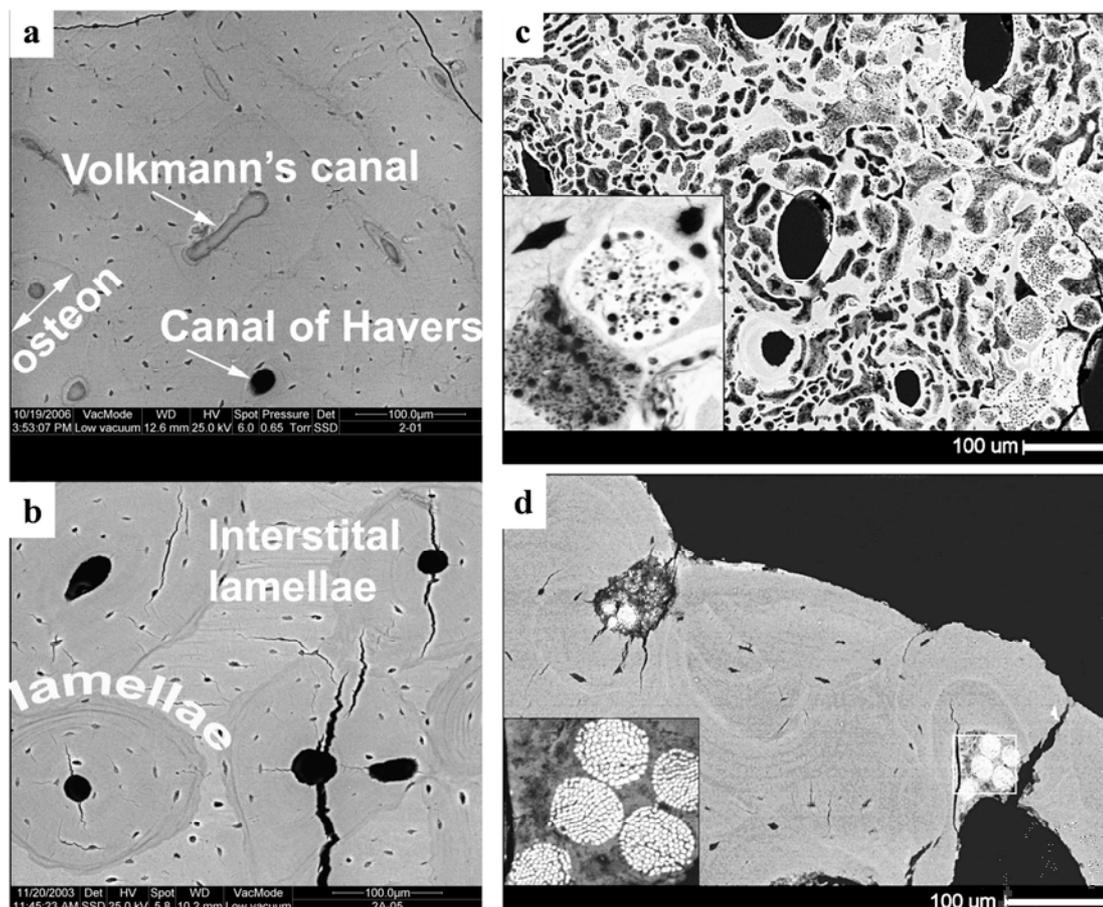
L'ancienneté de l'échantillon importe généralement peu dans la préservation des molécules organiques, voire du spécimen (Burger *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2005, 2001; Tütken et Vennemann, 2011). En revanche, l'histoire taphonomique peut comporter des événements en faveur ou en défaveur de la conservation de l'échantillon par :

- des phénomènes naturels, principalement la transformation des sédiments (compression, érosion...) qui est plus drastique en milieu terrestre qu'en milieu aquatique,
- des phénomènes anthropiques : remaniement de sépultures, fouilles, etc. L'étude paléontologique des Vertébrés terrestres est donc d'autant plus délicate quand il s'agit de l'Homme. Des facteurs culturels comme l'enterrement rituel, les traitements conservateurs, l'artisanat à base de matériel osseux et l'utilisation du feu conditionnent également les premiers stades de la diagenèse.

Des échantillons datant de la même période peuvent présenter une perte massive des structures histologiques ou au contraire, être parfaitement préservés comme illustrés, pour le Moyen-Âge, sur la Figure I-19d, en fonction de leur histoire taphonomique.

Il en est de même pour l'histoire de l'échantillon après sa découverte. Si les traitements conservateurs appliqués à certains spécimens de musée sont favorables à l'intégrité morphologique des structures, la préservation de l'ADN peut s'en trouver profondément altérée (cf. chapitre II, section C1).

Il apparaît que les conditions entourant la diagenèse précoce (de 0 à 1000-10000 ans *post mortem*) (Tütken et Vennemann, 2011), quand le collagène est encore présent, jouent un rôle prépondérant dans la préservation de l'os/la dent archéologique et des biomolécules qu'il/elle peut contenir (Fernandez-Jalvo *et al.*, 2010; Geigl, 2002; Tütken *et al.*, 2008). En effet, c'est durant les premiers stades que les acteurs majeurs de la dégradation – micro-organismes, eau, oxygène – peuvent causer la dégradation totale du spécimen, notamment par la création d'une macroporosité qui favorisera les échanges avec les sédiments encaissants. Ceci met en évidence la notion de « site » au sein duquel s'est déposé un ensemble de vestiges qui a pu de la même façon échapper aux outrages du temps.



**Figure I-19 – Gauche (a, b) : sections transversales annotées d'un os long moderne (Fernandez-Jalvo *et al.*, 2010) – Droite : Os médiévaux, (c) dégradés par des micro-organismes et (d) bien préservés. Dans l'insert, des motifs framboïdes liés à la précipitation de minéraux secondaires révèlent la présence de bactéries sulfato-réductrices, dans un environnement d'enfouissement anoxique (Turner-Walker et Jans, 2008)**

Actuellement, les sites archéologiques les plus anciens ayant livré des séquences d'ADN humain sont la grotte de Denisova<sup>10</sup>, au sud de la Sibérie (Meyer *et al.*, 2012; Reich *et al.*, 2010), dont les sédiments sont datés entre 30 et 80 000 ans, et le site de Sima de los Huesos, au nord de l'Espagne, dont les spécimens squelettiques sont estimés à 300 000 ans (Meyer *et al.*, 2013). En-dehors des cas d'études d'ADN ancien, on peut citer d'autres sites fossilifères, comme les schistes cambriens très connus du site de Burgess (~500 millions d'années), au Canada, sans doute créés à partir de coulées de boues océaniques qui ont piégé la faune sous-marine, et le site de Kromdraai, en Afrique du Sud, ayant abrité les représentants de *Paranthropus robustus* il y a 2 millions d'années (Balter *et al.*, 2012).

<sup>10</sup> L'ADN ancien extrait des fragments squelettiques retrouvés (deux phalanges et une molaire) serait celui d'une nouvelle espèce d'Hominidés ayant pu contribuer au génome humain actuel, à l'instar de l'Homme de Neandertal.

## 2.2 Processus biogéochimiques

Les processus de minéralisation inhérents à la conservation des éléments squelettiques sont fortement dépendants des caractéristiques géochimiques du milieu environnant et liées à la nature des eaux interstitielles et des sédiments. La diagenèse squelettique est donc un ensemble complexe de processus de dégradation site-spécifique, qui touche simultanément la fraction minérale et la fraction organique dès son dépôt. L'analyse de la préservation (par l'étude comparative entre les concentrations en éléments traces et le signal isotopique, en référence aux différentes concentrations établies sur tissu frais) fournit des indications sur l'influence des milieux d'enfouissement, en montrant le plus souvent que les conditions diagénétiques tardives ne sont pas à l'origine des modifications observées. L'os fossile serait soumis aux pressions diagénétiques initiales jusqu'à devenir un système fermé (Trueman *et al.*, 2008).

La matrice sédimentaire accueillant les restes d'organismes peut affecter ces derniers en fonction de différents paramètres, dont les principaux sont la température, le pH, la présence d'oxygène, la teneur en eau et la présence de micro-organismes.

### 2.2.1 Température

Dans les zones septentrionales, les sédiments permafrostiques<sup>11</sup> ont accueilli les défunts de certaines populations nomades. On retrouve ainsi des coffres mortuaires posés sur le *permafrost* en Sibérie Orientale où la quasi-totalité du territoire est recouvert par ce type de sol. Les dépouilles étaient parfois conservées durant tout l'hiver pour ne creuser qu'après le dégel du sol (Amory, 2007). En Mongolie, l'étude de la nécropole d'Egyin Gol é été réalisée sur soixante sujets décédés durant l'ère Xiongnu (3<sup>e</sup> s. av. JC – 2<sup>e</sup> s.). Le typage génétique et la mise en relation généalogique a été possible sur cinquante d'entre eux (Keyser-Tracqui *et al.*, 2003).

Le froid extrême favorise la préservation des tissus, notamment les plus fragiles (téguments, tissus viscéraux...): la momie naturelle d'Ötzi, découverte à 3200 mètres d'altitude et datée du Chalcolithique (~4500 ans avant le présent), celles du site de Qilakitsoq ainsi que Dima, le jeune mammoth laineux décédé il y a 40 000 ans en fournissent de bons exemples, dont certains sont illustrés en Figure I-20.

---

<sup>11</sup> Le permafrost (*permanently frozen soil*) ou pergélisol est une fraction du sol qui ne dégèle jamais. Ses caractéristiques sont particulièrement intéressantes pour la conservation à long terme d'éléments biologiques.



**Figure I-20 Exemples de conservation exceptionnelle liée au froid : à gauche, mammoth laineux (40 000 BP) ; à droite, couteau en silex de Ötzi (4500 BP) avec son fourreau en teille (écorce de tilleul)**

### 2.2.2 pH

Certains auteurs évoquent une meilleure préservation des tissus squelettiques, et de l'ADN, dans un sédiment basique (Hagelberg *et al.*, 1991; Lindahl, 1993), bien qu'un phénomène d'alkylation à l'origine de modifications chimiques de l'ADN ancien ait été mis en évidence (Drabløs *et al.*, 2004). L'acidité, malgré son effet inhibiteur sur l'activité bactérienne, favorise la dissolution des matrices minérales en-dessous d'un pH6 (Berna *et al.*, 2004; Boreham *et al.*, 2011; Elliott, 1994; Piepenbrink, 1989). A pH acide, les mécanismes de dissolution peuvent aboutir à la destruction totale du spécimen.

### 2.2.3 Oxygène

L'importance d'un environnement anoxique dans la préservation des tissus d'origine biologique est liée à l'activité bactérienne (bactéries aérobies) et aux réactions oxydatives qui altèrent les molécules organiques.

### 2.2.4 Eau

L'eau est un vecteur de minéralisation nécessaire à la fossilisation et donc à la préservation. Mais son rôle est prépondérant dans la destruction squelettique en fonction de son degré de saturation et de l'importance de son écoulement à travers le sédiment (lessivage).

L'eau a tendance à éliminer les protéines solubles. Elle favorise également la rupture des liaisons entre les peptides du collagène, pourtant hydrophobe, et elle potentialise d'autres réactions hydrolytiques, comme celles qui altèrent l'ADN. La présence d'eau peut également altérer la physico-chimie des substrats apatitiques, par le biais de dissolutions/précipitations par exemple. La sécheresse inhibe l'activité des bactéries et champignons responsables de la putréfaction et peut permettre une conservation à long terme (Mendisco, 2011). Mais, dans les climats trop arides, les restes squelettiques ont tendance à s'assécher et se casser rapidement.

### **2.2.5 Sels**

Un milieu riche en sel est favorable à la préservation des éléments squelettiques par une action dessiccative (Lyman, 1994). Certains sels se comportent comme des inhibiteurs des réactions enzymatiques à l'origine de la dégradation de l'ADN (Alaeddini *et al.*, 2010; Kemp *et al.*, 2014). D'un point de vue physico-chimique, une force ionique élevée limite le phénomène de dépurination de l'ADN (Lindahl et Nyberg, 1972) et favorise les processus d'adsorption d'ADN double-brin sur une surface minérale (Chen *et al.*, 2007; Grunenwald *et al.*, 2014).

### **2.2.6 Activité microbologique**

La biodégradation est liée à l'activité de micro-organismes (champignons, bactéries...) et surtout aux enzymes qu'ils secrètent (nucléases, protéases, lipases). Ce processus, qui touche préférentiellement les tissus mous, puis la matière organique contenue dans les ossements, peut être à l'origine de la dégradation de la fraction minérale, utilisée en tant que substrat carboné (Child, 1995; Geigl, 2002). De façon plus anecdotique, certains animaux plus gros utilisent l'apatite comme source de phosphore (Lyman, 1994). L'attaque microbienne est un acteur majeur du début de l'histoire taphonomique en raison de la création d'une macroporosité qui est associée à la perte de la matière organique. Ce nouvel état favorise les mécanismes de dissolution/précipitation au sein du matériel minéral archéologique.

## **3 Diagenèse des tissus squelettiques en tant que substrats d'ADN ancien**

Les propriétés intrinsèques du tissu conditionnent sa résistance à long terme. En anthropologie, les tissus durs qui peuvent être utilisés comme substrats d'ADN ancien sont

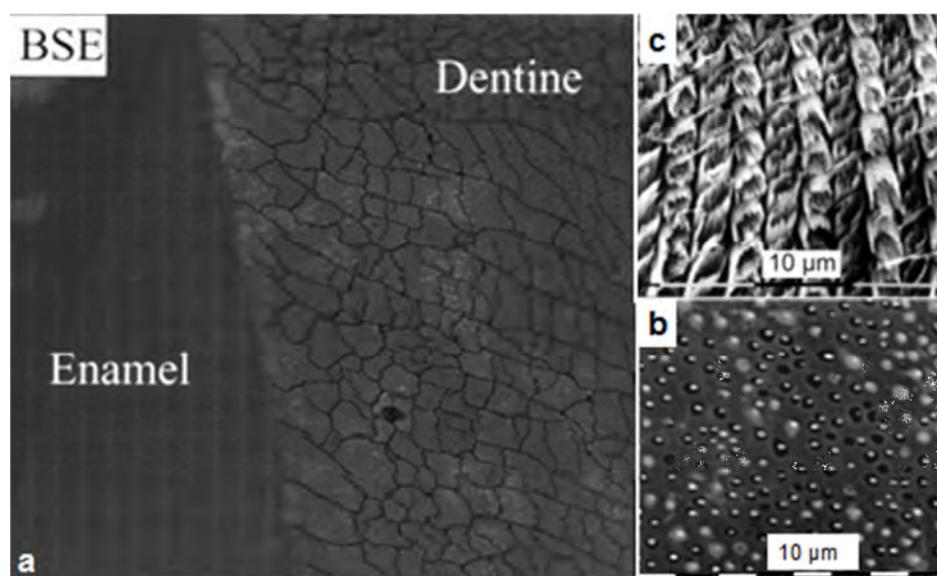
invariablement composés d'une matrice collagénique qui se minéralise par la précipitation d'apatite nanocristalline non stœchiométrique. La résistance diagénétique d'un tissu dépend donc des propriétés physico-chimiques des cristaux d'apatite et du collagène qui composent ce tissu et, dans une moindre mesure, de son organisation histologique. Les propriétés particulières de l'émail dentaire (proche de la stœchiométrie de l'hydroxyapatite), par rapport aux autres tissus minéralisés expliquent la description de sa diagenèse dans un paragraphe isolé.

### 3.1 Email dentaire

L'émail dentaire (voir chapitre A3.3) ne contient ni collagène, ni apatite *nanocristalline*, ni ADN. L'émail dentaire est le tissu le plus minéralisé du corps humain, avec moins de 1% de protéine, en l'absence de pathologie (ex : hypominéralisation molaire-incisive, fluorose, caries). La diagenèse de l'émail dépend donc des propriétés physico-chimiques de l'hydroxyapatite, et, dans une moindre mesure, de l'agencement histologique des cristaux. Sa porosité négligeable est attribuée à la qualité des cristaux de l'émail : plus gros (microniques), en décussation, et moins réactifs (cf. stœchiométrie de l'hydroxyapatite) par rapport à ceux de l'os ou de la dentine. La surface spécifique des cristallites amélaire est 60 à 80 fois moins importante que les cristallites de la dentine ou de l'os. L'hydroxyapatite a une structure stable qui ne peut être décomposée que pour des températures très élevées (1300°C) en l'absence de vapeur d'eau (Eichert, 2001). La fluoration, initiale, ou d'origine diagénétique, a pour effet de diminuer encore la solubilité du minéral (pour information, le produit de solubilité de l'hydroxyapatite et de la fluorapatite sont respectivement de l'ordre de  $10^{-118}$  à  $10^{-121}$ ) (McDowell *et al.*, 1977; Moreno *et al.*, 1974). Les propriétés de dissolution sont prépondérantes dans la résistance diagénétique d'un matériel dans un milieu naturellement irrigué (Berna *et al.*, 2004). A pH neutre, la solubilité de l'hydroxyapatite stœchiométrique est bien inférieure à celle de cristaux natifs d'origine osseuse, et, dans une moindre mesure, à celle de cristaux d'os diagénétiques (Berna *et al.*, 2004). *In vitro*, la dissolution apparaît comme non congruente, avec un rapport Ca/P en solution supérieur à celui du solide, ce qui est en faveur d'un relargage préférentiel des ions  $\text{Ca}^{2+}$  par rapport aux ions phosphate (Berna *et al.*, 2004; Chairat *et al.*, 2007). Berna *et al.* imputent ce phénomène à la dissolution préférentielle des ions carbonate qui se substituent aux ions phosphate (Berna *et al.*, 2004).

La Figure I-21 illustre la meilleure préservation de l'émail par rapport à la dentine sous-jacente, ce qui confère globalement une plus grande longévité à la dent, et plus particulièrement à la dentine coronaire, qu'elle recouvre sur plusieurs millimètres d'épaisseur. En fonction des informations recherchées, les études paléontologiques, qui reposent sur la signature chimique originale de l'apatite biologique, choisissent l'émail comme substrat préférentiel, surtout pour les échantillons très anciens où le collagène a disparu (Balter *et al.*, 2012; Roche *et al.*, 2010).

Par ailleurs, un critère d'authenticité propre à l'émail est fondé sur la présence d'une bordure riche en zinc en périphérie, caractéristique des zones de non-croissance cristalline (le zinc est utilisé comme cofacteur par les protéases impliquées dans le contrôle de la maturation amélaire). Une rupture de cette bordure témoigne d'une intrusion diagénétique (Grün *et al.*, 2008).



**Figure I-21 Clichés MEB de dentine et email archéologiques – a, b : dent fossile (bovine) en imagerie des électrons rétrodiffusés. L'altération de la dentine est en relation avec la précipitation de minéraux secondaires à l'intérieur des microtubules (Kohn *et al.*, 1999) – c : incisive de rongeur fossile avec conservation de la structure prismatique et décussée de l'émail après traitement à l'acide formique 5%, 2 min (Dauphin et Williams, 2004)**

Bien qu'il ne contienne pas de cellules, l'émail dentaire joue un rôle indirect dans la préservation de l'ADN ancien d'origine dentaire en protégeant la dentine sous-jacente. Cependant, nous nous intéresserons surtout à l'évolution diagénétique des tissus durs les moins minéralisés, seuls à contenir des cellules, pour tenter de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la préservation de l'ADN ancien contenu dans ces substrats.

### 3.2 Collagène de type I

La longévité du collagène dans les os et les dents archéologiques sur plusieurs centaines de milliers d'années s'explique en partie par la nature intrinsèque de cette protéine, peu soluble (notamment insoluble dans des conditions physiologiques) pour trois raisons principales :

- l'hydrophobie de la molécule de collagène et les interactions hydrophobes entre chaînes adjacentes,
- son degré exceptionnel d'organisation tridimensionnelle (organisation des triple-hélices/microfibrilles en fibrilles puis en faisceaux),
- l'étendue de la réticulation covalente entre microfibrilles au niveau des résidus lysine et hydroxylysine, ce qui limite l'accès des collagénases (Perumal *et al.*, 2008),

Mais surtout, l'association intime entre le collagène et la fraction minérale des tissus durs (minéralisation intra- et extra-fibrillaire) joue un rôle prépondérant dans cette conservation. L'étude de Reiche *et al.* (2012) a mis en évidence (par MET sur coupe ultrafine) la conservation de la périodicité spatiale caractéristique des fibres de collagène, associée à l'alignement des cristallites d'apatite selon leur axe *c* dans les zones bien conservées. A l'inverse, une perte de cette périodicité spatiale est parfois détectée : elle conduit manifestement à une exposition supplémentaire de la phase minérale. La disparition du collagène aura pour effet d'exposer les cristaux d'apatite et de faciliter l'accès des enzymes et des solutions environnantes en profondeur de l'échantillon.

Durant la diagenèse précoce, cette collaboration fructueuse est mise en évidence par la résistance du collagène osseux vis-à-vis de l'activité enzymatique des collagénases bactériennes (Tuross, 2002), alors que le collagène des tissus mous est rapidement dégradé. Le collagène confère au tissu osseux une microporosité, avec un diamètre de pore n'excédant pas les 10 nm, ce qui est insuffisant pour permettre l'accès aux collagénases, ainsi qu'aux autres enzymes bactériennes et fongiques (C. N. Nielsen-Marsh, 2000).

D'un point de vue physico-chimique, le collagène minéralisé possède des caractéristiques inhabituelles qui peuvent influencer sa diagenèse : expérimentalement, la température de gélatinisation du collagène osseux est plus élevée que celle du collagène non minéralisé, ce qui signifierait que la présence minérale retarde la dénaturation par hydrolyse des liaisons peptidiques et la perte consécutive de fragments peptidiques (Collins *et al.*, 1995). La demi-vie du collagène minéralisé dans des environnements tempérés est expérimentalement estimée

entre 1000 à 20000 ans (C. N. Nielsen-Marsh, 2000). Des cas exceptionnels reportent une conservation sur 100 à 200 000 ans (Tütken et Vennemann, 2011). De façon réciproque, les molécules de collagène hydrophobe isoleraient les cristaux apatitiques des eaux interstitielles environnantes (Tütken et Vennemann, 2011).

On recourt le plus souvent à une méthode destructrice pour évaluer le contenu en collagène. Les échantillons réduits en poudre sont classiquement déminéralisés à 4°C par immersion dans une solution HCl 1M pendant 24 h. Après centrifugation, la fraction protéique, insoluble dans l'acide, est rincée jusqu'à neutralité du pH (Campos *et al.*, 2012; Dobberstein *et al.*, 2009; Götherström *et al.*, 2002; Sosa *et al.*, 2013). Cette méthode fait l'impasse sur la contribution des protéines non collagéniques insolubles à l'acide (Smith *et al.*, 2005), c'est pourquoi une analyse élémentaire CHN peut venir en complément de la méthode précédente pour estimer la quantité de collagène à partir de la teneur en azote résiduel (Dobberstein *et al.*, 2008; Götherström *et al.*, 2002; Nielsen-Marsh et Hedges, 2000).

De façon moins invasive, la réponse de la fonction amide I du collagène en spectroscopie infrarouge en transmission permet également une quantification indirecte du collagène, voire une analyse plus détaillée de cette protéine, par décomposition spectrale (Chadefaux *et al.*, 2009, Reiche *et al.*, 2012). Le cas échéant, l'aire sous la courbe de la bande amide I dans la zone 1590–1710  $\text{cm}^{-1}$  est rapportée à l'aire totale de la  $\nu_3$  des phosphates entre 1200 et 900  $\text{cm}^{-1}$  pour une détermination semi-quantitative du contenu en collagène (Sosa *et al.*, 2013, Reiche *et al.*, 2012).

### **3.3 Apatite nanocristalline**

La mort de l'organisme signe l'arrêt du métabolisme phosphocalcique et du remodelage osseux (et, dans une moindre mesure, dentinaire et cémentaire). En l'absence d'activité microbienne, l'évolution diagénétique des cristaux d'apatite est alors sous la dépendance des lois de stabilité thermodynamique au sein d'un système qui inclut aussi les fluides et les sédiments encaissants.

Contrairement à l'apatite amélaire, l'apatite nanocristalline osseuse ou dentinaire subit très fortement la diagenèse en raison (1) de sa grande capacité de substitutions ioniques, notamment cationique, (2) de sa réactivité de surface (surface spécifique  $\sim 200 \text{ m}^2/\text{g}$ ) liée à la petite taille des cristaux et à la présence d'ions labiles dans la couche hydratée, et (3) du caractère thermodynamiquement métastable des apatites nanocristallines non-

stœchiométriques (Rollin-Martinet *et al.*, 2013). Trois types de phénomènes post-dépositionnels généraux sont attribués à la diagenèse :

- l'évolution chimique de la composition en équilibre avec le milieu selon trois mécanismes principaux : maturation, adsorption, diffusion et dissolution/recristallisation,
- l'augmentation de la cristallinité (évolution spontanée vers la stœchiométrie, croissance cristalline, mûrissement d'Ostwald),
- la précipitation de minéraux secondaires, à l'intérieur et à la surface des cristaux.

Les modifications de la composition de l'apatite peuvent être mises en évidence par dosage des éléments chimiques, par spectroscopie FTIR, par MEB-EDX, mais aussi par l'établissement de profils élémentaires qui ciblent les éléments traces. *In vivo*, la concentration de ces éléments est inférieure au ppm (sub-ppm). Ils sont pourtant ubiquitaires dans les fluides naturels et peuvent s'adsorber, voire s'incorporer aux cristaux d'apatite biologique. Différents profils élémentaires sont décrits, de la surface vers la profondeur de l'échantillon, en fonction des processus physico-chimiques impliqués (enrichissement selon un simple mécanisme d'adsorption/diffusion, lessivage de la surface, dissolution/recristallisation...) (Hinz et Kohn, 2010; Lyman, 1994; Piepenbrink, 1989; Trueman et Tuross, 2002).

### ***Adsorption***

L'évolution diagénétique de l'apatite est soumise à un équilibre avec la solution environnante, qui peut aboutir à des échanges ioniques entre la surface du cristal et le milieu diagénétique. Les phénomènes d'adsorption d'espèces ioniques ont été largement étudiés pour des systèmes incluant l'hydroxyapatite stœchiométrique (Duc, 2002) ou des apatites nanocristallines (Cazalbou, 2000). La capacité d'adsorption de molécules ayant une affinité pour la surface cristalline apatitique – qui semble être cruciale pour la survie à long terme de l'ADN dans la dentine et dans l'os compact – dépend fortement de l'état de maturation des cristaux, c'est-à-dire de l'importance de leur couche hydratée (Ouzat *et al.*, 1999). Que ce phénomène intervienne du vivant de l'organisme, lors du remaniement osseux, ou de façon *post mortem*, l'apatite protégerait cette molécule de la dégradation, comme c'est le cas pour le collagène.

### ***Maturation, disparition de la couche hydratée***

Les environnements non apatitiques composés d'ions labiles et de molécules d'eau sont métastables et disparaissent spontanément au cours du temps, en l'absence de phénomène de dissolution/précipitation, au cours de la maturation. Cette disparition se fait au profit du cœur apatitique. Bien que les ions labiles puissent facilement s'échanger avec d'autres espèces présentes dans les fluides environnants, l'incorporation progressive des ions obéit aux lois de la thermodynamique et l'addition d'éléments exogènes à la surface du minéral dépendra de la stabilité thermodynamique du composé.

### ***Dissolution/précipitation (recristallisation)***

Les mécanismes de restructuration plus profonds nécessitent, quant à eux, des processus de dissolution/précipitation plus lents qui sont conditionnés notamment par la perte du collagène. La solubilité des apatites nanocristallines est une propriété complexe. Les études réalisées sur des échantillons synthétiques montrent l'existence d'une étape de dissolution rapide lors de la mise en solution à pH neutre des cristallites, suivie par une évolution très lente qui s'apparente à un équilibre. Cet équilibre métastable semble gouverné par les propriétés de surface (couche hydratée) des nanocristaux biologiques (Chhetry, 2000), c'est pourquoi il est difficile d'établir des comparaisons avec des composés bien cristallisés, comme l'hydroxyapatite. La dissolution est favorisée à pH acide (Berna *et al.*, 2004) et en présence d'agents microbiologiques (levures, bactéries).

*In fine*, la recristallisation de la matrice apatitique diminue la surface accessible des cristaux et transforme le minéral osseux en une phase minérale plus stable, plus insoluble, ce qui diminue la susceptibilité des cristaux vis-à-vis de la bioactivité et des réactions chimiques. La cristallinité des tissus minéraux diagénétiques est en général augmentée par rapport au minéral initial, en fonction de la composition du milieu. La bioapatite évolue en effet le plus souvent vers une fluoroapatite carbonatée, malgré les lacunes et les défauts de stabilité que la présence de carbonate implique (Cazalbou *et al.*, 2004).

La recristallisation consécutive aura pour conséquences notables :

- la perte de constituants mineurs ou majeurs de l'apatite initiale
- la modification de la composition isotopique ( $^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$ ,  $^{18}\text{O}_{\text{CO}_3}$ ,  $^{13}\text{C}\dots$ ) (Zazzo *et al.*, 2004)
- l'enrichissement en certains éléments traces initialement présents à des taux très bas dans l'apatite moderne (12).

Parmi les ions en provenance des sols qui peuvent s'échanger, les plus courants sont, pour les cations,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , et pour les anions,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  (Nielsen-Marsh et Hedges, 2000). Certains éléments peuvent s'incorporer à l'état de traces (Ba, Pb, U, Co, Ni, Ti, As, V, Cr, Li, Rb, Th, Hf, Lu ...) dont des terres rares (Sc, Y, La, Sm, Yb, Nd, Pr...) (Trueman *et al.*, 2008). Une étude récente (Hosseinia *et al.*, en cours de soumission) portant sur l'effet sur la stabilité thermodynamique d'apatites dopées en terres rares (Nd, Er, Eu, Tb) a montré que cette incorporation menait à une déstabilisation de la phase apatitique, mais à un bilan énergétique globalement favorable en prenant en compte les ions aqueux formés, ou consommés, durant le processus de substitution. L'incorporation d'uranium (dont le néodyme Nd représente un ion « modèle ») dans l'apatite osseuse est très fréquente (la plupart des os fossiles possèdent ainsi une forte radioactivité et peuvent être datés grâce à cela) (Cazalbou *et al.*, 2004).

### ***Diffusion chimique***

La diffusion ionique semble être un processus majeur responsable des altérations chimiques dans la diagenèse des éléments squelettiques. La diffusion intervient dès lors qu'un élément chimique mobile (ion en l'occurrence) est présent, et se poursuit jusqu'à l'établissement de l'équilibre des concentrations, entre deux phases solides (solutions solides), ou entre une phase liquide (eaux interstitielles) et une phase solide, minérale.

### ***Mûrissement d'Ostwald***

Le « mûrissement d'Ostwald » est un phénomène physico-chimique lié à la diminution de l'énergie de surface, elle-même liée à la dissolution des petits cristaux au profit des gros, plus stables (Cazalbou *et al.*, 2004).

### ***Précipitation de minéraux secondaires***

Des cristaux secondaires peuvent se déposer à l'intérieur des lacunes anatomiques (tubuli dentinaires, canaux de Havers, espaces interlamellaires...) et de la porosité initiale du tissu, mais aussi au niveau des espaces laissés libres suite à l'hydrolyse du collagène ou aux fractures tissulaires. La précipitation de minéraux secondaires est fonction de la composition du milieu et peut conduire tout aussi bien à la formation de minéraux exogènes (Kohn *et al.*, 1999; Tütken et Vennemann, 2011) (brushite, pyrite, calcite, manganite, smectite, quartz,

oxy-hydroxydes....) que d'apatite dite « authigénique »<sup>12</sup> (Trueman *et al.*, 2008). La croissance cristalline dans les pores (initiaux ou secondaires à la perte du collagène) vient limiter l'action d'agents extérieurs. L'observation des os ou dents fossiles les plus anciens prouve que ce phénomène est indispensable à une survie à long terme de l'échantillon. Ceci explique aussi pourquoi la porosité, qui peut être mesurée par la technique de porosimétrie à intrusion de mercure, ou par microCT (microtomographie à rayons X) (Reiche *et al.*, 2012), est un bon indicateur de la diagenèse.

### 3.4 Histologie

#### 3.4.1 Dentine

La moindre résistance diagénétique de la dentine résulte également de son organisation tissulaire. En effet, la densité importante de tubuli, dans la partie coronaire et surtout radiculaire, engendre une microporosité initiale de l'ordre de 1-10µm. Les phénomènes diagénétiques intercrystallins sont donc non négligeables au sein de la dentine et sont plutôt représentés par la précipitation de minéraux secondaires au niveau des espaces vides. Les propriétés histologiques et physico-chimiques de ce matériau contribuent donc à son utilisation parcimonieuse pour la recherche de biomarqueurs élémentaires originaux.

#### 3.4.2 Cément

Ce tissu fait l'objet de moins d'attention. Sa nature très poreuse et sa localisation en périphérie de la racine, en contact avec le ligament alvéolo-dentaire, lui confèrent une moindre résistance aux changements diagénétiques, ce qui limite son intérêt paléobiochimique. La densité cellulaire du cément est supérieure à celle de l'os, mais les caractéristiques minérales sont très proches de celles de l'os compact. Néanmoins, le dépôt cyclique de cément lors de l'éruption dentaire, qui est un phénomène continu, peut servir d'indicateur des rythmes saisonniers qu'a vécu l'organisme de son vivant (Stutz, 2002).

---

<sup>12</sup> Le terme « authigénique » est un terme utilisé en géologie pour qualifier un minéral qui a cristallisé au sein même de la roche dans lequel il se trouve. Par extension, ce terme désigne la formation d'une apatite *post mortem* à partir des éléments chimiques propres au tissu dans laquelle elle cristallise.

### 3.4.3 Os compact

Dans certains cas, l'os *spongieux* (ou trabéculaire) est préservé sous une forme déshydratée, poudreuse et pourrait être exploité pour l'extraction de lipides. Mais sa structure réticulaire peu minéralisée et riche en matière organique en fait une zone préférentielle de contamination en cas d'accessibilité. L'os *compact*, qui représente la partie corticale de l'os, est un tissu au contraire très exploité, en raison de sa relative abondance dans le registre archéo-anthropologique. Les os longs sont généralement mieux préservés en raison de leur corticale plus épaisse. La conservation différentielle des os plats peut notamment être liée à leur structure : les os du crâne ont une fraction médullaire réduite par rapport aux vertèbres.

Initialement, la porosité de l'os est importante (12% de l'os cortical occupé par des pores) (C. N. Nielsen-Marsh, 2000). Une augmentation de la porosité est un signe d'altération microbienne. Outre leur activité enzymatique, bactéries et levures peuvent proliférer dans les espaces anatomiques vacants (canal de Havers, de Volkman, lacunes ostéocytaires...) ou dans les interstices interlamellaires des ostéons, voire creuser des tunnels dans ces derniers. Les champignons peuvent ainsi créer des tunnels de quelques  $\mu\text{m}$  dans l'os afin d'accéder au collagène (Hackett, 1981). Les bactéries sont plutôt à l'origine de tubules ( $\sim 300$  nm de diamètre) étendus à partir des canaux physiologiques. Ces tubules sont habituellement bordés par du tissu hyperminéralisé, ce qui suggère un phénomène de dissolution/recristallisation de l'apatite dissoute sous une forme mieux cristallisée. Parfois aucune cavité n'est observée mais le tissu osseux apparaît granulé (Piepenbrink, 1989; Turner-Walker et Jans, 2008). Cette destruction focale peut partiellement détruire la structure histologique, notamment en périphérie des ostéons dans l'os compact, suite à la coalescence des tunnels, ce qui est très bien illustré en Figure I-19c.

## 4 Indices diagénétiques utilisés dans les études de l'ADN ancien

### 4.1 Indices de conservation

L'extraction et le typage des molécules et signaux chimiques d'intérêt en archéologie peuvent se faire par des méthodes non invasives, micro-invasives ou destructrices. Dans le cas des études sur l'ADN ancien, sauf à très rares exceptions, l'échantillon est détruit. Un des buts de l'étude diagénétique réside alors dans la recherche de corrélation entre la préservation de

l'ADN ancien et d'autres indicateurs diagénétiques pouvant être caractérisés par des méthodes non ou micro-invasives. La démarche consiste notamment à identifier un autre indice diagénétique qui soit sensible aux mêmes facteurs que l'ADN. Les recherches actuelles tendent à cela, dans une approche combinant plusieurs indices complémentaires (100). Cette idée est sous-tendue par le caractère multifactoriel du processus de préservation de l'ADN ancien.

### ***Racémisation des acides aminés***

Un des indices encore utilisé actuellement est la détermination du degré de racémisation des acides aminés présents dans l'échantillon (Poinar *et al.*, 1996). La racémisation est une conversion stéréo-isomérique de la forme levogyre (L) des acides aminés vers leur forme dextrogyre (D). La biosynthèse des acides aminés produit principalement la forme L de ces molécules. Mais, les facteurs environnementaux *post mortem*, tels que la température, l'humidité ou le pH, favorisent la racémisation progressive jusqu'à l'équilibre où chaque énantiomère est représenté à parts égales (Goulet *et al.*, n.d.). Etant donné que ces mêmes facteurs jouent également un rôle important dans la dégradation de l'ADN, des études ont été menées pour corréler ces deux phénomènes. Les études expérimentales menées *in vitro* montrent que le taux de racémisation de l'acide aspartique est effectivement proche de la vitesse de dépurination de l'ADN (Poinar *et al.*, 1996). La corrélation du rapport D/L de cet acide aminé avec le rendement d'extraction en ADN ancien a permis de déterminer une valeur seuil au-dessus de laquelle aucune séquence d'ADN n'est retrouvée. Par la suite, la fiabilité de cette méthode a été remise en question, en raison de la variabilité des taux de racémisation en fonction des tissus, qui ne correspondent d'ailleurs pas à ceux mesurés expérimentalement *in vitro* (Collins *et al.*, 1999)

### ***Contenu en collagène***

La préservation du collagène peut parfois se révéler être un bon indicateur de l'état général de conservation de l'échantillon, si on considère la matière organique comme étant préférentiellement dégradée au cours de la diagenèse. L'association intime des cristaux d'apatite (sur lesquels l'ADN est potentiellement adsorbé) aux fibrilles de collagène hydrophobe protège ces cristaux de la dissolution (voir chapitre 3.2). Ceci peut expliquer la bonne corrélation parfois observée de cet indicateur avec la présence d'ADN (Campos *et al.*, 2012; Götherström *et al.*, 2002; Sosa *et al.*, 2013).

### ***Autres protéines***

L'ostéocalcine représente 10-20 % des protéines non collagéniques (soit 1-2 mg/g os sec) et se concentre dans les ostéons. Elle a été étudiée en tant qu'alternative au collagène pour la datation et l'étude de l'alimentation de l'organisme disparu. La petite taille et la stabilité diagenétique de cette molécule, en raison de son « emballage » dans l'os (Collins *et al.*, 2000) et son affinité pour le minéral, sont des caractéristiques idéales pour son exploitation par les nouvelles biotechnologies. Les mécanismes de préservation de l'ostéocalcine dans les substrats osseux archéologiques semblent liés à l'affinité de cette protéine pour l'apatite, à l'instar de l'ADN, mais également pour le collagène (Collins *et al.*, 2000). La disparition de cette protéine coïncide en effet avec des modifications extrêmes de la fraction minérale de l'os (histologie peu conservée et forte cristallinité) en général liées à l'activité des micro-organismes. De même, l'ostéocalcine n'est plus détectable si le contenu collagénique original de l'os a disparu de moitié. Si des homologues existent entre l'évolution diagenétique de l'ostéocalcine et celle de l'ADN, cette dernière semble néanmoins plus rapidement dégradée (Buckley *et al.*, 2008).

### ***Autres molécules organiques***

D'autres protéines ont été retrouvées dans les os archéologiques : hémoglobine, albumine, phosphatase alcaline...Mais leur présence et leur persistance dans l'os est encore plus difficile à prédire que celles du collagène et de l'ostéocalcine (Tuross, 1994). De la même façon, certains lipides peuvent également être préservés dans les tissus anciens. Les lipides osseux sont de natures différentes en fonction de la région de l'os concernée (région médullaire, corticale, périoste, épiphyse...) : acides gras libres, acylglycérol, cholestérol et autres stérols...(Collins *et al.*, 2002; Geigl *et al.*, 2004; Stott *et al.*, 1999). Le rapport  $\delta^{13}\text{C}$  peut également être extrait à partir du cholestérol osseux, en complément des études sur le collagène et l'apatite. Les acides gras saturés sont ubiquitaires et ne peuvent servir à identifier une source spécifique. Non comestibles et chimiquement stables, ce sont donc ceux qui sont le plus souvent retrouvés dans les fossiles et leur environnement. L'association de ces biomolécules à une matrice inorganique (sols ou matrice minérale des tissus squelettiques) semble également jouer un rôle fondamental (Geigl *et al.*, 2004).

### ***Éléments traces***

Les profils élémentaires de l'échantillon d'apatite renseignent sur les interactions *post mortem* entre le tissu et les sédiments encaissants aux premiers stades de la diagenèse. Ils sont donc prometteurs pour évaluer la présence possible de l'ADN (ou autre biomarqueur moléculaire), étant donné l'effet des réactions chimiques en solution sur la dégradation de l'ADN (Lindahl et Nyberg, 1972; Lindahl, 1993; Trueman *et al.*, 2008). Pour être pertinente, la concentration en éléments traces dans les tissus étudiés doit prendre en compte la composition des sols (détermination du coefficient de partage entre le cristal et le sol), ce qui est malheureusement, rarement réalisé (Hinz et Kohn, 2010)

La cristallisation d'origine diagénétique des tissus minéralisés est nécessaire tant pour la survie à long terme de l'os que pour la préservation potentielle des macromolécules labiles au sein de l'os. Elle a pour effet de diminuer la réactivité des cristaux biologiques et de combler la porosité initiale du tissu. Toutefois, de profonds remaniements sont la signature d'interactions persistantes entre les fluides et les cristallites (Trueman *et al.*, 2008), ce qui a un effet délétère sur les molécules organiques.

## **4.2 Indices de contamination**

La contamination bactérienne peut être mise en évidence par l'observation microscopique, sous la forme de destructions focales bordées par du tissu hyperminéralisé (Hackett, 1981; Malmstrom, 2005). Ceci a pour conséquence une augmentation de la porosité, et une perte de la structure histologique initiale (Turner-Walker et Jans, 2008). Cette destruction est mise sur le compte des phénomènes de putréfaction dans les premiers stades *post mortem*. Par ailleurs, il est possible de mettre en évidence une contamination d'origine organique par FTIR, sous la forme de vibrations d'élongation des liaisons C-H, distinctes des liaisons des groupements amides du collagène et des autres groupements organiques attribués aux lipides endogènes (voir section suivante).

## **5 Caractérisation physico-chimique de spécimens anciens**

Dans le cadre de ce travail, nous avons initié la caractérisation physico-chimique de spécimens anciens qui proviennent de la collection d'échantillons du laboratoire d'Anthropologie moléculaire de Strasbourg (AMIS, Institut de Médecine Légale, Strasbourg),

la plupart de ces échantillons ayant été testée par l'AMIS en vue de l'extraction d'ADN ancien, dont certains avec succès.

Ces travaux sont inclus ici, sous la forme de l'article que nous avons soumis à la revue *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Grunenwald, A., Keyser, C., Sautereau, A.M., Crubézy, E., Ludes, B., Drouet, C., 2014. Novel contribution on the diagenetic physicochemical features of bone and teeth minerals, as substrates for ancient DNA typing. *Anal. Bioanal. Chem.*).

## **6 Complément : quantification indirecte des carbonates par FTIR**

Que ce soit pour évaluer les propriétés biomimétiques des apatites, ou pour une meilleure compréhension des événements diagénétiques, la caractérisation physico-chimique inclut la quantification du contenu en carbonate. La spectroscopie infrarouge (FTIR) est une technique particulièrement adéquate pour ce faire, dans la mesure où elle utilise très peu d'échantillon, et dans la mesure où les ions carbonate présentent une réponse vibrationnelle clairement identifiable.

Dans la poursuite des travaux sur la caractérisation de spécimens diagénétiques, nous avons discuté plusieurs approches basées sur la spectroscopie FTIR qui pourraient être, ou ont été, utilisées pour la quantification des carbonates.

La méthodologie proposée ici se fonde sur l'analyse des bandes  $\nu_3(\text{CO}_3)$  et  $\nu_1\nu_3(\text{PO}_4)$ . Nous reportons une bonne corrélation entre le rapport d'aire  $r_{c/p}$  entre ces deux contributions et le contenu en carbonate des échantillons ( $R^2 = 0,985$ ), selon la relation suivante :

$$\% \text{ massique CO}_3 = 28,62 * r_{c/p} + 0,0843$$

Cette méthode a été validée grâce au dosage par coulométrie de plusieurs échantillons synthétiques de référence, qui contiennent entre 3 et 7 % massique de carbonate.

Cette méthodologie de quantification des carbonates par FTIR a également été testée avec succès sur deux spécimens squelettiques anciens (deux spécimens osseux et une dent), après élimination de la contribution spectrale du collagène. Une analyse comparative des données FTIR a également permis de démontrer que l'utilisation des aires de pics, et non des hauteurs, conduisait à de meilleures relations de corrélation. De tels traitements des données FTIR sont recommandés pour limiter les erreurs dans l'évaluation du contenu en carbonate des substrats apatitiques.

Ces résultats sont présentés dans l'article Grunenwald, A., Keyser, C., Sautereau, A.M., Crubézy, E., Ludes, B., Drouet, C., 2014. Revisiting carbonate quantification in apatite (bio)minerals: a validated FTIR methodology. *J. Archaeol. Sci.* 49, 134–141.



# Novel contribution on the diagenetic physicochemical features of bone and teeth minerals, as substrates for ancient DNA typing

A. Grunenwald · C. Keyser · A. M. Sautereau ·  
E. Crubézy · B. Ludes · C. Drouet

Received: 9 February 2014 / Revised: 25 April 2014 / Accepted: 28 April 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

**Abstract** The extraction of DNA from skeletal remains is a major step in archeological or forensic contexts. However, diagenesis of mineralized tissues often compromises this task although bones and teeth may represent preservation niches allowing DNA to persist over a wide timescale. This exceptional persistence is not only explained on the basis of complex organo-mineral interactions through DNA adsorption on apatite crystals composing the mineral part of bones and teeth but is also linked to environmental factors such as low temperatures and/or a dry environment. The preservation of the apatite phase itself, as an adsorption substrate, is another crucial factor susceptible to significantly impact the retrieval of DNA. With the view to bring physicochemical evidence of the preservation or alteration of diagenetic biominerals, we developed here an analytical approach on various skeletal specimens (ranging from ancient archeological samples to recent forensic specimens), allowing us to highlight several diagenetic indices so as to better apprehend the complexity of

bone diagenesis. Based on complementary techniques (X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared (FTIR), calcium and phosphate titrations, SEM-EDX, and gravimetry), we have identified specific indices that allow differentiating 11 biological samples, primarily according to the crystallinity and maturation state of the apatite phase. A good correlation was found between FTIR results from the analysis of the  $\nu_3(\text{PO}_4)$  and  $\nu_4(\text{PO}_4)$  vibrational domains and XRD-based crystallinity features. A maximal amount of information has been sought from this analytical approach, by way of optimized posttreatment of the data (spectral subtraction and enhancement of curve-fitting parameters). The good overall agreement found between all techniques leads to a rather complete picture of the diagenetic changes undergone by these 11 skeletal specimens. Although the heterogeneity and scarcity of the studied samples did not allow us to seek direct correlations with DNA persistence, the physicochemical parameters described in this work permit a fine differentiation of key properties of apatite crystals among post mortem samples. As a perspective, this analytical approach could be extended to more numerous sets of specimens so as to draw statistical relationships between mineral and molecular conservation.

---

A. Grunenwald · A. M. Sautereau · C. Drouet (✉)  
CIRIMAT Carnot Institute – Phosphates, Pharmacotechnics,  
Biomaterials, University of Toulouse, CNRS/INPT/UPS,  
ENSIACET, 4 allée Emile Monso, 31030 Toulouse Cedex 4, France  
e-mail: christophe.drouet@ensiacet.fr

A. Grunenwald · C. Keyser  
Institute of Legal Medicine, AMIS Laboratory, CNRS UMR 5288,  
University of Strasbourg, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex,  
France

E. Crubézy  
Molecular Anthropology and Image Synthesis Laboratory (AMIS),  
CNRS UMR 5288, University of Toulouse, 37 allées Jules Guesde,  
31000 Toulouse, France

B. Ludes  
Institute of Legal Medicine, Paris Descartes Medicine Faculty, Paris  
Descartes University, 15 Rue de l'École de Médecine, 75006 Paris,  
France

**Keywords** Bone · Teeth · Diagenesis · Ancient DNA ·  
Apatite · Carbonate content · FTIR · Crystallinity

## Introduction

Deciphering characteristics of extinct organisms and their environment from the preserved features of archeological bone and teeth samples is a challenging task. Valuable data about biological schemes (e.g., concerning diet, climate, etc.) can be retrieved from isotopic or trace elements composition of both the collagenic and mineral parts of skeletal specimens, provided that this composition remains essentially unchanged

over time [1–3]. Molecular preservation could also occur to the point where minute amounts of DNA, as well as peptide fragments, may be extracted and sequenced (e.g., [4–7]). However, diagenesis amends in various manners the physicochemical and molecular features of the skeletal remains, once in their burial environment. In such cases, the authenticity of the biogenic signals may no longer be ascertained and ancient DNA typing may become very problematic or even unrealizable. Nonetheless, ancient DNA studies could successfully be undergone using, as starting materials, some fragments or pieces of skeleton arising from various archeological or forensic research contexts, with a large spatiotemporal distribution, from cold or even temperate environments, over a period of about 600,000 years (e.g., [8–12]).

Therefore, the mechanisms explaining how ancient DNA can be preserved into the sample, and how the biogenic signals could be modified, have to be elucidated. Bone diagenesis mainly depends on three factors: (i) the nature of the skeletal tissue, with emphasis given on the mineral–organic interactions underlying degradation pathways, (ii) the chemistry of the sediments (presence of water, pH, ionic strength, oxidation–reduction potential, etc.), (iii) and physical parameters, especially temperature which is the main factor explaining DNA alteration. Moreover, potential pitfalls of ancient DNA studies result from contamination with modern DNA or coextracted PCR inhibitors.

Among mineralized tissues, compact bone and dentin usually provide the “best” ancient DNA in terms of fragment length, amount, and chemical modifications [13–15]. The mineral phase of both compact bone and dentin is commonly described by a poorly crystalline nonstoichiometric carbonated apatite, representing almost 70 wt.% of the tissue. By contrast, teeth enamel is far much mineralized with 97 wt.% of the composition represented by hydroxyapatite microcrystals resembling closely stoichiometric hydroxyapatite (HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Given the greater thermodynamic stability of stoichiometric HA as compared with nonstoichiometric apatites [16], the enamel material is the most resistant tissue toward diagenetic changes, although substitutions occur in the form of exogenous carbonation and incorporation of traces elements. Contrariwise, bone and dentin mineralization are composed of nonstoichiometric apatite nanocrystals exhibiting a lower thermodynamic stability associated to a greater reactivity. In particular, the surface features are governed by the presence of a very reactive non-apatitic outer layer (containing both ions and water molecules) [17–20], typically leading to a 60-fold greater specific surface area compared with enamel crystals. This non-apatitic hydrated layer is metastable and contains labile ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , etc.) [21, 22]. It thus plays a significant role in ionic exchanges or molecular adsorption processes [23–27]. This exceptional reactivity is thought to act as a premise in DNA

adsorption onto apatite crystals, leading to its long-term preservation [12, 28–31].

The physicochemical processes of apatite diagenesis occur in several stages, driven by thermodynamic stability and solid-solution equilibrium laws [32]. First of all, the metastable non-apatitic hydrated layer progressively disappears during a spontaneous maturation phenomenon, favoring the progressive incorporation of surface labile ions into the apatite core of the nanocrystals (this spontaneous character of apatite maturation has recently been experimentally quantified by Rollin-Martinet et al. [16]). Taking into account the wide substitution possibilities offered by the apatite structure, this may then lead to a significant modification of the apatitic phase composition, with not only the incorporation of ionic species from the hydrated layer, but also possibly that of ions found in the immediate surroundings. This process could then reoccur over the whole taphonomic history of the sample, together with the dissolution–recrystallization of the crystals, whether due to micro-organism activity or to the chemistry of surrounding fluids [32, 33]. In a similar way, the evolution of biological apatites toward a greater stability state may also explain the frequent occurrence of fluorine-rich carbonated hydroxyapatite (francolite) among very old samples [34]. In addition to these chemical modifications, Ostwald ripening (preferential formation of larger, less soluble crystals at the expense of the dissolution of the smallest ones) may also contribute to the changes observed in skeletal specimens during diagenesis [32].

Given the potential protective role of apatite toward DNA, a detailed review of the diagenetic changes of the mineral phase may prove helpful to evaluate the level of bone/tooth alteration, and possibly to predict the preservation state of DNA within old samples. Thus far, a better understanding of diagenetic changes is only achievable by means of extensive physicochemical characterizations using complementary techniques [35]. However, this task is complicated by the composite nature of biological hard tissues, potentially modified by a wide range of diagenetic events, and the small to very small quantities of material available for investigations.

In the present work, a series of physicochemical characterization methods have been used and adapted to the examination of diagenetic specimens. Given the small number of collected samples, arising from a wide variety of spatial and temporal sources (which is frequently the case when dealing with archeological materials), no attempt has been made to express our results in a statistical point of view. We rather focus here on the type of physicochemical information that may be drawn from the use of materials science techniques and of apatite investigation protocols that were already implemented in the field of bone-related biomaterials. The results of the characterization of a dozen of samples arising from various archeological and forensic contexts—which allowed or not DNA extraction—have been studied in order to relate them

with the diagenetic patterns generally observed during the course of taphonomic history. When judged adequate, we then point out some general tendencies noticed among the samples.

## Materials and methods

Skeletal specimens analyzed in this work

In this study, ten bone and teeth specimens (listed in Table 1) originating from diverse geographical areas (for archeological samples, see Fig. 1) and corresponding to a wide datation range (from immediately post mortem to Iron Age) were investigated. The samples were provided by the AMIS laboratory (CNRS, UMR 5288, France) which is involved in ancient DNA studies.

To eliminate surface contamination, the outer surface of the bones was abraded to a depth of 2–3 mm with a sanding machine whereas the teeth were cleaned with bleach, rinsed with ultrapure water, and exposed to UV light for 30 min on each side. Cortical bone pieces and whole teeth were then powdered in a grinder mill under liquid nitrogen using a 6870 SamplePrep Freezer Mills (Fischer Bioblock, Illkirch, France). For each sample, an aliquot of this milled fraction was then subjected to a second milling process (Spex 5710 Freezer Mill) in order to yield finer powdered samples necessary for the physicochemical characterizations.

Synthetic biomimetic apatites used as references

When mentioned in the text, two well-characterized synthetic apatite samples with biomimetic features were used for

comparative purposes. These samples were synthesized by double decomposition starting from calcium nitrate and ammonium hydrogenphosphate (in the additional presence of sodium bicarbonate for the carbonated sample) and matured 1 week in solution, prior to filtering on Büchner funnel, washing with deionized water, and freeze-drying. The complete procedure is available in detail in our previous reports [18, 36]. The carbonated and noncarbonated samples will be referred to in the text as “1w-hac” and “1w-hap.”

DNA extraction and amplification

DNA extraction was carried out according to [37]. Fifteen autosomal STRs (D8S1179, D7S820, D3S1358, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, D5S818, D21S11, CSF1PO, vWA, TH01, TPOX, D18S51, and FGA) and the sex-determining marker amelogenin were then amplified using the AmpFISTRs Identifiler Plus™ kits (Applied Biosystems). PCR conditions were those recommended by the manufacturer except that 34 cycles were used instead of 28. Amplified products were analyzed on a 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies) using the GeneMapper 4.1 software (Life Technologies).

Physicochemical characterization

The amount of organic (mostly collagenic) fraction of the skeletal specimens was estimated by weighing the dried insoluble residue remaining after acidic treatment with HClO<sub>4</sub> 6 M (1 ml for 25 mg of sample; deionized water, 25 ml) until no mineral aggregates were observable. The supernatant was collected by filtration with Acrodisc® syringe filters with

**Table 1** List of bone and teeth samples, with epoch, type, and provenance location

No.	Epoch	Type	Gender/age	Burial site	DNA	Additional information
1	Modern	Femur	Male/57 years old	None	n.t.	Frozen sample after autopsy
2	Modern/forensic	Femur	Female/88 years old	Unknown	n.t.	Surface decomposition, post mortem delay of 3 months
3a	Modern/forensic	Bone	Male	20 years in water	–	Surface sampling of the bone
3b					++	Deep sampling of the bone
4	Iron Age <sup>a</sup>	Bone	Female	Krasnoyarsk region, Russia Egyin Gol	+	S09 [8]
5	Iron Age <sup>b</sup>	Vertebra	Male/adult	Necropolis, Mongolia	+	Grave no. 17. Excavated in late the 1990s [60]
6	Iron Age <sup>b</sup>	Long bone	Unknown	Egyin Gol Necropolis	–	Grave no. 34
7	Third–eleventh century BC	Tooth	Unknown	Atacama desert, Chile	–	Solcor site (Sol 14), pre-Incaic era [61]
8	Middle Age	Tooth	Male/adult	Roeschwoog Alsace, France	+	R3189B
9	Middle Age	Molar tooth	Unknown/immature	Roeschwoog	–	R1051B
10	Twentieth century AD	Femur	Male/adult	War grave	–	

n.t. nontested for ancient DNA, “–” no genetic profile obtained, “+” partial genetic profile, “++” complete genetic profile

<sup>a</sup> Sample 4, 1800–1400 BC

<sup>b</sup> Samples 5 and 6, 3rd c. BC–2nd c. AD



**Fig. 1** Geographical provenance of archeological skeletal samples

nylon membrane (0.45  $\mu\text{m}$ , 25 mm) previously weighed. The filters were dried overnight at 55  $^{\circ}\text{C}$ , and then weighed after cooling at room temperature. The weight difference before and after filtration was used to determine the amount of insoluble proteinic fraction of the sample supposing the total dissolution of the mineral phase.

Chemical analyses run on the supernatants allowed us to determine the calcium and phosphate contents of the mineral phase, respectively via complexometry with EDTA and visible spectrophotometry (determination of the sum of  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{HPO}_4^{2-}$  ions, using the phospho-vanado-molybdenic method). Details on these chemical titrations have already been described previously [38, 39].

The eventual presence of secondary elements within the skeletal specimens was checked by EDX analyses using LEO435VP scanning electron microscope operated at 15 keV, 1.5 nA.

Powder X-ray diffraction (XRD) was used for crystallized phase identification using an INEL CPS 120 curved-counter diffractometer with the monochromatic  $\text{CoK}\alpha$  radiation ( $\lambda_{\text{Co}}=1.78892 \text{ \AA}$ ).

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analyses of the specimens were performed on a Perkin Elmer 1700 spectrometer (64 scans; resolution, 4  $\text{cm}^{-1}$ ), using the KBr pellet method. Different spectral features were then examined for gaining insight on relative amounts of chemical vibrating

species and also for studying the local chemical environments of the ions constituting the mineral phase present in the specimens. In a preliminary step, the vibrational contribution of the collagenic fraction present in various residual amounts in the specimens was subtracted thanks to the OMNIC 8 software, using a typical bone collagen sample from our collection.

1. The presence of vibration bands attributable to carbonate species was used—in correlation with carbonate apatite standards for which the level of carbonation was previously checked by coulometry (UIC, Inc. CM 5014 coulometer with CM 5130 acidification unit)—to evaluate the amount of  $\text{CO}_3^{2-}$  ions associated to the apatite mineral. To this aim, the integrated intensity of the  $\nu_3(\text{CO}_3)$  band (between 1,530 and 1,340  $\text{cm}^{-1}$ ) was divided by the integrated intensity of the  $\nu_3(\text{PO}_4)$  domain between 1,230 and 890 and the obtained ratio was compared with the ones found for the standards. This analysis was especially made possible thanks to the preliminary subtraction of the collagen spectral contribution until zeroing the amide vibrations in the 1,930-to 1,215- $\text{cm}^{-1}$  domain. The analytical reproducibility was checked by performing the same quantification method in triplicate. The standard deviation of the carbonate content evaluated for one sample on the same spectra ranges between 0.07 and 0.4.

2. The  $\nu_2\nu_4(\text{PO}_4)$  band, a large absorption ranging from 400 to 800  $\text{cm}^{-1}$ , was treated by spectral decomposition using the ORIGIN 8.1 software. After subtraction of the collagen residual absorption, the vibrational contribution of specific bands previously identified in nanocrystalline apatitic compounds was added in the mathematical fit, considering the overall absorption band as a sum of Lorentzian peaks (expect for the minor  $\nu_2(\text{PO}_4)$  contribution which was more adequately fitted to a Gaussian curve). Data reported by Vandecandelaere et al. [36] as well as anterior studies [18, 22, 32, 40] served as starting point for the positioning of each contributing band existing in this spectral domain: at 470  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to  $\nu_2(\text{PO}_4^{3-})$ , 530–534  $\text{cm}^{-1}$  (non-apatitic  $\text{HPO}_4^{2-}$ ), 550  $\text{cm}^{-1}$  (apatitic  $\text{HPO}_4^{2-}$ ), 560/575  $\text{cm}^{-1}$ /601  $\text{cm}^{-1}$  (apatitic  $\text{PO}_4^{3-}$ ), 617  $\text{cm}^{-1}$  (non-apatitic  $\text{PO}_4^{3-}$ ), 631  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_L(\text{OH}^-)$ ), and 670  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{H}_2\text{O}$  libration mode). Ratios of integrated intensities were then used to follow the evolution of each spectral contribution, taking the sum of apatitic phosphate bands as a reference.
3. The  $\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$  band, expanding from 1,230 to 890  $\text{cm}^{-1}$  was already shown [21] to be constituted by a large number of contributions for which the exact nature is still not well known. However, some contributions have been shown to be related to the more or less mature state of the apatite phase and to surface, non-apatitic, phosphates. Fourier self-deconvolution (OMNIC 8) was employed here to potentially amplify these contributions. To this aim, the parameters  $\sigma \sim 22 \text{ cm}^{-1}$  and  $k=2.1$  (except for sample 3a,  $k=1.5$ ) were used.

To facilitate the reading of this paper, Table 2 summarizes the principal parameters/indexes that will be followed along this manuscript, as well as their relationship with physico-chemical properties.

## Results and discussion

### XRD analyses

XRD analyses were run on each specimen for phase identification (Fig. 2) as well as an evaluation of degrees of crystallinity. All samples were found to exhibit similar diffraction patterns, in which all peaks could be indexed in reference to the apatite structure (JCPDS card no. 09-432). No crystallized secondary phase was detected. For the sake of comparison, the patterns obtained on two previously characterized synthetic bone-mimicking apatites (1w-hac and 1w-hap) were also added in Fig. 2.

The mean dimensions of the crystallites have been evaluated from application of Scherrer's formula from the full-width at half maximum (FWHM) of the diffraction peaks (002) and (310).

This led to an estimation of, respectively, the mean length of the crystals in *c*-axis, and an averaged response between width and thickness of the apatite crystals [36]. The crystallite dimensions of the skeletal specimens were found to range between 20 and 27 nm along the *c*-axis, and between 7 and 17 nm in perpendicular direction (width/thickness response). The presence of larger crystallites in teeth samples could be assessed, due to an additional enamel contribution, leading to modifications for both (002) and (310) responses. It was not possible, however, from the sole analysis of mean crystallite lengths to discriminate the samples according to their nature (bone or teeth) or their age. As previously described for synthetic apatites matured for various amounts of time (e.g., [41, 42]), the growth of the crystals along the *c*-axis is indeed often less significant in the differences observed upon aging of the crystals. A significantly greater effect was in contrast seen on the (310) FWHM, with values between 13 and 17 nm for teeth as opposed to significantly thinner (7–8.5 nm) for bone crystallites. The mean crystalline dimensions of the two synthetic samples (1w-hap and 1w-hac) have also been estimated in a similar way as above, leading to lengths/widths (in nanometers) of 24.3/8.8 and 15.7/4.9, respectively. It shows that the former sample could more adequately be used to mimic “physical” features of bone apatites (via similar particle size) whereas the latter (which is carbonated) could more adequately mimic their “chemical” features.

Figure 2 also points out differences in the resolution of XRD patterns, depending on the samples, and this observation may be related to different degrees of crystallinity. The quantification of crystallinity is a rather difficult task for such patterns corresponding to rather poorly organized systems. This difficulty lies especially in the multiplicity of influential factors including particle size and crystal disorder (e.g., presence of ion vacancies) [36]. Person et al. [43] have nonetheless proposed a crystallinity index (CI) based on peak selected heights: the existence of this index may indeed prove helpful for comparative purposes, and it has already been used for skeletal specimens (e.g., [43–45]). The value of CI was measured in the present work according to Person's procedure. The OriginPro 8 software was used to perform baseline correction between 31.5° and 50° ( $2\theta$  values relative to the  $\text{CoK}\alpha$  radiation) and to determine the heights *H* of the four diffraction peaks—ranging between 34.5° and 40.5°—with the following relationship:

$$\text{CI} = [H(202) + H(300) + H(112)]/H(211)$$

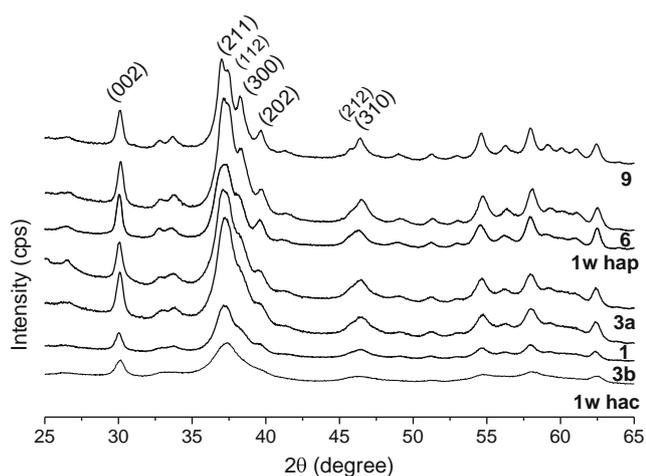
As may be expected, teeth samples were found to exhibit the highest CI values (0.27–0.37), compared with bone samples which were noticeably less well crystallized, with CI ranging from 0.02 to 0.11 (see values in Table 3). As predictable, the modern bone sample corresponds to the lowest CI. No significant difference among bone samples could however

**Table 2** Summary of bone/teeth diagenetic indexes of apatite and collagen used in this work

Diagenetic indexes	Formulas	Measured property	References
<b>XRD parameters</b>			
CI	$CI = [H(202) + H(300) + H(112)] / H(211)$	Linked to the degree of crystallinity of calcium phosphate apatite	Person et al. [43]
FWHM (002) FWHM (310)	$L(hkl) = \frac{0.94\lambda}{\cos\theta\sqrt{\Delta_{\text{sample}}^2 + \Delta_{HA}^2}}$ where $\Delta_{\text{sample}}$ and $\Delta_{HA}$ are the FWHM of the (hkl) peak for the sample and for sintered stoichiometric hydroxyapatite, respectively	Mean crystallite dimension in the considered dimension ( <i>keeping in mind however that crystalline disorder may also affect XRD peak broadening</i> )	Scherrer [62]
<b>FTIR parameters</b>			
$\nu_3(\text{CO}_3)/\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$	$A(1,530-1,330)/A(1,230-890)$	Linked to the wt.% $\text{CO}_3$	This study
$\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$ analyzed via self-deconvolution (apodization)	“Peripheral” maxima (1,115/1,110 and 1,020 $\text{cm}^{-1}$ ) “Central” maxima (1,090/1,095 and 1,030 $\text{cm}^{-1}$ )	Mineral maturity as in poorly crystalline apatite (non-apatitic phosphates) Mineral maturity as in well-crystallized stoichiometric apatite (apatite phosphate)	Rey et al. [21], Paschalis et al. [63], Farlay et al. [52], and this study
$\nu_4(\text{PO}_4)$ analyzed via spectral decomposition (curve-fitting)	See formulae in text	Semiquantitative analysis of apatitic and non-apatitic $\text{HPO}_4$ and apatitic OH	Vandecandelaere et al. [36]
Coll/ $\text{PO}_4$	$A(1,720-1,600)/(1,220-900)$	Linked to collagen content	Sosa et al. [35]
<b>Other data relative to organic content</b>			
% “CP”	Weight of residual matter after filtration of acid-dissolved material	Acid-insoluble organic matter content (mainly collagen part; +possibly traces of residual mineral protected from acidic dissolution by the organic matrix)	This study
<b>Calcium and phosphate titrations</b>			
Ca/P	Ca (mmol)/P (mmol)	Departure from stoichiometry (if lower than 1.67)	Elliott [64]
Ca/(P+C)	Ca (mmol)/(P (mmol)+C (mmol))		Drouet [65]

Numbers in parentheses give the approximate positions of the peaks/bands in radians or wavenumbers, respectively

CI crystallinity index, H height of XRD peaks, A area of the FTIR bands



**Fig. 2** XRD patterns of diagenetic samples no. 1 (modern/autopsy), no. 3a and 3b (outer and inner part of bone), no. 6 (Iron Age bone), and no. 9 (medieval teeth), as compared with a synthetic nanocrystalline apatite, maturation time of 1 week, carbonated (*1w-hac*), and noncarbonated (*1w-hap*). Line attribution according JCPDS 09-432 (apatite)

be determined: for instance, the Iron Age sample no. 4 exhibits the same CI value as sample no. 10, dating from the early twentieth century. These two samples have in contrast lower CI than the forensic samples no. 3a and 3b, which have experienced particular taphonomic history by staying 20 yrs in water. Our findings thus suggest that the taphonomic history, rather than age, appears as a particularly significant diagenetic parameter, affecting post mortem evolution of the biological apatite; and this is in perfect agreement with previous reports [43, 46].

At this point, it appeared interesting to seek potential correlations between these CI values and the previously estimated mean crystallite dimensions. Interestingly, a good correlation ( $R^2=0.96$ ) was reached when plotting CI vs. crystallite widths (determined from (310) FWHM). As expected from our above findings, a significantly lower correlation was found ( $R^2=0.25$ ) for CI vs. mean lengths.

**Table 3** Synthesis of the quantitative and semiquantitative data arising from physicochemical characterization of modern, forensic, and archeological samples (bones and teeth)

No.	Epoch	% "CP"	Coll/PO <sub>4</sub>	%CO <sub>3</sub> area ratio	Ca/P	Ca/(P+C)	CI	Adj R <sup>2a</sup>	Formula <sup>c</sup>
1	Modern/autopsy	32.3	0.29	5.4	1.72	1.49	0.020	0.9984	Ca <sub>8,9</sub> □ <sub>1,1</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4,9</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>0,3</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>0,8</sub> (OH) <sub>0,9</sub> □ <sub>1,1</sub>
2	Modern/forensic	15.6	0.35	6.3	1.83	1.50	0.031	0.9986	Ca <sub>9,0</sub> □ <sub>1,0</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>5,0</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>1,0</sub> (OH) <sub>1,0</sub> □ <sub>1,0</sub> <sup>b</sup>
3a	Modern/forensic	23.2	0.35	6.6	1.48	1.33	0.043	0.9988	Ca <sub>8,0</sub> □ <sub>2,0</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4,0</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>1,4</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>0,7</sub> □ <sub>2,0</sub> <sup>b</sup>
3b		33.6	0.30	4.8	1.58	1.39	0.044	0.9972	Ca <sub>8,3</sub> □ <sub>1,7</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4,3</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>1,0</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>0,7</sub> (OH) <sub>0,3</sub> □ <sub>1,7</sub>
4	Iron Age	n.a	0.38	5.3	1.62	1.37	0.038	n.a.	Ca <sub>8,4</sub> □ <sub>1,6</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4,4</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>0,8</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>0,8</sub> (OH) <sub>0,4</sub> □ <sub>1,6</sub>
5	Iron Age	28	0.27	7	1.82	1.51	0.107	0.9997	Ca <sub>8,9</sub> □ <sub>1,1</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4,9</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>1,1</sub> (OH) <sub>0,9</sub> □ <sub>1,1</sub>
6	Iron Age	27.7	0.34	6.2	1.80	1.48	0.064	0.9971	Ca <sub>9,1</sub> □ <sub>0,9</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>5,1</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>1,0</sub> (OH) <sub>1,1</sub> □ <sub>0,9</sub>
7	IIIe–XIe s. av. JC	16	0.19	2.8	1.55	1.38	0.353	0.9993	Ca <sub>8,6</sub> □ <sub>1,4</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4,6</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>0,9</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>0,4</sub> (OH) <sub>0,6</sub> □ <sub>1,4</sub>
8	Middle Age	11.2	0.15	3.7	1.59	1.38	0.372	0.9995	Ca <sub>8,6</sub> □ <sub>1,4</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4,6</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>0,8</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>0,6</sub> (OH) <sub>0,6</sub> □ <sub>1,4</sub>
9	Middle Age	11.2	0.18	6.4	1.67	1.37	0.274	0.9997	Ca <sub>8,4</sub> □ <sub>1,6</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4,4</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>0,6</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>0,9</sub> (OH) <sub>0,4</sub> □ <sub>1,6</sub>
10	XXe s. ap. JC	n.a.	0.34	4.7	1.56	1.34	0.038	n.a.	Ca <sub>8,3</sub> □ <sub>1,7</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4,3</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>1,0</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>0,7</sub> (OH) <sub>0,3</sub> □ <sub>1,7</sub>

% "CP" fraction of acid-insoluble organic matter, considered as the collagenic part (CP) of the bone, Coll/PO<sub>4</sub> ratio between areas under the curve of the amide I band of collagen (between 1,720 and 1,600 cm<sup>-1</sup>) and of the ν<sub>3</sub>ν<sub>1</sub>(PO<sub>4</sub>) band (between 1,220 and 900 cm<sup>-1</sup>), %CO<sub>3</sub> area ratio (the reader is referred to the article content for detailed description), CI Crystallinity Index

<sup>a</sup> Adjusted R<sup>2</sup> coefficient resulting of the curve-fitting of the ν<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>) domain

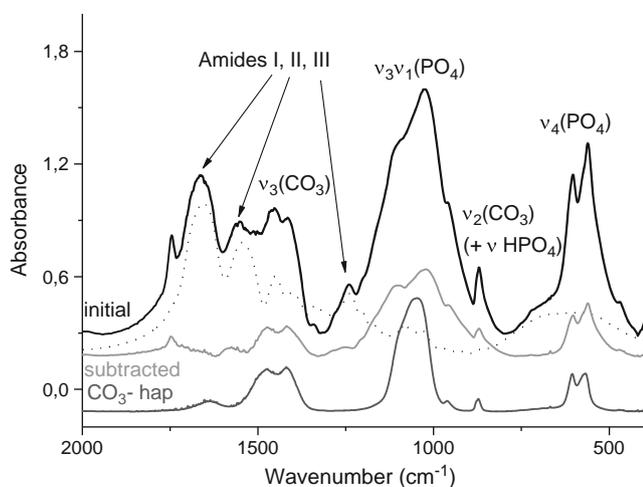
<sup>b</sup> Corrected to avoid value <0

<sup>c</sup> Where the symbol "□" denotes an ion vacancy (either in Ca crystallographic sites or in OH sites)

## FTIR spectroscopy analyses

### Carbonate content

Direct estimation of the carbonate content by coulometry was not possible for the majority of samples studied here, given the low amount of available matter. The infrared signature of carbonate species was thus exploited to evaluate the samples



**Fig. 3** Infrared spectra with band attribution. (1) Biological bone samples (sample no. 1, *black line*) showing both collagenic patterns and domains attributable to carbonated apatite, namely ν<sub>3</sub>(CO<sub>3</sub>), ν<sub>3</sub>ν<sub>1</sub>(PO<sub>4</sub>), ν<sub>2</sub>(CO<sub>3</sub>), and ν(HPO<sub>4</sub>), ν<sub>4</sub>ν<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>), with indication of amides I, II, and III vibrations. (2) Collagen sample (*dotted curve*), with indication of amides I, II, and III vibrations. (3) Example of a resulting spectrum (*light gray line*) after spectral subtraction of the collagen vibration bands. (4) Synthetic carbonated apatite (*dark gray line*) with 12 wt.% CO<sub>3</sub>, showing only apatitic vibration bands

carbonation level, after spectral subtraction of the collagen amide vibrations overlapping the carbonate domain ν<sub>3</sub>(CO<sub>3</sub>).

The spectral subtraction of the collagen domain then permitted to draw resulting spectra, which were judged satisfactory in terms of global appearance as compared with usual synthetic carbonated apatites (see Fig. 3). Interestingly, the ν<sub>3</sub>ν<sub>1</sub>(PO<sub>4</sub>) and ν<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>) domains were in fact only affected around the base of the absorption bands, without alteration of their general shape; these bands may thus be used for quantification purposes.

After the collagen spectrum subtraction process, the areas under the curve of the entire ν<sub>3</sub>(CO<sub>3</sub>) domain (range, 1,530–1,330 cm<sup>-1</sup>) and of the ν<sub>3</sub>ν<sub>1</sub>(PO<sub>4</sub>) domain (between 1,230 and 890 cm<sup>-1</sup>) were thus measured, as illustrated on Fig. 3. The carbonate-to-phosphate band area ratio was next quantitatively correlated with the carbonate content of the specimens, using a calibration curve built from separately prepared carbonated apatite standards (results to be published). By means of this method, the carbonate content of the diagenetic samples as well as of our modern reference specimen was evaluated. These carbonate contents were found to be comprised in the range 4–8 wt.% (Table 3), which is consistent with previous data on the carbonation rate of biological apatites [47–49]. An advantage of this method is that it is based on a comparison of bands area (integrated intensity) rather than on peak height (raw intensity). Moreover, in contrast to other FTIR-based ratio aiming at evaluating carbonate contents, the best correlation coefficient (R<sup>2</sup>=0.9998) of the linear regression analysis is obtained when plotting the calculated area ratio ν<sub>3</sub>(CO<sub>3</sub>)/ν<sub>3</sub>ν<sub>1</sub>(PO<sub>4</sub>) with the carbonate content of the apatite

standards. Other area ratios, previously used in other works [35, 45, 50], such as  $\nu_3(\text{CO}_3)/\nu_4(\text{PO}_4)$  and  $\nu_2(\text{CO}_3)/\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$ , are found to be less correlated ( $R^2=0.994$  and  $0.864$ , respectively).

It may also be noted that a possible bias in such transmission FTIR-based carbonate quantifications could arise from the fact that they inform on average carbonate contents (global analysis) and do not refer to specific zones within each specimen. Indeed, Lebon et al. [46] has pointed out a great heterogeneity in carbonate content distribution among a given sample, especially around Haversian canals, where carbonate impurities may accumulate (thus with some carbonate ions not being solely incorporated into the apatite lattice).

Attempts have then been made to correlate these FTIR parameters with the XRD findings. Previous diagenetic studies [43, 46] found a correlation between CI values and the  $\text{CO}_3$  content (the  $\text{CO}_3$  content decreasing with increasing crystallinity). However, in the present work, no clear correlation existed between these two parameters, even if taking into account only bone samples (in order to avoid the contribution of enamel hydroxyapatite microcrystals in this estimation). These differing results may chiefly depend on the heterogeneity in the burial context of these bone specimens, whether terrestrial or aquatic, which could alter the specimens via various pathways. Diagenetic alteration of the  $\text{CO}_3$  content is obviously site-specific [32, 51]. Moreover, observations on synthetic and diagenetic bone apatite (e.g., francolite) point toward agreement between high carbonate content and a high crystalline organization. In synthetic apatite compounds,  $\text{CO}_3$  content tends to increase spontaneously along with the maturation of the crystals [32], by interacting with atmospheric carbon dioxide.

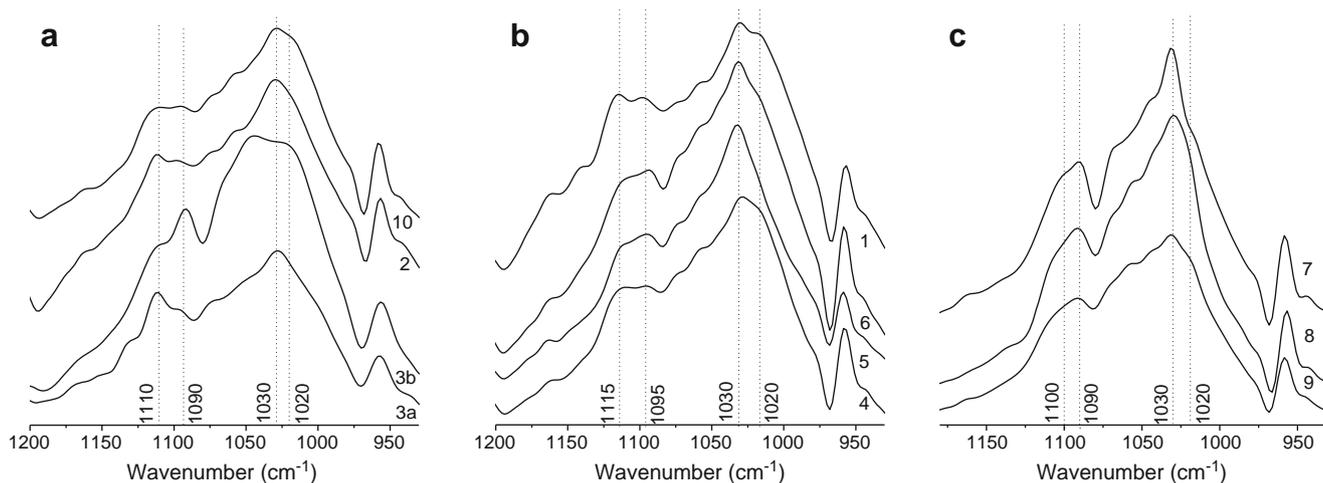
#### *Investigation of the $\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$ domain (Fourier self-deconvolution)*

Additional information on apatitic compounds may also be provided by focusing on the  $\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$  domain, which may be considered as composed of a low-wavenumber component and a high-wavenumber component (splitting around  $1,085$ – $1,080\text{ cm}^{-1}$ ). Tooth (Fig. 4c) and bone patterns (Fig. 4a, b) are well discriminated and resemble those of enamel and bone, as described by Rey et al. [21] respectively.

The low-wavenumber domain can be mainly described by two maxima at  $1,030$  and  $1,020\text{ cm}^{-1}$ . The relative intensities of these two maxima have previously been correlated to the maturation degree of the sample [21], and the peak at  $1,030\text{ cm}^{-1}$  becoming more significant for mature systems. No attempt has been made here to quantify the mineral maturation state based on the  $1,030/1,020$  intensity ratio, contrarily to ref. [35], nor the  $1,030/1,110\text{ cm}^{-1}$  area ratio [52], as we noticed that the  $\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$  domain was particularly sensitive to the nonuniform granulometry of the samples, thus leading to a

lack of precision of the vibration domain [53]. Nonetheless, qualitative analysis of the spectra in this range provides valuable data about the maturation state of the samples. All diagenetic bone specimens studied here exhibited a maximum intensity at  $1,030\text{ cm}^{-1}$ , with absorption at  $1,020\text{ cm}^{-1}$  appearing as a shoulder, as described for well-mineralized enamel [21]. This observation is consistent with the general trend of the maturation process observed on biological and synthetic apatite [21]. Only the modern sample (sample no. 1, Fig. 4b), the closest to freshly precipitated apatite, exhibits a higher intensity at  $1,020\text{ cm}^{-1}$ , which is attributed to phosphate ions in nonstoichiometric apatites and in the most immature synthetic apatites (type B carbonate and  $\text{HPO}_4^{2-}$ -containing apatites), thus probably indicating the persistence of vacancies. Intermediate profiles are obtained for forensic bone samples, exhibiting both maximum at  $1,030\text{ cm}^{-1}$  and a clear band at  $1,020\text{ cm}^{-1}$ . This hybrid pattern could be related on an intermediate state of maturation, or on a coexistence of well-crystallized and poorly crystalline materials within the same sample. At a microscopic level, diagenetic modifications may indeed vary within a given specimen [46]. However, the concordance of this  $1,030/1,020\text{ cm}^{-1}$  pattern with the high collagenic content and the high DNA yield in sample no. 3b (Fig. 4a) is consistent with an exceptional preservation state of both organic and inorganic contents (potentially cooperating to protect each other from degradation factors). Among teeth samples, a slight difference is identified between the two medieval teeth (no. 8 and 9, Fig. 4c) with a larger contribution at  $1,020\text{ cm}^{-1}$  for sample no. 9. This observation might be related to the more immature state of the latter, but anatomohistological analyses would be required to confirm this conclusion. By contrast, the Chilean tooth powder (sample no. 7, Fig. 4c) exhibits similar features to fully mineralized enamel [21]. These results, obtained for teeth samples no. 7, 8, and 9, are in accordance with XRD data mentioned above, where greater CI values were obtained for samples no. 7 and 8 (respectively  $0.35$  and  $0.37$ ) as opposed to sample no. 9 ( $0.27$ ).

In the high-wavenumber domain ( $1,150$ – $1,080\text{ cm}^{-1}$ ), the modern sample (sample no. 1, Fig. 4b) is characterized by a broad pattern composed of several maxima especially at around  $1,115$  and  $1,095\text{ cm}^{-1}$ . In freshly precipitated synthetic apatites, a fairly large number of contributive bands have been pointed out in the literature [21]; whereas in biological apatites (bones and teeth), two main maxima at  $\sim 1,110$  and  $1,095\text{ cm}^{-1}$  were reported at the expense of other bands. In the present study, some variation in the relative intensities of the two maxima was noticed among the samples. For instance, among archeological bone specimens (Fig. 4b), samples no. 5 and 6 (Egyin Gol site) showed a more intense absorption at  $1,095\text{ cm}^{-1}$ , in contrast to sample no. 4 (Krasnoyarsk site) exhibiting a more pronounced intensity at  $1,115\text{ cm}^{-1}$ . For teeth samples (samples no. 7, 8, and 9, Fig. 4c), the absorption around  $1,095\text{ cm}^{-1}$  is clearly dominant, despite a shift of the



**Fig. 4** FTIR patterns of  $\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$  bone and teeth samples, after self-deconvolution posttreatment (Happ–Genzel apodization), exhibiting two distinct domains, in the low-wavenumber range (1,080–970  $\text{cm}^{-1}$ ) and in

the high-wavenumber range (1,190–1,080  $\text{cm}^{-1}$ ). **a** Forensic bone samples and early twentieth century bone sample. **b** Modern and Iron Age bone samples. **c** Teeth samples

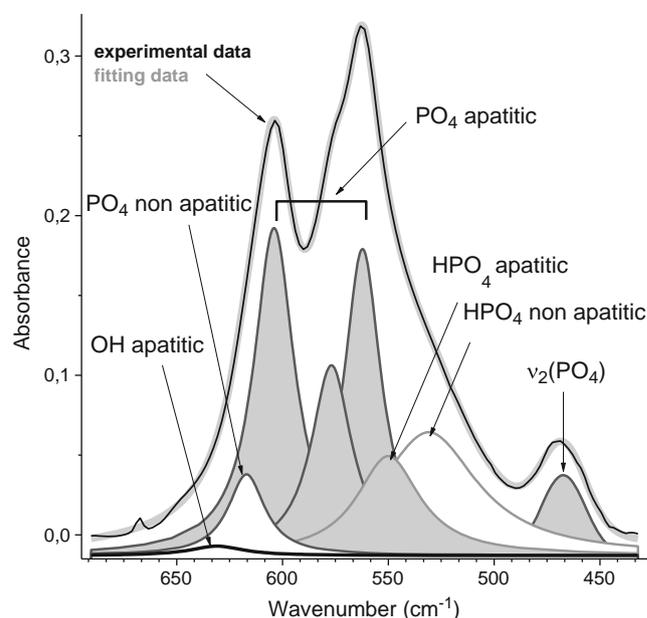
maximum from 1,095 to 1,090  $\text{cm}^{-1}$ , probably due to the contribution of enamel [21]

The 1,110–1,115  $\text{cm}^{-1}$  band has been shown to be correlated with non-apatitic phosphate environments contributing in the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  domain [21, 22]. However, a bias in the determination of the relative intensity of both 1,110–1,115 and 1,095  $\text{cm}^{-1}$  could originate from the high carbonation rate of apatite, which is the case of our samples as previously mentioned. The carbonate content indeed tends to broaden the 1,095- $\text{cm}^{-1}$  band with an eventual contribution in the  $\sim 1,110\text{-cm}^{-1}$  domain. Substitutions of phosphate by carbonate ions also tend to inhibit the maturation process of the crystals, which could promote the persistence of metastable phosphates in non-apatitic environments and therefore explain the presence of strong absorption at  $\sim 1,110\text{ cm}^{-1}$ . In samples no. 1 (Fig. 4b) and 10 (Fig. 4a), both 1,110 and 1,020  $\text{cm}^{-1}$  absorptions are rather intense, which clearly indicates a low maturation state. Conversely, it is less straightforward to conclude about the ratio of these bands for the other forensic bone samples (e.g., samples no. 2 and 3a, Fig. 4a), exhibiting at the same time mature mineral feature (i.e., unique maximum at 1,030  $\text{cm}^{-1}$  in the low-wavenumber range) and young mineral feature (i.e., intense band at  $\sim 1,110\text{ cm}^{-1}$ ). This matter of fact might be assignable to existing heterogeneities within the specimens; also, the contribution of vibrations from organic contaminants for samples no. 2 and 3a cannot be excluded, which may be related to two domains on their FTIR spectra, in the range 3,000–2,800  $\text{cm}^{-1}$  and in the range 1,600–1,500  $\text{cm}^{-1}$  (see Fig. 6b).

#### Curve fitting in the $\nu_4(\text{PO}_4)$ domain

In order to draw complementary information on the apatitic phase contained in the diagenetic specimens analyzed in this work, the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  domain was also specifically explored.

Considering the contribution of organic matter in the range 900–400  $\text{cm}^{-1}$ , the investigation of the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  for our biological samples was performed after spectral subtraction of collagen (as was done above for the  $\text{CO}_3$  content determination). We then applied the curve fitting protocol that was previously established for synthetic apatites [36], allowing one to identify apatitic and non-apatitic-phosphate environments as well as apatitic hydroxide ions. The adjusted  $R$ -square (adj.  $R^2$ ) obtained after curve-fitting was systematically comprised between 0.997 and 1.000 (Table 3). A typical example of fitting result is shown on Fig. 5 (case of the tooth sample no. 7).



**Fig. 5** Spectral decomposition of the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  infrared domain for teeth sample no. 7 with attribution of the different contributions. Except for the  $\nu_2(\text{PO}_4)$ , all curves are considered as Lorentzian

Insights on the maturation state of the apatite phase can in particular be assessed from the relative proportion of phosphate-bound vibrations assigned to non-apatitic environments (also called “labile”) relatively to apatitic ones. The presence of apatitic OH<sup>-</sup> ions can also be inferred (and bring valuable data on the composition and consequently on the stoichiometry of the apatite samples) from the observation of a contribution at 632 cm<sup>-1</sup>.

Based on the integrated intensities obtained via curve fitting of this  $\nu_4(\text{PO}_4)$  domain, we drew semiquantitative information about ionic species for which direct titration or analyses were impossible or delicate. The relative amount of such ionic species were expressed as a ratio of integrated intensities, respectively denoted R(OH), R(HPO<sub>4</sub>)<sub>ap</sub> and R(HPO<sub>4</sub>)<sub>non</sub> (ap for apatitic, non for non-apatitic), defined as:

$$R(\text{OH}) = \frac{\text{OH}_{\text{ap}}}{\text{OH}_{\text{ap}} + \text{PO}_{4\text{ap}} + \text{HPO}_{4\text{ap}}}$$

$$R(\text{HPO}_4)_{\text{non}} = \frac{\text{HPO}_{4\text{non}}}{\text{PO}_{4\text{ap}} + \text{PO}_{4\text{non}} + \text{HPO}_{4\text{ap}} + \text{HPO}_{4\text{non}}}$$

$$R(\text{HPO}_4)_{\text{ap}} = \frac{\text{HPO}_{4\text{ap}}}{\text{PO}_{4\text{ap}} + \text{PO}_{4\text{non}} + \text{HPO}_{4\text{ap}} + \text{HPO}_{4\text{non}}}$$

On the basis of a previous work [54], a correlation study was performed by comparing these semiquantitative infrared data with XRD data, i.e., CI, (002) and (310) FWHM. Note that, in the following results, the data relative to sample no. 3b were not taken into account, this sample being found to depart from the general trend, possibly due to inadequate curve fitting indicated by a low adj.  $R^2$ .

Interestingly, a linear-like correlation (slope denoted “ $a$ ”) was found by plotting CI values against the R(OH), R(HPO<sub>4</sub>)<sub>ap</sub>, and R(HPO<sub>4</sub>)<sub>non</sub> ratios, with  $R^2$  ranging between 0.64 and 0.78 (see Table 4). The best correlation was found in the case of R(HPO<sub>4</sub>)<sub>non</sub> relative to non-apatitic hydrogenphosphate groups, and the negative slope may indeed be expected (better crystallized systems being closer to stoichiometry, thus containing less non-apatitic ions). These

findings strongly support the association existing between maturation and crystallinity state [52] within apatitic compounds, which is thus also applicable to diagenetic specimens. Indeed, the hydrated layer tends to disappear along with the maturation process, which is accompanied by an increase in crystallinity (degree of lattice organization).

In contrast to Miller et al., no clear correlation was evidenced between FWHM of the (002) diffraction line and acid phosphate content ( $R^2 < 0.4$ ), and between (002) FWHM and OH content ( $R^2 \sim 0.5$ ). As mentioned previously, the (002) widths seem to be a less discriminative parameter than the (310) widths to assess the crystallinity state of our samples. For the latter,  $R^2$  values are found to be higher in correlation analyses of R(OH) and (HPO<sub>4</sub>)<sub>non-apatitic</sub>, respectively 0.7 and 0.65, but an equally poor relationship is found for apatitic HPO<sub>4</sub> ratio. One shall consider that apatitic hydrogenphosphates are less representative of the maturation process, as these species do not belong to the hydrated layer. By contrast, due to the importance of substitutions in trivalent anionic site by bivalent ions (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> and HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), compensated by vacancies in the OH site, the presence of hydroxide ions are a well-known feature of better crystallized apatites.

These correlative XRD/FTIR results may thus be seen as a validation of our spectral decomposition protocol (with spectral subtraction of collagen). The positive or negative sign of the various slopes “ $a$ ” found in Table 4 are perfectly consistent with expected relationships between crystallinity and maturity state.

## Chemical analyses

### Estimation of the organic content

The organic content contained in most specimens was estimated by weighing the acid-insoluble fraction of the samples collected during filtering. Theoretically, the insoluble phase is thought to represent only organic material and, in particular, the collagenic part (CP) of the tissue. Nonetheless, the solutions aspects before filtration were evocating a complex mixture of gelatinous compound and other impurities. This gravimetric analysis was however performed to draw a first approximation of the organic content within the samples.

As summarized in Table 3, the supposed organic fraction (% CP) was found to account for 11.2 to 33.6 wt.% of the samples, with no clear dependence with the age of the sample. The organic fractions of the teeth samples (11–16 wt.%) were, as expected, low compared with most bone specimens because the teeth powders included dentin and cementum materials but also enamel, the latter containing minute amount of organic material. The lower values of organic amounts observed for some bone samples (e.g., no. 2 and 3a) are consistent with the loss of organic matter preferentially degraded during early diagenesis stages, in relation to the initial

**Table 4** Summary of parameters of the linear fits (slope “ $a$ ” and correlation coefficient  $R^2$ ) obtained by plotting XRD data (columns), namely CI, (002) FWHM, and (310) FWHM, against FTIR intensity ratios from the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  domain, namely R(OH), R(HPO<sub>4</sub>)<sub>non</sub>, and R(HPO<sub>4</sub>)<sub>ap</sub> (rows)

Ratio of integrated intensities	R(OH)	R(HPO <sub>4</sub> ) <sub>non</sub>	R(HPO <sub>4</sub> ) <sub>ap</sub>
CI	$a=0.36;$ $R^2=0.6665$	$a=-0.73;$ $R^2=0.7853$	$a=0.25;$ $R^2=0.6423$
(002) FWHM	$a=-1.13;$ $R^2=0.492$	$a=1.86;$ $R^2=0.3896$	$a=-0.7;$ $R^2=0.3743$
(310) FWHM	$a=-0.18;$ $R^2=0.7204$	$a=0.31;$ $R^2=0.6532$	$a=-0.1;$ $R^2=0.3578$

proportions of the collagen part into these skeletal samples. Instead, the modern “reference” bone no. 1—sampled after autopsy and stored frozen—, exhibits a value of ~32 wt.%, corresponding to the expected value for a modern compact bone sample. It is not surprising to find rather similar organic contents for the “old” samples from Egyin Gol site in Mongolia, where good preservation conditions were assured. It points in particular to the crucial role of environmental temperature in the preservation of the sample. The degradation of the specimen is probably more dependent on the initial postmortem conditions than on datation itself. Also, the surface of a sample may become more degraded than internal parts due to direct contact with surrounding media (this can for example explain the difference observed between samples 3a and 3b). The lowest bone organic fraction is found in this study for the forensic sample no. 2 which experienced very drastic diagenetic conditions, evidenced by a visible surface decomposition of the femoral specimen. The effect of temperature has also been discussed in the scope of ancient DNA studies [55]. Although successful DNA retrieval could be achieved for samples which have remained in cold to temperate environments (as for the Roeschwoog teeth, sample no. 8), ancient DNA extraction generally failed for hot climate field studies (e.g., the tooth of Solcor, sample no. 7), even though organic matter seemed to be preserved. The discrepancy noticed for ancient DNA availability between the two Mongolian samples (samples no. 5 and 6) illustrates that temperature is however not the only factor involved in DNA degradation. In addition, the preservation conditions (temperature, pH, and ionic strength) can modify the type of interaction that DNA molecules may establish with the apatitic mineral, as we recently pointed out [29].

At this point, it was interesting to check whether this rough estimation of organic content (based on gravimetric evaluation) could be correlated to the amount of collagen observable by FTIR. To do so, the relative amount of collagen was semiquantitatively followed, as proposed earlier [35, 46], by determining the area ratio between the amide I band of collagen at 1,720–1,600  $\text{cm}^{-1}$  and the  $\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$  band in the range 1,220–900  $\text{cm}^{-1}$  (see Coll/ $\text{PO}_4$  ratio on Table 3). As a whole, the plot of % CP versus Coll/ $\text{PO}_4$  only led to a poor linear correlation ( $R^2 \sim 0.36$ ). However, among the datapoints lying out of the line are the two samples (no. 2 and 3a), which were exposed to surface alterations (thus potentially prone to organic contamination), for which FTIR spectra indicate (e.g., in the range 3,000–2,800 and 1,600–1,500  $\text{cm}^{-1}$ , see Fig. 6) the presence of additional organic matter, most probably in the form of fat matter/lipids. Interestingly, a significantly improved correlation was reached without these two points ( $R^2 \sim 0.96$ ), thus supporting the gravimetry/FTIR interrelated conclusions on the evolution of organic matter contents (Fig. 6a).

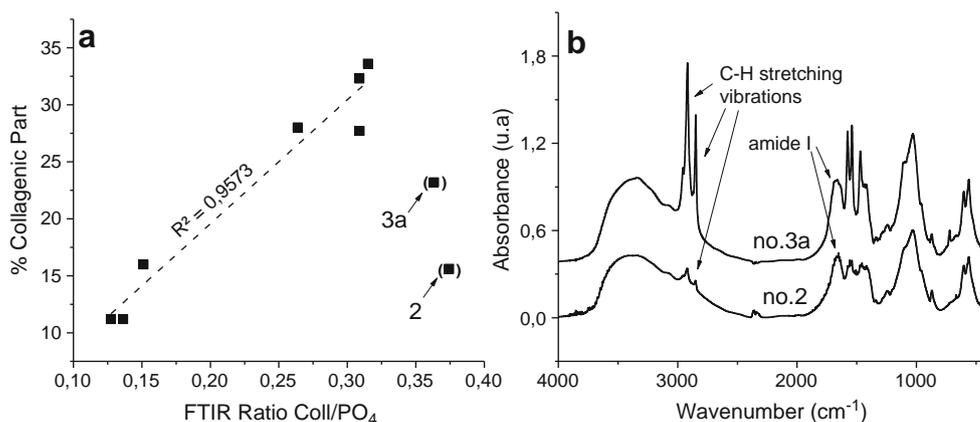
### Composition of apatite samples

By means of chemical titrations of calcium ions and phosphate ions in the mother solutions obtained after acidic dissolution, the Ca/P ratios of the samples were experimentally determined, and found between 1.48 and 1.83 (Table 3). We next attempted to determine the general apatite formulas of our samples by associating those Ca/P values with the FTIR-based carbonate contents. Using this system of two equations with two unknown parameters (i.e., the  $\text{HPO}_4^{2-}$  and the  $\text{CO}_3^{2-}$  contents), we were then able to estimate averaged chemical formulas for each sample (see Table 3), and to evaluate in particular the corresponding Ca/(P+C) ratios, which ranged between 1.33 and 1.53. This range falls below the theoretical stoichiometric value of 1.67, which points out the nonstoichiometry of the apatitic phase contained in these samples and which is consistent with the general formulae of bony apatite proposed by R. Legros for cortical bone apatite [56]:  $\text{Ca}_{8.3}\square_{1.7}(\text{PO}_4)_{4.3}(\text{HPO}_4, \text{CO}_3)_{1.7}(\text{OH})_{0.3}\square_{1.7}$  (giving an average Ca/(P+C) ratio of 1.38 and considering carbonate substitution mainly in B-site).

The chemical formula estimated here also point out the presence of non-negligible  $\text{HPO}_4^{2-}$  contents (substituting  $\text{PO}_4^{3-}$  ions beside carbonate), which were indeed detected above by FTIR. The estimated amounts of hydroxide ions  $\text{OH}^-$  are found to be rather low (typically lower than 1.1 per unit formula). These observations illustrate the nonstoichiometry of these bioapatite minerals. The substitution of  $\text{PO}_4^{3-}$  ions by  $\text{HPO}_4^{2-}$  or  $\text{CO}_3^{2-}$  and the lack of  $\text{OH}^-$  anions are, from an electroneutrality point of view, accounted for by the existence of cationic and anionic vacancies (in Ca- and  $\text{OH}^-$  sites, respectively). The persistence of ion vacancies in the lattice is a well-known phenomenon, which has also been described for synthetic apatites even after a long period of maturation [57].

In addition to calcium, phosphate, carbonate and hydroxide ions, which represent the main ionic components of biological apatites, the more minor contribution of other cations in the lattice (which have not been quantified here) may however also be pointed out. Indeed, the MEB-EDS analyses evidenced the presence of magnesium in most of the samples, as well as sodium and aluminum. Trace amounts of other cationic species were also detected in some samples (strontium, iron, potassium). These elements may either be incorporated in the apatitic lattice as substituents or may be present as minor secondary phases, although no foreign crystalline phase was detected by XRD analysis. Indeed, the presence of surface contaminants cannot be strictly ruled out for such diagenetic specimens. From a physicochemical point of view, the enrichment of apatite with foreign ions (especially bivalent), e.g., via surface ion exchange in solution, has been pointed out for example in the case of  $\text{Sr}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  [57, 58], whereas monovalent cations like  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  tend to

**Fig. 6** **a** Correlation between gravimetric method (%CP) and FTIR method (Ratio Coll/PO<sub>4</sub>) to determine the organic content of skeletal samples. Two samples are considered as outliers (no. 2 and 3a). **b** FTIR spectra of outlier samples showing additional vibrations attributable to organic matter (in the range 3,000–2,800 and 1,600–1,500 cm<sup>-1</sup>)



contribute less [57]. Physiological Mg<sup>2+</sup> was found to be incorporated into dentin and enamel tissues in about 0.5–1 wt.% [59], and generally speaking the chemical composition of mineralized tissues depends on that of the surrounding aqueous environment (whether physiological or diagenetic milieu). This potential incorporation of exogenous cations could also be balanced by anionic species; the main contribution allegedly being in the form of sulfate or silicate anions. Surprisingly, only few elements conventionally described as substitution elements in OH-site are detected (i.e., fluoride and chloride ions are present respectively in the Russian sample no. 4 and the Chilean sample no. 7).

### Concluding statements

The analytical approach used in this work has been optimized for the study of diagenetic specimens, according to mathematical posttreatments of data, which are not liable to alter significantly the original features of the samples. Diagenesis, as well as chemical pretreatment, may impact both the organic (collagenic) matter and apatite nanocrystals, whose surface is known to be in a metastable equilibrium with the surrounding environment. By means of correlation analysis, we were able to determine a consistent set of qualitative indexes (patterns in the infrared  $\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$  domain after apodization), either semi-quantitative (XRD CI, FTIR determination of ionic species, e.g., non-apatitic HPO<sub>4</sub> and apatitic OH) or quantitative (carbonate content, organic matter estimation). These indexes provide information on the nature, the crystallinity degree and the maturation state of the samples. The results of this study appear to be representative of the general state of conservation by comparing these diagenetic features to those of a reference modern bone. Therefore, it allows to better apprehend the diagenetic alteration of the original biological apatite originating from bone and teeth specimens usable as ancient DNA substrate. Indeed, previous seminal works are in agreement with the fundamental role of apatite in the preservation of ancient DNA within skeletal remains.

These results are in global accordance with previous diagenetic works. The positive effect of low temperature environment is assessed, given the location of three of the four specimens allowing DNA amplification (Roeschwoog, Krasnoyiarsk, Egyin Gol). These specimens all exhibit distinct physicochemical features (in terms of maturation, crystallinity, and organic content), thus suggesting involvement of a complex equilibrium at stake in DNA preservation, balanced between crystallinity increase and preservation of the original signature of biological, poorly crystallized, apatite nanocrystals. On the one hand, diagenetic evolution of apatite towards well-crystallized and well-matured nanocrystals leads apatite to reach a stability state, which was recently demonstrated by calorimetry [16], allowing it to persist over a wide time range. On the other hand, this phenomenon may be increased in the case of dissolution/crystallization events, which could also alter the molecular content of the specimens, especially when these processes are linked with microorganisms activity. Results are easier to discuss when organic contaminants are detectable at the surface of a bone specimen due to drastic diagenetic conditions (e.g., aquatic environment). Deeper sampling in such bone specimens has in contrast been shown to exempt of such exogenous material. In this particular case, not a single molecule of ancient DNA from the outer part of bone succeeded to be amplified, whereas a full DNA profile was obtained from the inner part.

Considering the scarcity of the studied samples and their variability (age, geographical provenance, and type of burial site), no attempt has been made at this stage to correlate these results with DNA preservation. However, the multi-analytical approach deployed in this work is intended to be applied to a broader set of samples, and could thus prove useful to correlate in a more general way diagenetic physicochemical parameters with the presence of DNA within skeletal specimens. Additional diagenetic parameters could also prove helpful for even further understanding preservation mechanisms allowing DNA persistence (e.g., trace elements analyses and sediments analyses).

**Acknowledgments** This research was supported by the Institute of Ecology and Environment (INEE) and the Institute of Chemistry (INC) of the French National Center for Scientific Research (CNRS).

## References

- Tütken T, Vennemann TW (2011) Fossil bones and teeth: preservation or alteration of biogenic compositions? *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 310:1–8. doi:10.1016/j.palaeo.2011.06.020
- Price TD, Schoeninger MJ, Armelagos GJ (1985) Bone chemistry and past behavior: an overview. *J Hum Evol* 14:419–447
- Lee-Thorp JA (2008) On isotopes and old bones. *Archaeometry* 50:925–950. doi:10.1111/j.1475-4754.2008.00441.x
- Keyser-Tracqui C, Ludes B (2005) Methods for the study of ancient DNA. *Methods Mol Biol* 297:253–264
- Rohland N, Hofreiter M (2007) Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protoc* 2:1756–1762. doi:10.1038/nprot.2007.247
- Ostrom PH, Schall M, Gandhi H, Shen TL, Hauschka PV, Strahler JR, Gage DA (2000) New strategies for characterizing ancient proteins using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Geochim Cosmochim Acta* 64:1043–1050. doi:10.1016/S0016-7037(99)00381-6
- Buckley M, Anderung C, Penkman K, Raney BJ, Gotherstrom A, Thomas-Oates J, Collins MJ (2008) Comparing the survival of osteocalcin and mtDNA in archaeological bone from four European sites. *J Archaeol Sci* 35:1756–1764. doi:10.1016/j.jas.2007.11.022
- Keyser C, Bouakaze C, Crubézy E, Nikolaev VG, Montagnon D, Reis T, Ludes B (2009) Ancient DNA provides new insights into the history of south Siberian Kurgan people. *Hum Genet* 126:395–410. doi:10.1007/s00439-009-0683-0
- Amory S, Huel R, Bilić A, Loreille O, Parsons TJ (2012) Automatable full demineralization DNA extraction procedure from degraded skeletal remains. *Forensic Sci Int: Genet* 6:398–406. doi:10.1016/j.fsigen.2011.08.004
- Orlando L, Ginolhac A, Zhang G et al (2013) Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature* 499:74–78. doi:10.1038/nature12323
- Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M (2004) Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 38:645–679. doi:10.1146/annurev.genet.37.110801.143214
- Campos PF, Craig OE, Turner-Walker G, Peacock E, Willerslev E, Gilbert MTP (2012) DNA in ancient bone—where is it located and how should we extract it? *Ann Anat-Anat Anz* 194:7–16. doi:10.1016/j.aanat.2011.07.003
- Adler CJ, Haak W, Donlon D, Cooper A (2011) Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *J Archaeol Sci* 38:956–964. doi:10.1016/j.jas.2010.11.010
- Higgins D, Austin JJ (2013) Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review. *Sci Justice* 53:433–441. doi:10.1016/j.scijus.2013.06.001
- Gilbert MTP, Willerslev E, Hansen AJ, Barnes I, Rudbeck L, Lynnerup N, Cooper A (2003) Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 72:32–47
- Rollin-Martinet S, Navrotsky A, Champion E, Grossin D, Drouet C (2013) Thermodynamic basis for evolution of apatite in calcified tissues. *Am Mineral* 98:2037–2045. doi:10.2138/am.2013.4537
- Eanes ED, Meyer JL (1977) The maturation of crystalline calcium phosphates in aqueous suspensions at physiologic pH. *Calc Tis Res* 23:259–269. doi:10.1007/BF02012795
- Rey C, Hina A, Tofghi A, Glimcher MJ (1995) Maturation of poorly crystalline apatites: chemical and structural aspects in vivo and in vitro. *Cells Mat* 5:345–356
- Rey C, Lian J, Grynepas M, Shapiro F, Zylberberg L, Glimcher MJ (1989) Non-apatitic environments in bone mineral: FT-IR detection, biological properties and changes in several disease states. *Connect Tissue Res* 21:267–273
- Combes C, Rey C, Eichert D, Drouet C (2005) Formation and evolution of hydrated surface layers of apatites. *Key Eng Mater* 284:3–6
- Rey C, Shimizu M, Collins B, Glimcher MJ (1991) Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age: 2. Investigations in the  $\nu_3$  PO<sub>4</sub> domain. *Calcif Tissue Int* 49:383–388
- Rey C, Shimizu M, Collins B, Glimcher MJ (1990) Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium-phosphate in bone and enamel, and their evolution with age. I. Investigations in the  $\nu_4$  PO<sub>4</sub> domain. *Calcif Tissue Int* 46:384–394
- Cazalbou S, Eichert D, Ranz X, Drouet C, Combes C, Harmand MF, Rey C (2005) Ion exchanges in apatites for biomedical application. *J Mater Sci Mater Med* 16:405–409. doi:10.1007/s10856-005-6979-2
- Errassifi F, Menbaoui A, Autefage H et al (2010) Adsorption on apatitic calcium phosphates: applications to drug delivery. In: Narayan R, McKittrick J (eds) *Advances in bioceramics and biotechnologies*. Amer Ceramic Soc, Westerville, pp 159–174
- Quizat S, Barroug A, Legroui A, Rey C (1999) Adsorption of bovine serum albumin on poorly crystalline apatite: influence of maturation. *Mater Res Bull* 34:2279–2289. doi:10.1016/S0025-5408(00)00167-7
- Posner AS (1985) The structure of bone apatite surfaces. *J Biomed Mater Res* 19:241–250. doi:10.1002/jbm.820190307
- Drouet C, Carayon MT, Combes C, Rey C (2005) Exchange of biologically relevant ions on nanocrystalline apatites. *Geochim Cosmochim Acta* 69:A69–A69
- Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709–715. doi:10.1038/362709a0
- Grunenwald A, Keyser C, Sautereau A-M, Crubézy E, Ludes B, Drouet C (2014) Adsorption of DNA on biomimetic apatites: towards the understanding of the role of bone and tooth mineral on the preservation of ancient DNA. *Appl Surf Sci* 292:867–875. doi:10.1016/j.apsusc.2013.12.063
- Götherström A, Collins MJ, Angerbjörn A, Lidén K (2002) Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry* 44:395–404. doi:10.1111/1475-4754.00072
- Hagelberg E, Bell LS, Allen T, Boyde A, Jones SJ, Clegg JB (1991) Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications [and discussion]. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 333:399–407
- Cazalbou S, Eichert D, Drouet C, Combes C, Rey C (2004) Minéralisations biologiques à base de phosphate de calcium. *Comptes Rendus Palevol* 3:563–572. doi:10.1016/j.crpv.2004.07.003
- Trueman CN, Palmer MR, Field J, Privat K, Ludgate N, Chavagnac V, Eberth DA, Cifelli R, Rogers RR (2008) Comparing rates of recrystallisation and the potential for preservation of biomolecules from the distribution of trace elements in fossil bones. *Comptes Rendus Palevol* 7:145–158. doi:10.1016/j.crpv.2008.02.006
- Yi H, Balan E, Gervais C et al (2013) A carbonate-fluoride defect model for carbonate-rich fluorapatite. *Am Mineral* 98:1066–1069. doi:10.2138/am.2013.4445
- Sosa C, Vispe E, Núñez C, Baeta M, Casalod Y, Bolea M, Hedges REM, Martínez-Jarreta B (2013) Association between ancient bone preservation and DNA yield: a multidisciplinary approach. *Am J Phys Anthropol* 151:102–109. doi:10.1002/ajpa.22262

36. Vandecandelaere N, Rey C, Drouet C (2012) Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters. *J Mater Sci Mater Med* 23:2593–2606. doi:10.1007/s10856-012-4719-y
37. Mendisco F, Keyser C, Hollard C et al (2011) Application of the iPLEXTM Gold SNP genotyping method for the analysis of Amerindian ancient DNA samples: benefits for ancient population studies. *Electrophoresis* 32:386–393. doi:10.1002/elps.201000483
38. Gee A, Deitz VR (1953) Determination of phosphate by differential spectrophotometry. *Anal Chem* 25:1320–1324. doi:10.1021/ac60081a006
39. Charlot G (1963) L'analyse qualitative et les réactions en solution. Masson, 1963, Paris, France
40. Kauppinen JK, Moffatt DJ, Mantsch HH, Cameron DG (1981) Fourier self-deconvolution: a method for resolving intrinsically overlapped bands. *Appl Spectrosc* 35:271–276
41. Vandecandelaère N (2012) Élaboration et caractérisation de biomatériaux osseux innovants à base d'apatites phospho-calciques dopées. INPT
42. Rowles S (1965) Studies on non-stoichiometric apatites. In: Stack MV, Fearnhead RW (eds) Tooth enamel: its composition, properties and fundamental structure. John Wright et Sons LTD, Bristol, Royaume-Uni, pp 23–25, 56–57
43. Person A, Bocherens H, Saliège J-F, Paris F, Zeitoun V, Gerard M (1995) Early diagenetic evolution of bone phosphate: an X-ray diffraction analysis. *J Archaeol Sci* 22:211–221. doi:10.1006/jasc.1995.0023
44. Thompson TJU, Islam M, Piduru K, Marcel A (2011) An investigation into the internal and external variables acting on crystallinity index using Fourier transform infrared spectroscopy on unaltered and burned bone. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 299:168–174. doi:10.1016/j.palaeo.2010.10.044
45. Pucéat E, Reynard B, Lécuyer C (2004) Can crystallinity be used to determine the degree of chemical alteration of biogenic apatites? *Chem Geol* 205:83–97. doi:10.1016/j.chemgeo.2003.12.014
46. Lebon M, Müller K, Bellot-Gurlet L, et al. (2012) Application des microspectrométries infrarouge et Raman à l'étude des processus diagénétiques altérant les ossements paléolithiques. *ArchéoSciences* no. 35:179–190
47. McElderry J-DP, Zhu P, Mroue KH et al (2013) Crystallinity and compositional changes in carbonated apatites: evidence from 31P solid-state NMR, Raman, and AFM analysis. *J Solid State Chem* 206:192–198. doi:10.1016/j.jssc.2013.08.011
48. Sader MS, Lewis K, Soares GA, LeGeros RZ (2013) Simultaneous incorporation of magnesium and carbonate in apatite: effect on physico-chemical properties. *Mater Res* 16:779–784. doi:10.1590/S1516-14392013005000046
49. LeGeros RZ (1991) Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci* 15:1–201
50. Boskey AL, Mendelsohn R (2005) Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. *Vib Spectrosc* 38:107–114. doi:10.1016/j.vibspec.2005.02.015
51. Trueman CN, Privat K, Field J (2008) Why do crystallinity values fail to predict the extent of diagenetic alteration of bone mineral? *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 266:160–167. doi:10.1016/j.palaeo.2008.03.038
52. Farlay D, Panczer G, Rey C, Delmas PD, Boivin G (2010) Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. *J Bone Miner Metab* 28:433–445. doi:10.1007/s00774-009-0146-7
53. Trueman CN (2013) Chemical taphonomy of biomineralized tissues. *Palaeontology* 56:475–486. doi:10.1111/pala.12041
54. Miller LM, Vairavamurthy V, Chance MR, Mendelsohn R, Paschalis EP, Betts F, Boskey AL (2001) In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the  $\nu(4)$  PO<sub>4</sub>-vibration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1527:11–19
55. Smith CI, Chamberlain AT, Riley MS, Stringer C, Collins MJ (2003) The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *J Hum Evol* 45:203–217. doi:10.1016/S0047-2484(03)00106-4
56. Legros R, Balmain N, Bonel G (1986) Structure and Composition of the Mineral Phase of Periosteal Bone. *J Chem Res-S* 8–9
57. Cazalbou S (2000) Échanges cationiques impliquant des apatites nanocristallines analogues au minéral osseux. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique
58. Drouet C, Carayon M-T, Combes C, Rey C (2008) Surface enrichment of biomimetic apatites with biologically-active ions Mg<sup>2+</sup> and Sr<sup>2+</sup>: a preamble to the activation of bone repair materials. *Mater Sci Eng C-Biomimetic Supramol Syst* 28:1544–1550. doi:10.1016/j.msec.2008.04.011
59. Lefevre R, Frank RM, Voegel JC (1975) The study of human dentine with secondary ion microscopy and electron diffraction. *Calcif Tissue Res* 19:251–261
60. Keyser-Tracqui C, Crubezy E, Ludes B (2003) Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia. *Am J Hum Genet* 73:247–260
61. Mendisco F (2011) Apports de la paléogénétique à l'histoire du peuplement précolombien des Andes méridionales (Vème–XVème siècles). Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier
62. Scherrer P (1981) Estimation of the size and internal structure of colloidal particles by means of Rontgen rays. *Nachr. Ges. Wiss., Gottingen* 2:96–100
63. Paschalis EP et al. (1997) FTIR microspectroscopic analysis of normal human cortical and trabecular bone. *Calcif. Tis. Int.* 61(6): 480–486
64. Elliott JC (1994) Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Elsevier Science BV, Amsterdam
65. Drouet C (2013) Apatite formation: why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds. *BioMed Res. Ins.*, p. 490946. Doi:10.1155/2013/490946



## Revisiting carbonate quantification in apatite (bio)minerals: a validated FTIR methodology



A. Grunenwald<sup>a, b</sup>, C. Keyser<sup>b</sup>, A.M. Sautereau<sup>a</sup>, E. Crubézy<sup>c</sup>, B. Ludes<sup>b</sup>, C. Drouet<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> CIRIMAT Carnot Institute – Phosphates, Pharmaceutics, Biomaterials, University of Toulouse, CNRS/INPT/UPS, ENSIACET, 4 allée Emile Monso, 31432 Toulouse Cedex 4, France

<sup>b</sup> Institute of Legal Medicine, AMIS Laboratory, CNRS UMR 5288, University of Strasbourg, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France

<sup>c</sup> Molecular Anthropology and Image Synthesis Laboratory (AMIS), CNRS UMR 5288, University of Toulouse, 37 allée Jules Guesde, 31000 Toulouse, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 March 2014

Received in revised form

7 May 2014

Accepted 9 May 2014

Available online xxx

#### Keywords:

Carbonate

Apatite

Bone

FTIR

Diagenesis

### ABSTRACT

Carbonated apatites represent an important class of compounds encountered in many fields including anthropology, archeology, geology, medicine and biomaterials engineering. They constitute, in particular, the mineral part of bones and teeth, are found in sedimentary settings, and are used as biomimetic compounds for the development of bone tissue engineering scaffolds. Whether for assessing the degree of biomimetism of synthetic apatites or for better understanding diagenetic events, their thorough physico-chemical characterization is essential, and includes, in particular, the evaluation of their carbonate content. FTIR is especially well-suited for such a goal, as this spectroscopy technique requires only a low amount of specimen to analyze, and carbonate ions exhibit a clear vibrational signature. In this contribution, we critically discuss several FTIR-approaches that may be (or have been) considered in view of carbonation quantification. The best methodology appears to be based on the analysis of the  $\nu_3(\text{CO}_3)$  and  $\nu_1\nu_3(\text{PO}_4)$  modes. The area ratio  $r_{c/p}$  between these two contributions was found to be directly correlated to the carbonate content of the samples ( $R^2 = 0.985$ ), with the relation  $\text{wt.\% CO}_3 = 28.62 * r_{c/p} + 0.0843$ . The method was validated thanks to titrations by coulometry assays for various synthetic reference samples exhibiting carbonate contents between 3 and 7 wt.%. The FTIR carbonate quantification methodology that we propose here was also tested with success on three skeletal specimens (two bones/one tooth), after elimination of the collagen contribution. Comparative data analysis is also presented, showing that the use of other vibration bands, or only peak heights (instead of peak areas), leads to significantly lower correlation agreement. This FTIR data treatment methodology is recommended so as to limit errors on the evaluation of carbonate contents in apatite substrates.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Hard tissues (bones and teeth) in vertebrates are natural composite materials (Price et al., 1985) consisting of well-organized organic and inorganic moieties in tridimensional arrangements (Gomez-Morales et al., 2013; Landis et al., 1996), in order to fulfill appropriately physicochemical, biological, and mechanical functions. The mineral part is composed of an apatite phase that derives from hydroxyapatite (HA),  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . In the case of enamel, the chemical composition of the apatite phase closely resembles

that of HA (in a microcrystalline setting), whereas the apatite phase constituting bone mineral or dentin is clearly nanocrystalline and significantly departs from stoichiometry. In all cases, trace elements can also enter the structure, such as fluorine, magnesium or strontium among others (Elliott, 1994). These considerations typically illustrate the exceptional capacity of the apatite structure to adapt its composition and crystal dimensions to the functions that it has to achieve *in vivo* (low solubility, resistance to acidic attacks for enamel; greater solubility for bone mineral which has to undergo remodeling processes and remain active in homeostasis).

In all cases, carbonate ions are also found to substitute anions in biological apatites (Rey et al., 1989; Pasteris et al., 2014; Shimoda et al., 1990; Gomez-Morales et al., 2013; Elliott et al., 1985): phosphates (leading to “B-type” carbonated apatites) or hydroxides (“A-type”), or the mixed “AB-type”. The incidence of carbonation in biological apatites is not anecdotic: carbonate ions,  $\text{CO}_3^{2-}$ , are

\* Corresponding author. CIRIMAT Carnot Institute, ENSIACET, 4 allée Emile Monso, 31432 Toulouse cedex 4, France. Tel.: +33 (0)34 32 34 11; fax: +33 (0)34 32 34 99.

E-mail address: [christophe.drouet@ensiacet.fr](mailto:christophe.drouet@ensiacet.fr) (C. Drouet).

known to be growth inhibitors for the apatitic structure (Shimoda et al., 1990); their presence is thus expected to modulate mineralization processes. Also, carbonate ions are thought to stabilize the non-apatitic surface layer present on apatite nanocrystals. Indeed, for a similar maturation time in solution, carbonated apatites exhibit a lower degree of maturity than their non-carbonated counterparts (internal communication). The presence of carbonate ions during the mineralization of collagenic proteins *in vivo* is thus likely to influence the final characteristics of the apatite crystals that are being formed, although the level of carbonation is known to increase with the maturity of the biomineral (Pellegrino and Biltz, 1972; Legros et al., 1987).

It is possible to prepare by soft chemical route some “biomimetic” apatite nanocrystals approaching the composition, structure, and microstructure of biological apatites, and their physico-chemical features can be tailored by controlling adequately the precipitation conditions (Vandecastelaere et al., 2012). Biomimetic analogs can be either precipitated in the presence or in the absence of carbonate ions. Recently, we highlighted some of the similarities existing between a carbonated apatite matured for one week (Grunenwald et al., 2014) and a typical modern bone specimen. Such synthetic apatite compounds can be considered as “models” of the mineral part of bones, allowing one to investigate interfacial phenomena in a simplified and more controlled way than with biologically-derived samples, as we did recently in the field of ancient DNA preservation (Grunenwald et al., 2014). Synthetic carbonated apatites are also good candidates for the setup of scaffolds for bone tissue engineering or for coating prosthetic devices, taking into consideration their intrinsic biocompatibility and similarity to bone mineral.

Whether of natural origin or of synthetic nature, carbonated apatites can be encountered in various fields of interest, from anthropology or forensic sciences (analysis of skeletal remains) to biomaterials engineering, as well as fundamental research aiming at better understanding biomineralization processes. In all cases, sample characterization is a necessary step, which includes the determination of the carbonation content. As regards synthetic samples, this determination is necessary to evaluate the degree of analogy (biomimetism) to bone mineral with varying maturity stages after bone remodeling. The CO<sub>3</sub> content in apatite compounds progressively increases upon maturation of the crystals (Pellegrino and Biltz, 1972). In the case of biological apatites, the knowledge of the carbonation level may help understanding diagenetic phenomena since the alteration of the CO<sub>3</sub> content from skeletal specimens appears to be site-specific (Trueman et al., 2008; Cazalbou et al., 2004; Kohn et al., 1999). Also, Roche et al. argued for changes to the A-B ratio in fossils compared to modern tissues, thus pointing out that the carbonate component of biogenic phosphates can change during diagenesis (Roche et al., 2010). In geochemistry and paleoenvironment/paleobiology domains, it may help to extract precious information via isotopic titrations of carbon or oxygen isotopes contained in the CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> anions (Suarez and Kohn, 2011; Lecuyer et al., 2010; Sponheimer and Lee-Thorp, 2001; Kohn et al., 1996; Tütken and Vennemann, 2011; Price et al., 1985).

The list of techniques that may potentially come into play for assessing the amount of carbonate ions associated with the apatite phase is however quite limited. Methods based on total carbon titration after sample calcination are generally associated with non-negligible uncertainties (estimated to several weight percent), which limits their practical usefulness. Methods based on the release of carbon dioxide upon acidification and subsequent electrochemical quantification (coulometry assays) yield significantly more accurate results (Eichert et al., 2007; Engleman et al., 1985), but require a substantial amount of sample (typically of the order of several tens to hundreds of milligrams) which is not often an option

in the case of archeological or forensic specimens where only a very limited quantity of matter is available.

In this context, the use of vibrational spectroscopies such as Raman or Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopies appears particularly relevant due to the high sensitivity of these techniques and the very low amount of specimen that they require (typically 1–2 mg). Lebon et al. have pointed out however some difficulties related to the use of Raman spectroscopy due to fluorescence of biological/fossil systems as well as to the low intensity of the carbonate contribution (Lebon et al., 2011). The  $\nu_2(\text{CO}_3)$  and  $\nu_3(\text{CO}_3)$  vibration modes of carbonate ions incorporated in an apatitic lattice are on the contrary quite easily detectable by FTIR. This technique thus appears as a potentially adapted technique for carbonation quantification. Puceat et al. proposed to follow, by FTIR, the carbonation of apatites on the basis of the ratio of peak heights between the 1415 cm<sup>-1</sup> band of the  $\nu_3(\text{CO}_3)$  band, mostly assignable to B-type carbonate, and the sum of the two peaks (i.e. 601 and 560 cm<sup>-1</sup>) of the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  contribution (Puceat et al., 2004). In a rather similar intention, Featherstone et al. had previously investigated a method based on the ratio of extinction coefficients at 1415 and 575 cm<sup>-1</sup> (Featherstone et al., 1984). However, this method based on a comparison of peak heights at selected wavenumbers can hardly account for the variability of carbonate chemical environments in all apatite specimens, where not only B-type carbonates but also A-type or even labile carbonates (pertaining to the non-apatitic surface layer on apatite nanocrystals (Gomez-Morales et al., 2013; Eichert et al., 2007; Rey et al., 2011)) may coexist in variable proportions (Rey et al., 2011). Moreover, the hydroxylation of apatite – which may be variable depending on stoichiometry – leads to a libration band at 632 cm<sup>-1</sup> superimposed to the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  band (Drouet, 2013). It has also been suggested (Puceat et al., 2004; Sosa et al., 2013; Boskey et al., 2005) evaluating the carbonate contribution using the area or intensity ratio of the 1415 cm<sup>-1</sup> band alone (not considering the rest of the  $\nu_3(\text{CO}_3)$  contribution) relative to the  $\nu_3(\text{PO}_4)$  phosphate band, instead of  $\nu_4(\text{PO}_4)$ , or exploiting the  $\nu_2(\text{CO}_3)$ , for example, through the  $\nu_2(\text{CO}_3)/\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$  area ratio. However, in the case of HPO<sub>4</sub>-containing apatites, the occurrence of overlapping HPO<sub>4</sub>-related contributions in the  $\nu_2(\text{CO}_3)$  domain adds some obvious complexity in IR data which does not seem to have received attention so far. Yet, most synthetic apatites obtained by wet chemistry as well as biological bone or dentin specimens are expected to be non-stoichiometric and to incorporate non-negligible proportions of HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ions (Gomez-Morales et al., 2013), the presence of which has thus to be considered prior to developing IR methodologies.

In this context, the present contribution intends to 1) discuss which carbonate and phosphate vibrational contributions should be favored in view of carbonation quantification, and 2) to develop and test an FTIR-based methodology adapted to the evaluation of the CO<sub>3</sub> content of both synthetic and biological specimens. The validation of the method has been made through the use of direct carbonate titrations via coulometry assays. To this end, we have prepared a set of carbonated apatite reference compounds to be used for calibration purposes, allowing us to check relationships between IR data (integrated intensities of several vibrational contributions) and coulometric results. The skeletal specimens tested in this work arose, on the contrary, from archeological settings.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Synthetic apatite compounds

Several synthetic carbonated apatite samples, used as reference materials in this work, were synthesized by precipitation in aqueous medium, at close-to-physiological pH (experimental

value  $\sim 7.2$ ) and at different temperatures, namely 10 °C, 20 °C, room temperature (22 °C), 37 °C, 50 °C, and 70 °C. Except for experiments run at room temperature or at 70 °C, the temperature was controlled using a double-envelope reactor and a circulating device allowing the recirculation of a fluid between the two envelopes for precise temperature regulation. The sample prepared at 70 °C could not be stabilized in the same way due to the inadequacy of using the recirculating device at this temperature. For this sample, the precipitation was undergone in an Erlenmeyer flask connected to a reflux condenser to avoid water evaporation.

Two solutions, A and B, were prepared prior to the precipitation. A calcium-containing solution (solution A, typically 75 ml) was prepared by dissolving  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Merck Emsure grade, purity  $\geq 99.0\%$ ) in deionized water, up to reaching the concentration of 0.3 M. In parallel, solution B (150 ml) containing a phosphate source and a carbonate source was prepared by dissolving  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (VWR Normapur grade, purity  $\geq 99.0\%$ ) and  $\text{NaHCO}_3$  (purity  $\geq 99.0\%$ ) up to the respective concentrations of 0.45 M and 0.71 M. Solutions A and B were then mixed and allowed to mature in the mother solution, with or without magnetic stirring (as indicated in the text), for a maturation time varying between 0 and 15 days (aging time in solution). The precipitating medium was then filtered on Büchner funnel, thoroughly washed with deionized water and freeze-dried (freeze-dryer set to  $-80$  °C and residual pressure 10 mbar). The freeze-dried powders were collected and stored in a freezer at  $-18$  °C, to avoid any subsequent evolution prior to physico-chemical analyses.

These synthetic reference samples will be named “*hacXX-Yd*”, where XX corresponds to the synthesis temperature (in degrees Celsius) and Y denotes the number of maturation days in solution prior to filtration.

## 2.2. Skeletal specimens

Three skeletal specimens, corresponding to various geographical areas and epochs (Iron Age, Middle Ages and twentieth century) were investigated. The samples were provided by the AMIS laboratory (CNRS, UMR 5288, France). The specimens will be identified, in the present work, using the following names: “20th Cent”, “mid-ages”, and “Iron age”. The first sample, “20th Cent”, corresponds to an adult male femur dating from the mid-twentieth century. The second, “mid-ages”, is part of an adult male tooth originating from Roeschwoog Alsace, France, and dating from the Middle Ages (registry ref. #R3189B); this sample was obtained by crushing the entire tooth, thus mixing dentin and enamel. The third specimen, “Iron age”, comes from the Iron Age period (around 1800–1400 BC) and corresponds to a female bone from Krasnoyarsk region, Russia (registry ref. #S09).

No chemical pretreatment was performed so as to limit possible alterations of the mineral part contained in the samples. The specimens were first roughly ground using a 6870 SamplePrep Freezer Mills (Fischer Bioblock, Illkirch, France) and then subjected to a milling process (Spex 5010 Freezer Mill) for the obtainment of fine powders in view of physico-chemical characterizations.

## 2.3. Physico-chemical characterization

Powder X-ray diffraction was used to confirm the apatitic nature of the crystallized phase contained in the samples (as well as the absence of secondary deposits such as calcite in the case of fossil bones/teeth). The XRD analyses were carried out on an INEL CPS 120 curved-counter diffractometer using the monochromatic Cobalt  $K\alpha$  radiation ( $\lambda_{\text{Co}} = 1.78892$  Å).

The carbonate content of reference synthetic apatites was measured by coulometry using a  $\text{CO}_2$  coulometer (UIC, Inc. CM 5014

coulometer) measuring in a closed system the carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) released during sample dissolution in acidic conditions (CM 5130 acidification unit, use of  $\text{HClO}_4$  2 M for synthetic samples and 6 M for biological specimens). The  $\text{CO}_2$  released was automatically transferred into a photometric cell and titrated through an acid–base reaction (Engleman et al., 1985; Huffman, 1977). Barium carbonate (Prolabo, purity  $>99\%$ ) was used as a reference material for checking the calibration of the apparatus. Measures were made at least in duplicate. The uncertainty of this method is evaluated to  $\pm 0.5$  wt.%  $\text{CO}_3$ .

Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR), using KBr as a solid diluent, was used to analyze vibrational features of the specimens. About 1.5 mg of each sample was mixed and ground with 200 mg of KBr. Composite pellets were prepared out of this mixture by uniaxial compression under  $8 \text{ tons cm}^{-2}$  for ca. 10 s. The FTIR spectra were acquired by transmission, in the wavenumber range  $400\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$  using a Nicolet 5700 spectrometer (64 scans, with a resolution of  $4 \text{ cm}^{-1}$ ). The spectra were subsequently analyzed with the OMNIC 8 software (Thermo Nicolet). Background deviations on FTIR spectra were corrected using the automatic background correction tool of the software (the background line consisting in a series of joint linear segments). This led to zeroing in particular the absorption levels at points such as  $4000$ ,  $\sim 2000$ ,  $\sim 800$  and  $400 \text{ cm}^{-1}$ . Fig. AR1 in the Additional Resources shows an example of spectrum (synthetic carbonated apatite) after background correction, in the  $400\text{--}2000 \text{ cm}^{-1}$  range.

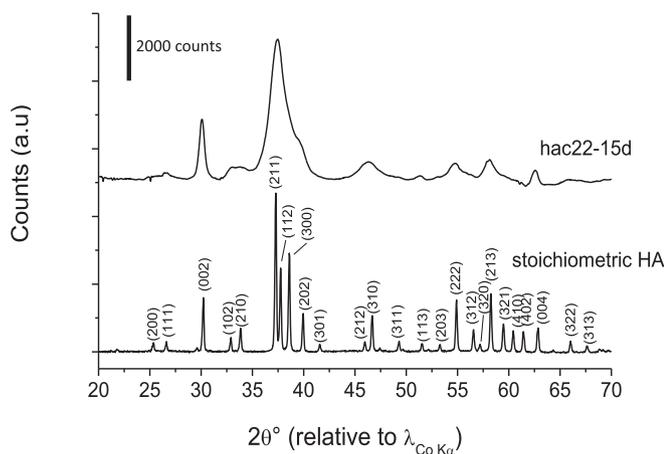
Several analysis methodologies have been tested in this work for the reference samples, in view of seeking correlations between IR data (related to carbonate and phosphate species) and coulometry data. The different methodologies will be explained where adequate in the text; they essentially differ by the considered vibrational domains. In each case, the analytical reproducibility of intensity ratios was checked by performing the same quantification method in triplicate.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Carbonated apatite reference compounds

The apatitic nature of the synthesized samples studied in this work has been verified by XRD analyses. In all cases a pattern typical of an apatitic phase was indeed detected, as attested in accordance to the JCPDS card no. 09-432 relative to hydroxyapatite. The typical pattern obtained relative to sample *hac22-15d* (i.e. prepared at  $T_{\text{amb}} \sim 22$  °C and matured for 15 days) is reported in Fig. 1 as illustrative example, along with the indexation of the main diffraction lines.

The carbonation level of the reference samples (carbonated apatites prepared by precipitation in various conditions) was then evaluated by coulometry assays. A summary of the results obtained in terms of weight percent of carbonate associated with the apatite phase is given in Table 1. As may be remarked, for systems prepared in similar stirring conditions, the degree of carbonation of the apatite phase clearly rises upon increasing the synthesis temperature (comparing samples *hac10-15d*, *hac20-15d*, *hac37-15d*, *hac50-15d*) or the maturation time in solution (comparing samples *hac22-0d*, *hac22-1d*, *hac22-15d*). Note that the samples *hac22-15d* and *hac70-15d* (prepared respectively at 22 and 70 °C) display a lower carbonation level than what could be expected at first from the general temperature-driven tendency. Sample *hac22-15d*, however, cannot be directly compared with the other samples matured for 15 days, due to distinct stirring conditions; the absence of stirring potentially limiting the kinetics of carbonation (but being closer to “natural” conditions). The lower carbonation of sample *hac70-15d* is due to a different cause; it can be related to a temperature that



**Fig. 1.** Typical XRD pattern of the hac22-15d carbonated apatite sample, and indexing in reference to JCPDS card no. 09-432 relative to stoichiometric hydroxyapatite.

approaches the boiling temperature of the solution. In this respect, the elimination of dissolved gases (including  $\text{CO}_2$ ) is facilitated.

These eight samples may be considered as a set of reference carbonated apatite samples, with a wide range of carbonation levels between 3 and 6.9 wt.%  $\text{CO}_3$  (bone and teeth specimens being known to exhibit carbonate contents of up to about 4–8 wt.%  $\text{CO}_3$ , (Gomez-Morales et al., 2013; McElderry et al., 2013)).

### 3.2. FTIR data analysis for carbonated apatite reference compounds

Fig. 2 shows typical FTIR data found for such carbonated apatite reference materials; Fig. 2a gives an overview of the full spectra in the range 400–4000  $\text{cm}^{-1}$ ; and Fig. 2b reports an enlarged view of the range 400–1800  $\text{cm}^{-1}$  where characteristic carbonate absorption corresponding to the  $\nu_2(\text{CO}_3)$  and  $\nu_3(\text{CO}_3)$  IR-active vibration modes can be evidenced respectively around 840–900 and 1350–1550  $\text{cm}^{-1}$ . The former being less intense than the latter, Fig. 2c gives a zoomed view of the  $\nu_2(\text{CO}_3)$  domain (which is merged with a vibrational contribution around 875  $\text{cm}^{-1}$  assignable to  $\text{HPO}_4^{2-}$ ). Finally, the attribution of each vibrational contribution is given in Fig. 2d in the typical case of sample hac37-15d. Apart from carbonation bands, the characteristic features of apatitic compounds are also clearly visible on these spectra, with apatitic hydroxide ( $\text{OH}_{\text{ap}}^-$ ) bands at 3572 (O–H stretching) and 632  $\text{cm}^{-1}$  (OH libration), as well as phosphate modes  $\nu_1(\text{PO}_4)$ ,  $\nu_2(\text{PO}_4)$ ,  $\nu_3(\text{PO}_4)$ , and  $\nu_4(\text{PO}_4)$  as indicated in Fig. 2d. Water bands are also seen in the O–H stretching domain (3000–3600  $\text{cm}^{-1}$ ) as well as HOH deformation domain (1640  $\text{cm}^{-1}$ ).

As a general trend, it may be remarked that, upon increasing the maturation temperature from 10 to 70 °C, the resolution of the spectra is enhanced, with, in particular, an increasingly separated  $\nu_1(\text{PO}_4)$  contribution from the  $\nu_3(\text{PO}_4)$  domain. Also, the global amount of water associated with the samples progressively decreases. These observations may be related to an increased degree of crystallinity as can be expected from apatites precipitated in higher temperature conditions. This increase in crystallinity state has been investigated by analysis of the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  band (Fig. 3), by

following two parameters as in Fig. 3b. First, the difference in position between the two maxima of this band was followed versus the maturation temperature, this parameter being related to the level of distortion existing in the  $\text{PO}_4$  tetrahedrons. Second, a crystallinity index CI (aka “splitting factor”) was evaluated from the “depth” of the pit between the two maxima using a method proposed in the literature (Shemesh, 1990; Weiner and Wagner, 1998; Thompson et al., 2011; Termine and Posner, 1966; Weiner and Bar-Yosef, 1990) and consisting of the ratio (after baseline correction) between the sum of the absorbance of the two maxima divided by the absorbance of the minimum between them. Despite non-negligible error bars, the two parameters conjointly suggest an evolution (decrease of splitting and increase of CI) toward better crystallized apatitic systems upon increasing the synthesis temperature, which confirms our above hypothesis. It may also be noted that the CI values were found here to range between ca. 3 and 4, which was also the case for pristine sedimentary apatites (Shemesh, 1990) as well as fossil or modern bones (Weiner and Wagner, 1998). Taking also into account the above-mentioned carbonation range of the reference compounds prepared here, the observations confirm that these compounds exhibit physico-chemical characteristics that are in perfect agreement with “target” unknown specimens susceptible to be analyzed (apatites from sediments, bones, synthetic analogs). These reference compounds thus appear as particularly relevant for the establishment of an FTIR methodology for carbonate quantification.

### 3.3. Selection of FTIR contributions to be considered for carbonate quantification

It is essential at this stage to discuss which FTIR contributions have to be considered in view of carbonation quantification. In order to inspect the degree of carbonation of a phosphate matrix, as is the case here, the follow-up of a ratio between a carbonate contribution (numerator) and a phosphate contribution (denominator) appears coherent. Numerous factors such as  $\text{HPO}_4:\text{PO}_4$  ratio, A:B ratio of  $\text{CO}_3$ , labile surface  $\text{CO}_3$ , and lattice distortion from variable minor element chemistry all affect band position, shape, and intensity. Thus, an area-based method appears preferable to considering peak heights at selected wavenumbers.

#### 3.3.1. Selection of carbonate contribution

As mentioned above, the presence of  $\text{CO}_3^{2-}$  ions leads to two vibration modes active in IR, namely  $\nu_2(\text{CO}_3)$  and  $\nu_3(\text{CO}_3)$  (Rey et al., 2011). However, the P–OH stretching vibration at 875  $\text{cm}^{-1}$  of  $\text{HPO}_4^{2-}$  ions, that are also generally present in nonstoichiometric apatites, is superimposed with the  $\nu_2(\text{CO}_3)$  mode which falls typically in the range 840–900  $\text{cm}^{-1}$ . The consideration of this carbonate mode to assess the degree of carbonation of apatitic compounds thus becomes problematical. It may be attempted, via spectral decomposition, to separate each contribution arising in this spectral range, especially for removing the part linked to  $\text{HPO}_4$ . However, this task is made difficult by the possible presence of many contributions with maxima found to be rather close in position, including B-type and A-Type carbonates (respectively around 872 and 883  $\text{cm}^{-1}$ , (Rey et al., 2011)), but also labile carbonates giving rise to a large band for which the exact position is

**Table 1**

Carbonation levels for the carbonated apatite references prepared in this work, and temperature control conditions.

Sample	hac22-0d	hac22-1d	hac10-15d	hac20-15d	hac22-15d	hac37-15d	hac50-15d	hac70-15d
Stirring	no	no	yes	yes	no	yes	yes	yes
Wt%. $\text{CO}_3$	3	3	5.9	5.9	5.5	6.8	6.9	5.3

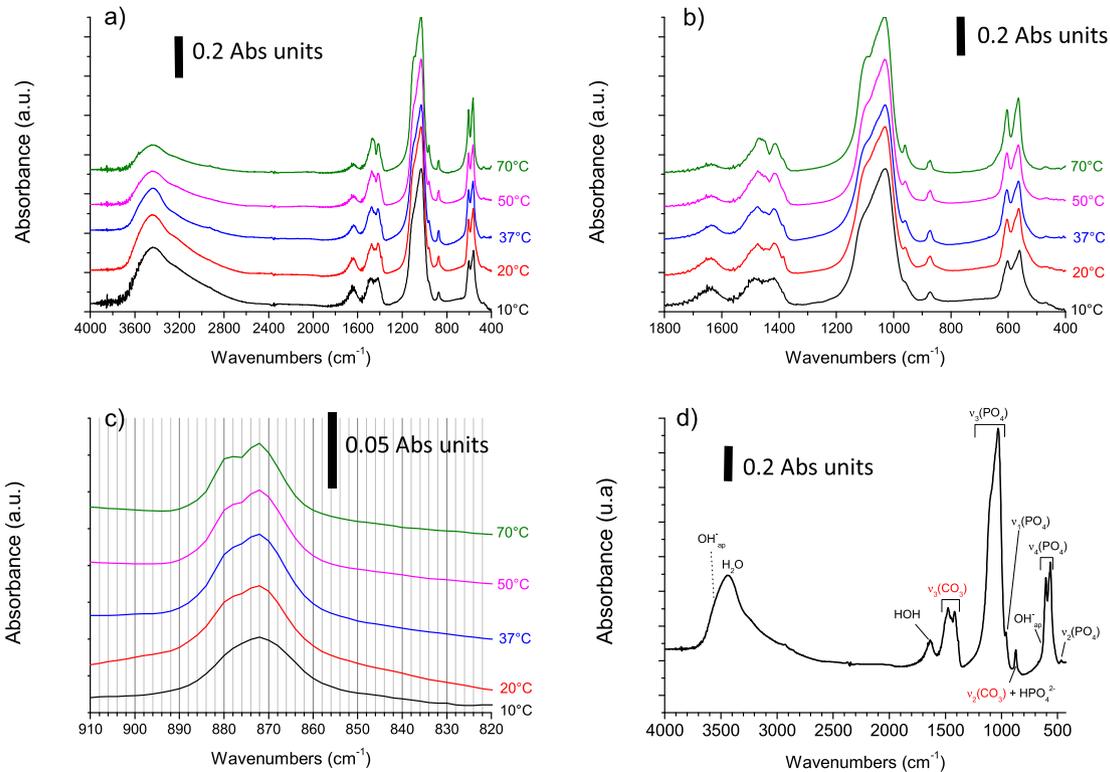


Fig. 2. FTIR spectra for carbonated apatite reference compounds: a) typical spectra obtained for various maturation temperatures (for 15 days of maturation), b) zoom on the 400–1800  $\text{cm}^{-1}$  range, c) detail on the  $\nu_2(\text{CO}_3)$  region, d) indexing of bands (example of sample hac37-15d).

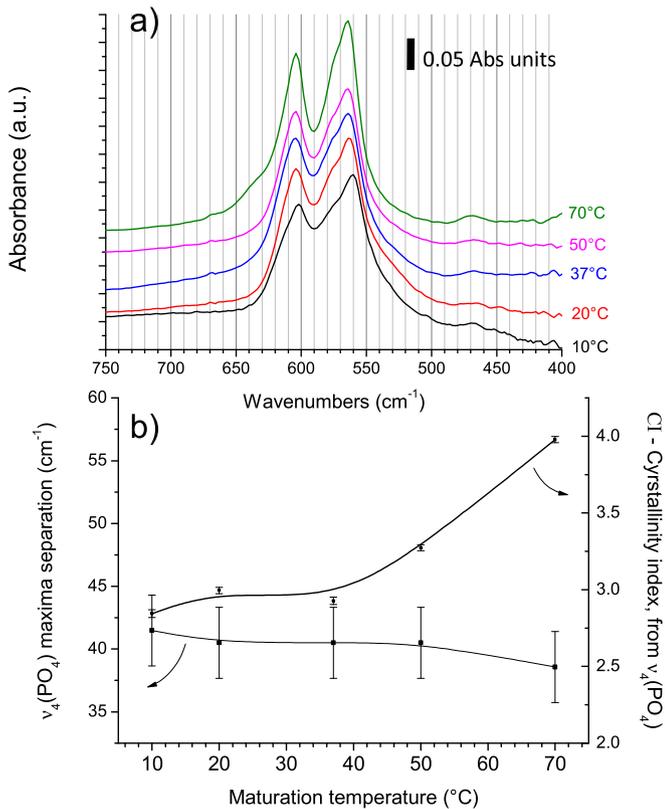


Fig. 3. Analysis of the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  vibrational domain for carbonated apatite references prepared at various temperatures: a) spectra in the 400–750  $\text{cm}^{-1}$  range, and b) evolution of  $\nu_4(\text{PO}_4)$  maxima separation and crystallinity index (CI (or “splitting factor”) evaluated from the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  domain.

not well-known (carbonation in amorphous calcium phosphate leading to absorption at 866  $\text{cm}^{-1}$  (Rey et al., 2011)) as well as the  $\text{HPO}_4^{2-}$  contribution at 875  $\text{cm}^{-1}$ . Moreover, the external titration of  $\text{HPO}_4^{2-}$  ions by methods such as thermogravimetry (TGA) or spectrophotometry (e.g. using the yellow phospho–vanado–molybdenum complex (Gee and Dietz, 1953)) is extremely delicate (Elliott, 1994) in the co-presence of carbonate ions due to parasite reactions such as  $\text{CO}_3^{2-} + 2\text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{PO}_4^{3-}$ . Therefore, the use of the  $\nu_2(\text{CO}_3)$  does not appear appropriate for the evaluation of the carbonate content in a general situation where the presence of  $\text{HPO}_4^{2-}$  ions cannot be excluded.

In contrast, the  $\nu_3(\text{CO}_3)$  vibration mode is well separated from the main phosphate absorption bands, which makes it suitable for carbonate quantification. In the case of biological specimens, however, a complication arises due to vibrations of collagen (Kimura-Suda et al., 2009), the amide bands of which lead to absorptions typically in the range 1930–1230  $\text{cm}^{-1}$ . This superposition of IR bands from carbonate and collagen therefore prevents a direct analysis of mineral carbonation. Chemical treatments aiming at dissolving the collagen matrix could also lead to modifications of the apatite features, and it is thus not advised. Since the added complexity is due to the presence of amide bands from collagen, it is, however, theoretically possible to subtract this contribution by subtracting – with an adequate multiplying factor (until minimizing the intensity of amide vibrations in the 1930–1230  $\text{cm}^{-1}$  domain) – the spectrum of pure collagen acquired in the same experimental conditions. Consequently, whether for synthetic or biological apatitic samples, the evaluation of carbonation seems to be appreciable based on the analysis of the  $\nu_3(\text{CO}_3)$  mode. This mode has thus been selected (see the following section for the experimental validation on both synthetic and biological specimens).

### 3.3.2. Selection of phosphate contribution

Phosphate ions lead to various FTIR contributions. However, since the  $\nu_1(\text{PO}_4)$  and  $\nu_2(\text{PO}_4)$  modes are only poorly active in infrared, considering them for quantification purposes would lead to increased uncertainties. In contrast, the  $\nu_3(\text{PO}_4)$  and  $\nu_4(\text{PO}_4)$  domains are significantly more intense, which is expected to limit propagated errors. The libration band of apatitic  $\text{OH}^-$  ions, however, appears at  $632\text{ cm}^{-1}$ , which superimposes to the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  domain. Since apatite compounds are often nonstoichiometric due to the presence of vacancies in calcium and hydroxide sites, the level of hydroxylation may significantly vary from one sample to another, thus modifying the overall shape of the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  band. As this libration contribution can be non-negligible in intensity but also because it cannot easily be distinguished from the phosphate vibrations belonging to the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  domain (unless using time-consuming spectral decomposition methods), the exploration of the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  domain for in carbonate quantification methodology does not seem appropriate.

Overall, the  $\nu_3(\text{PO}_4)$  appears the best choice to assess carbonate contents of apatite. However, especially in low-crystallinity samples, the  $\nu_1(\text{PO}_4)$  singlet vibration is not cleanly separated from the  $\nu_3(\text{PO}_4)$  band (e.g. Fig. 2b), and appears as a shoulder to  $\nu_1(\text{PO}_4)$ . Thus the combined  $\nu_1\nu_3(\text{PO}_4)$  domain appears most practical in avoiding additional spectral treatment to subtract the  $\nu_1(\text{PO}_4)$  contribution.

### 3.4. Exploration of FTIR methodologies

The vibrational domains retained for this carbonation analysis are  $\nu_3(\text{CO}_3)$  for carbonate ions and  $\nu_1\nu_3(\text{PO}_4)$  for phosphates. Based on our experimental IR spectra, we measured for each of the reference samples, using the OMNIC 8 software, the integrated intensities (=peak areas) corresponding to these three components. These measurements were carried out after a preliminary baseline correction of the complete  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  spectrum. The integration of the  $\nu_3(\text{CO}_3)$  band was done in such a way as to include the totality of the  $\nu_3(\text{CO}_3)$  contribution, typically between  $1570$  and  $1330\text{ cm}^{-1}$ . The  $\nu_1\nu_3(\text{PO}_4)$  contribution was integrated between  $1230$  and  $\sim 900\text{ cm}^{-1}$ . This lower limit was selected as the local minimum in order to avoid including the band expanding from ca.  $800$  to ca.  $900\text{ cm}^{-1}$  due to  $\nu_2(\text{CO}_3)$  and to  $\text{HPO}_4^{2-}$ . The upper limit of  $1230\text{ cm}^{-1}$  was chosen because collagen subtraction for biological samples is bound to alter the region  $1930\text{--}1230\text{ cm}^{-1}$  where amide bands are located (Boskey et al., 2005). The evaluation of the band area corresponding to  $\nu_1\nu_3(\text{PO}_4)$  was found, in contrast, to be essentially unaffected (data not presented graphically here) by the collagen subtraction between these limits of  $1230$  and  $900\text{ cm}^{-1}$ , therefore confirming the possibility of using this wavenumber range. The integration areas of interest for the determination of the carbonate/phosphate ratio denoted " $r_{c/p}$ " between the integrated intensity of  $\nu_3(\text{CO}_3)$  and that of  $\nu_1\nu_3(\text{PO}_4)$  are shown graphically in Fig. 4a.

The evolution of the amount of carbonate in reference samples (as measured by coulometry) has been plotted in Fig. 4b versus the ratio  $r_{c/p}$ . Interestingly, a linear trend could be evidenced (see raw data on Table AR1 in the Additional Resources), with good correlation parameters ( $R^2 = 0.985$ ), leading to the relationship given in Equation (1):

$$\text{wt.}\% \text{CO}_3 = 28.62 \cdot r_{c/p} + 0.0843 \quad (1)$$

Despite absolute uncertainties on data points, this correlation confirms advantageously the possibility to exploit IR data for drawing quantitative assessments on the level of carbonation of apatitic compounds, and using the areas of the two spectral

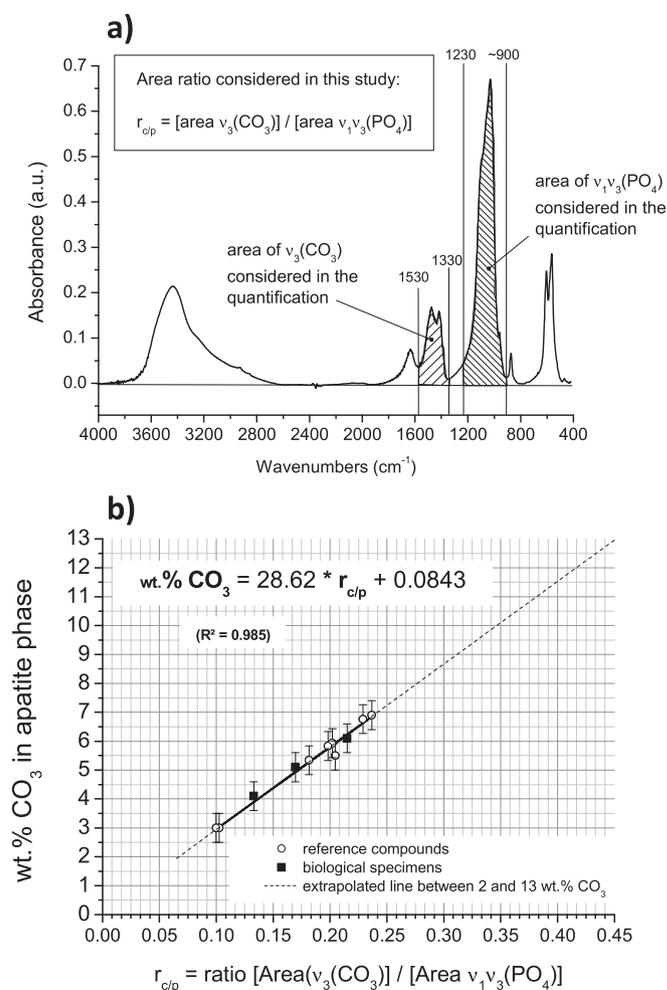


Fig. 4. FTIR methodology for carbonate quantification: a) evaluation of the ratio  $r_{c/p}$  between the integrated intensity of  $\nu_3(\text{CO}_3)$  and that of  $\nu_1\nu_3(\text{PO}_4)$ , and b) correlation between  $r_{c/p}$  and the carbonation amount (in wt.%  $\text{CO}_3$ ) in the apatite phase of synthetic reference compounds and for three biological samples.

components  $\nu_3(\text{CO}_3)$  and  $\nu_1\nu_3(\text{PO}_4)$ . The ordinate values ( $y$ -axis) given by this method are associated with an absolute error close to  $\pm 0.5\%$  on the final wt.%  $\text{CO}_3$ . In this Figure, the fitted line was graphically prolonged (dashed line) down to 2 wt.%  $\text{CO}_3$  and up to 13 wt.%  $\text{CO}_3$  to access visually the correspondence between  $r_{c/p}$  and wt.%  $\text{CO}_3$  for a larger range of carbonation levels.

If the same type of relationship is sought by considering the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  domain instead of  $\nu_1\nu_3(\text{PO}_4)$ , a poorer correlation is reached: when applied to reference samples from Table 1, a correlation coefficient of  $R^2 \sim 0.82$  is found (see Fig. AR2 in the Additional Resources). This poor agreement was expected based on the above discussion (see previous section), because the level of hydroxylation of the apatite phase is bound to vary between samples, and the  $\nu_{\text{lib}}(\text{OH})$  libration band at  $632\text{ cm}^{-1}$  cannot be easily separated from the large  $\nu_4(\text{PO}_4)$  band, therefore generating a bias to the use of the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  band in the determination of a carbonation ratio.

If  $r_{c/p}$  is calculated by considering the area of the  $\nu_2(\text{CO}_3)$  band instead of  $\nu_3(\text{CO}_3)$ , an even poorer correlation is observed with the amount of carbonate of the reference compounds, with a coefficient of  $R^2 \sim 0.46$  (Fig. AR2). Again, this illustrates the inadequacy mentioned in the previous section to inspect the carbonation level on the basis of the  $\nu_2(\text{CO}_3)$  band, which in fact also contains a non-negligible and varying  $\text{HPO}_4$  contribution among the samples.

As indicated in the introduction, the use of peak heights rather than areas has been proposed to follow the carbonation level of apatites, especially by considering the maximum at  $1415\text{ cm}^{-1}$  (in the  $\nu_3(\text{CO}_3)$  domain) relative to the phosphate maximum of the  $\nu_3(\text{PO}_4)$  band, around  $1040\text{ cm}^{-1}$  (exact position depending on the samples). Plotting the carbonate content measured by coulometry versus this height ratio led, when applied to the reference samples, to a correlation coefficient of  $R^2 \sim 0.76$  (Fig. AR2). Although a rather linear trend can be observed here, the quality of this correlation remains lower than the one obtained using the  $r_{c/p}$  area ratio ( $R^2 \sim 0.99$ ).

All of these findings validate the  $r_{c/p}$  area ratio between  $\nu_3(\text{CO}_3)$  and  $\nu_1\nu_3(\text{PO}_4)$  as the most adapted FTIR parameter to consider for carbonation quantification in apatites, this ratio being defined as the quotient between the full area of the  $\nu_3(\text{CO}_3)$  band (typically in the range  $1570\text{--}1330\text{ cm}^{-1}$ ) and the area of the  $\nu_1\nu_3(\text{PO}_4)$  band (typically in the range  $900\text{--}1230\text{ cm}^{-1}$ ).

At this point, it was interesting to check the validity of this  $\% \text{CO}_3 = f(r_{c/p})$  relationship also for biological apatites. Three skeletal specimens (two from bones and one from a tooth), as described in the experimental section, were selected to this end. The absence of calcite as secondary deposit in these biological/fossil specimens was confirmed by XRD analyses as well as IR spectroscopy (absence of the calcite band at  $712\text{ cm}^{-1}$ ). In a first step, the carbonation of each of these three samples was directly measured by coulometry. This was made possible by the occurrence of enough bone/tooth matter for the selected specimens, as  $50\text{--}80\text{ mg}$  of sample was needed in each coulometry experiment (performed at least in duplicate). As always for coulometry assays, a calibration was preliminarily done with barium carbonate ( $\text{BaCO}_3$ ). Since skeletal specimens are also associated with an organic matrix, most of which is collagenic in nature, we also ran a test with a known quantity of  $\text{BaCO}_3$  added with bovine collagen (type I from bovine Achilles tendon, Sigma Aldrich),  $12\text{ wt.}\%$  in proportion, in order to check whether the presence of this protein in the reacting cell could modify the response of the coulometer. Advantageously, no deviation of the apparatus outcome was pointed out, confirming that coulometry assays could also be run on biological specimens. Considering bone and tooth samples as containing respectively  $20$  and  $\sim 5\%$  of organic matter, the coulometry results (obtained initially with  $50\text{--}80\text{ mg}$  of bone/tooth specimen) could be corrected to derive the amount of carbonation relative to the mineral phase (apatite only) in these samples. This led to a carbonation level in the apatite phase contained in the biological samples “20th Cent”, “mid-ages”, and “Iron age” of  $\text{wt.}\% \text{CO}_3 = 5.1, 4.1, \text{ and } 6.1\%$  ( $\pm 0.5\%$ ), respectively.

In addition, FTIR spectra were collected for these three skeletal specimens, in the same conditions as was done above for synthetic reference compounds. Fig. 5 reports a typical example obtained for such biological specimens. Due to the presence of the organic matrix, the spectral signature of collagen appears clearly on the spectrum with amide bands distinguishable in the region of  $1930\text{--}1230\text{ cm}^{-1}$ , thus partly overlapping with inorganic carbonate. In order to take into account, in the  $\% \text{CO}_3 = f(r_{c/p})$  relationship, only the vibrational contribution of carbonate, a spectral treatment was carried out by subtracting a typical spectrum of type I bovine bone collagen (modern collagen from own collection; access to IR spectra for collagen with varying preservation states in link with diagenesis were not accessible to us) until minimizing the amide contributions in the above-cited region (Fig. 5). In practice, this subtraction of the collagen contribution thus consisted in increasing the multiplying factor “ $\gamma$ ” in the global equation [corrected spectrum] = [initial spectrum] –  $\gamma$ \*[collagen spectrum] until obtaining visually a negligible absorption for the amide contributions. This collagen subtraction resulted in spectra judged

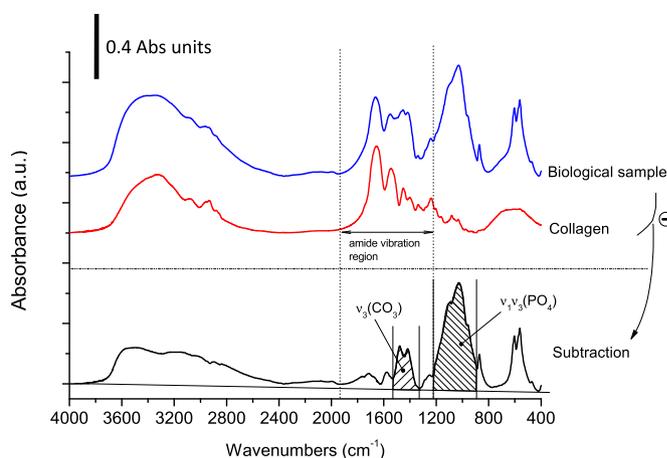


Fig. 5. Example of FTIR spectrum for biological specimen (case of Iron age bone sample) and for collagen (modern bovine bone collagen type I from own collection), and subtraction result (obtained by minimizing the intensity of amide vibrations in the  $1930\text{--}1230\text{ cm}^{-1}$  domain).

satisfactory in terms of global appearance as compared with usual FTIR data recorded for synthetic carbonated apatites (see Fig. 2). Notably, the  $\nu_1\nu_3(\text{PO}_4)$  domain was found to be only affected around the base of the absorption band without noticeable alteration of its general shape, thus making it potentially usable for quantification purposes. It may be noted that non-collagenous residues may also be present in biological/fossil specimens, however their amounts remain limited as compared to that of collagen. By analyzing by FTIR the organic residue found after acidic dissolution of the apatite mineral, we confirmed for the samples studied here that collagen was main organic component, and that non-collagenous matter led to very minor modifications of the  $1530\text{--}1330\text{ cm}^{-1}$  carbonate domain (Fig. AR3 in the Additional Resources).

After collagen subtraction, the integrated intensities of the full  $\nu_3(\text{CO}_3)$  domain (range  $1530\text{--}1330\text{ cm}^{-1}$ ) and of the  $\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$  band (between  $1230$  and  $890\text{ cm}^{-1}$ ) were measured as done previously for synthetic samples, allowing us to derive the corresponding  $r_{c/p}$  ratios. The application of Equation (1) to these data led to the respective carbonate contents of  $4.9 \pm 0.5, 3.9 \pm 0.5$  and  $5.7 \pm 0.5\%$ , for samples “20th Cent”, “mid-ages”, and “Iron age” (to be compared with  $5.1 \pm 0.5, 4.1 \pm 0.5$  and  $6.1 \pm 0.5$ ). A good agreement is, therefore, found between estimated carbonate contents calculated from Equation (1) and coulometric data for these biological samples. The three datapoints corresponding to these biological specimens have been added to the  $\% \text{CO}_3 = f(r_{c/p})$  plot in Fig. 4b, which shows graphically that the IR-based methodology described in this paper for the quantification of carbonation of apatite phases is also applicable to skeletal specimens, provided that the vibrational contribution of collagen is preliminarily subtracted.

#### 4. Concluding statements

The question of carbonate quantification in apatitic compounds, whether of synthetic or biological origin, is relevant for many reasons. In synthetic systems, the determination of the level of carbonation allows to draw conclusions relative to the degree of “biomimeticism” of the sample, for example, as compared with mature or newly-formed bone matter. The presence of carbonation ions can clearly influence crystallization processes and these ions may also stabilize the non-apatitic surface layer on apatitic nanocrystals. Synthetic carbonated apatites could also serve as reference materials in view of the establishment of calibration curves, for example, in relation to biogenic phosphates that may have been

formed at various temperatures. In this contribution, we noted the direct effect of synthesis temperature on the level of carbonation and on other parameters such as crystallinity, evidenced on the basis of FTIR spectral analysis. In the case of skeletal specimens, the exploration of the carbonate content is of prime importance for characterizing these samples and drawing conclusions on biomineralization, diagenetic evolutions, paleoecology, etc., especially by exploiting  $^{13}\text{C}$  and  $^{18}\text{O}$  isotopic responses.

In this contribution, based on FTIR data, we discussed which carbonate and phosphate vibrations bands appear the most appropriate for carbonation quantification. We then developed and tested a quantification methodology based on an area ratio between the  $\nu_3(\text{CO}_3)$  band and the  $\nu_1\nu_3(\text{PO}_4)$  contribution, with integration limits that have been defined. We also checked this methodology quantitatively in comparison with direct coulometry measurements performed both on synthetic reference samples ( $R^2 = 0.985$ ) and biological/fossil specimens, pointing out a good overall correlation. The absence of carbonated secondary deposits such as calcite should be verified for fossil specimens, for instance on the basis of XRD and/or IR analyses (e.g. absence of sharp band at  $712\text{ cm}^{-1}$ ).

The obtained relationship, expressed by Equation (1) ( $\text{wt}\% \text{CO}_3 = 28.62 * r_{c/p} + 0.0843$ ), is intended to serve in the future for more systematic and comparable studies dedicated to carbonated apatites, whether of synthetic or natural origin.

## Acknowledgments

This research was supported in part by the Institute of Ecology and Environment (INEE) and the Institute of Chemistry (INC) of the French National Center for Scientific Research (CNRS).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jas.2014.05.004>.

## References

- Boskey, A.L., DiCarlo, E., Paschalis, E., West, P., Mendelsohn, R., 2005. Comparison of mineral quality and quantity in iliac crest biopsies from high- and low-turnover osteoporosis: an FT-IR microspectroscopic investigation. *Osteoporos. Int.* 16 (12), 2031–2038.
- Cazalbou, S., Eichert, D., Drouet, C., Combes, C., Rey, C., 2004. Biological mineralizations based on calcium phosphate. *Comptes. Rendus. Palevol.* 3 (6–7), 563–572.
- Drouet, C., 2013. Apatite formation: why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds. *Biomed. Res. Int.* 2013, 12 <http://dx.doi.org/10.1155/2013/490946>. Article ID 490946.
- Eichert, D., Drouet, C., Sfihi, H., Rey, C., Combes, C., 2007. Nanocrystalline apatite-based biomaterials: synthesis, processing and characterization. In: Kendall, J.B. (Ed.), *Biomaterials Research Advances*. Nova Science Publishers, pp. 93–143.
- Elliott, J.C., 1994. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, vol. 18. Elsevier Science, Amsterdam.
- Elliott, J.C., Holcomb, D.W., Young, R.A., 1985. Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel. *Calcif. Tissue Int.* 37 (4), 372–375.
- Engleman, E.E., Jackson, L.L., Norton, D.R., 1985. Determination of carbonate carbon in geological materials by coulometric titration. *Chem. Geol.* 53 (1–2), 125–128.
- Featherstone, J.D.B., Pearson, S., Legeros, R.Z., 1984. An infrared method for quantification of carbonate in carbonated apatites. *Caries Res.* 18 (1), 63–66.
- Gee, A., Dietz, V.R., 1953. Determination of phosphate by differential spectrophotometry. *Ann. Chem.* 25, 1320–1324.
- Gomez-Morales, J., Iafisco, M., Manuel Delgado-Lopez, J., Sarda, S., Drouet, C., 2013. Progress on the preparation of nanocrystalline apatites and surface characterization: overview of fundamental and applied aspects. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* 59 (1), 1–46.
- Grunenwald, A., Keyser, C., Sautereau, A.M., Crubezy, E., Ludes, B., Drouet, C., 2014. Adsorption of DNA on biomimetic apatites: toward the understanding of the role of bone and tooth mineral on the preservation of ancient DNA. *Appl. Surf. Sci.* 292, 867–875.
- Huffman, E.W.D., 1977. Performance of a new automatic carbon-dioxide coulometer. *Microchem. J.* 22 (4), 567–573.
- Kimura-Suda, H., Kajiwaru, M., Matsumoto, N., Murayama, H., Yamato, H., 2009. Characterization of apatite and collagen in bone with FTIR imaging. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 505, 302–307.
- Kohn, M.J., Schoeninger, M.J., Barker, W.W., 1999. Altered states: effects of diagenesis on fossil tooth chemistry. *Geochim. Et. Cosmochim. Acta* 63 (18), 2737–2747.
- Kohn, M.J., Schoeninger, M.J., Valley, J.W., 1996. Herbivore tooth oxygen isotope compositions: effects of diet and physiology. *Geochim. Et. Cosmochim. Acta* 60 (20), 3889–3896.
- Landis, W.J., Hodgins, K.J., Arena, J., Song, M.J., McEwen, B.F., 1996. Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. *Microsc. Res. Tech.* 33 (2), 192–202.
- Lebon, M., Müller, K., Bellot-Gurlet, L., Paris, C., Reiche, I., 2011. Application des micro-spectrométries infrarouge et Raman à l'étude des processus diagenétiques altérant les ossements paléolithiques. *ArchéoSciences* 35, 179–190.
- Lecuyer, C., Balter, V., Martineau, F., Fourel, F., Bernard, A., Amiot, R., Gardien, V., Otero, O., Legendre, S., Panczer, G., Simon, L., Martini, R., 2010. Oxygen isotope fractionation between apatite-bound carbonate and water determined from controlled experiments with synthetic apatites precipitated at 10–37 degrees C. *Geochim. Et. Cosmochim. Acta* 74 (7), 2072–2081.
- Legros, R., Balmain, N., Bonel, G., 1987. Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone. *Calcif. Tissue Int.* 41 (3), 137–144.
- McEldeery, J.D.P., Zhu, P.Z., Mroue, K.H., Xu, J.D., Pavan, B., Fang, M., Zhao, G.S., McNerny, E., Kohn, D.H., Franceschi, R.T., Holl, M.M.B., Tecklenburg, M.M.J., Ramamoorthy, A., Morris, M.D., 2013. Crystallinity and compositional changes in carbonated apatites: evidence from P-31 solid-state NMR, Raman, and AFM analysis. *J. Solid State Chem.* 206, 192–198.
- Pasteris, J.D., Yoder, C.H., Wopenka, B., 2014. Molecular water in nominally unhydrated carbonated hydroxylapatite: the key to a better understanding of bone mineral. *Am. Mineralogist* 99 (1), 16–27.
- Pellegrino, E.D., Biltz, R.M., 1972. Mineralization in the chick embryo. I. Monohydrogen phosphate and carbonate relationships during maturation of the bone crystal complex. *Calcif. Tissue Res.* 10 (2), 128–135.
- Price, T.D., Schoeninger, M.J., Armelagos, G.J., 1985. Bone chemistry and past behavior – an overview. *J. Hum. Evol.* 14 (5), 419–447.
- Puceat, E., Reynard, B., Lecuyer, C., 2004. Can crystallinity be used to determine the degree of chemical alteration of biogenic apatites? *Chem. Geol.* 205 (1–2), 83–97.
- Rey, C., Collins, B., Goehl, T., Dickson, I.R., Glimcher, M.J., 1989. The carbonate environment in bone-mineral – a resolution enhanced Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy study. *Calcif. Tissue Int.* 45 (3), 157–164.
- Rey, C., Combes, C., Christophe, D., Grossin, D., 2011. Bioactive ceramics: physical chemistry. In: Ducheyne, P., Healy, K.E., Huttmacher, D.W., Grainger, D.W., Kirkpatrick, C.J. (Eds.), *Comprehensive Biomaterials*. Elsevier, pp. 187–221.
- Roche, D., Segalen, L., Balan, E., Delattre, S., 2010. Preservation assessment of Miocene–Pliocene tooth enamel from Tugen Hills (Kenyan Rift Valley) through FTIR, chemical and stable-isotope analyses. *J. Archaeol. Sci.* 37 (7), 1690–1699.
- Shemesh, A., 1990. Crystallinity and diagenesis of sedimentary apatites. *Geochim. Cosmochim. Acta* 54 (9), 2433–2438.
- Shimoda, S., Aoba, T., Moreno, E.C., Miake, Y., 1990. Effect of solution composition on morphological and structural features of carbonated calcium apatites. *J. Dent. Res.* 69 (11), 1731–1740.
- Sosa, C., Vispe, E., Nunez, C., Baeta, M., Casalod, Y., Bolea, M., Hedges, R.E.M., Martinez-Jarreta, B., 2013. Association between ancient bone preservation and DNA Yield: a multidisciplinary approach. *Am. J. Phys. Anthropol.* 151 (1), 102–109.
- Sponheimer, M., Lee-Thorp, J.A., 2001. The oxygen isotope composition of mammalian enamel carbonate from Morea Estate, South Africa. *Oecologia* 126 (2), 153–157.
- Suarez, C., Kohn, M., 2011. Does carbonate content of biogenic apatite correlate with body temperature? *J. Vertebrate Paleontol.* 31, 201–201.
- Termine, J.D., Posner, A.S., 1966. Infra-ref determination of the percentage of crystallinity in apatitic calcium phosphates. *Nature* 211, 268–270.
- Thompson, T.J.U., Islam, M., Piduru, K., Marcel, A., 2011. An investigation into the internal and external variables acting on crystallinity index using Fourier Transform Infrared Spectroscopy on unaltered and burned bone. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 299 (1–2), 168–174.
- Trueman, C.N., Privat, K., Field, J., 2008. Why do crystallinity values fail to predict the extent of diagenetic alteration of bone mineral? *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 266 (3–4), 160–167.
- Tütken, T., Vennemann, T.W., 2011. Fossil bones and teeth: preservation or alteration of biogenic compositions? *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 310 (1–2), 1–8.
- Vandecastelle, N., Rey, C., Drouet, C., 2012. Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (11), 2593–2606.
- Weiner, S., Bar-Yosef, O., 1990. States of preservation of bones from prehistoric sites in the near east: a survey. *J. Archaeol. Sci.* 17 (2), 187–196.
- Weiner, S., Wagner, H.D., 1998. The material bone: structure mechanical function relations. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 28, 271–298.

## **Chapitre II. Problématiques liées à l'ADN et à l'ADN ancien**

---

### **A Propriétés physico-chimiques de l'ADN**

- 1 Généralités
- 2 Facteurs de stabilité de la molécule d'ADN double-brin
- 3 Biopolymère anionique
- 4 Remarques conclusives

### **B Dégradation et modifications chimiques taphonomiques de l'ADN**

- 1 Dégradation enzymatique de l'ADN
- 2 Dégradation non-enzymatique de l'ADN
- 3 Remarques conclusives

### **C Introduction aux méthodes d'étude de l'ADN ancien**

- 1 Prétraitements de l'échantillon
- 2 Extraction de l'ADN ancien
- 3 Purification
- 4 Amplification et typage

## Préambule

L'ADN est une macromolécule complexe étudiée selon plusieurs dimensions, en fonction du domaine d'étude (illustrées sur la Figure II-1). Les biologistes et les généticiens se concentrent sur la dimension informative et fonctionnelle de l'ADN, notamment en termes de séquences de paires de bases (pb) ou de domaines spécifiques de liaison des facteurs de transcription. C'est cette dimension qui est étudiée *in fine* – par la lecture des séquences d'ADN extraits de restes squelettiques – dans les études archéo-anthropologiques ou médico-légales basées sur l'ADN.

Dans ce travail, l'ADN est surtout étudié pour sa dimension structurale, ce qui déplace l'objet de l'étude dans le domaine de la physico-chimie. Ce sont en effet ces propriétés qui déterminent la stabilité intrinsèque de l'ADN, ainsi que son comportement vis-à-vis de son substrat (interaction avec d'autres composants du tissu osseux/dentaire) et de son environnement. Ces facteurs vont donc déterminer sa préservation à long-terme. Dans ce cas, les termes de polymère ou polyélectrolyte seront plus descriptifs que le terme séquence d'ADN pour envisager le comportement de l'ADN en solution et les phénomènes d'adsorption ADN – substrat.

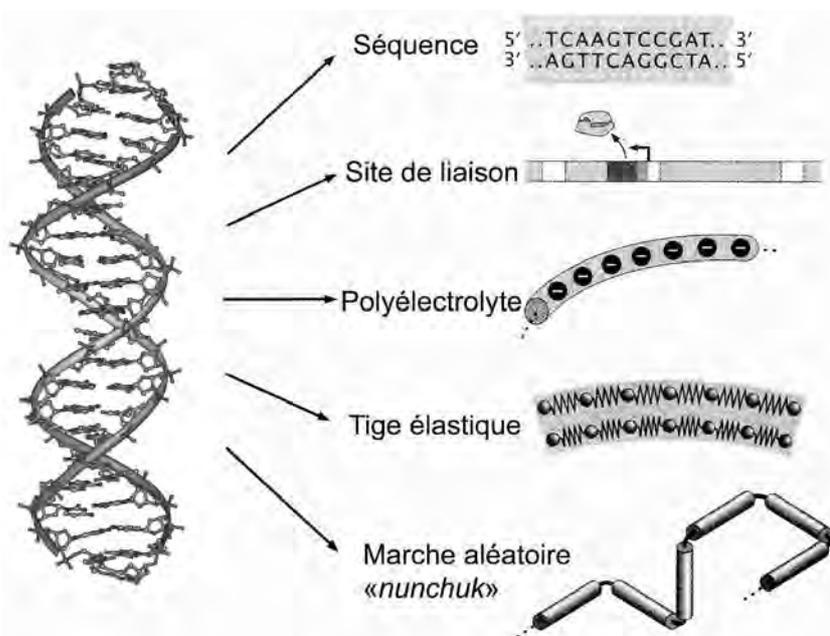


Figure II-1 Modélisations possibles de l'ADN selon l'angle d'observation : séquence de paires de bases, succession de sites de liaison de facteurs de transcription, polymère chargé, polymère élastique, polymère agencé selon une marche aléatoire de segments rigides (« *nunchuk* »), d'après Phillips *et al.*, 2012

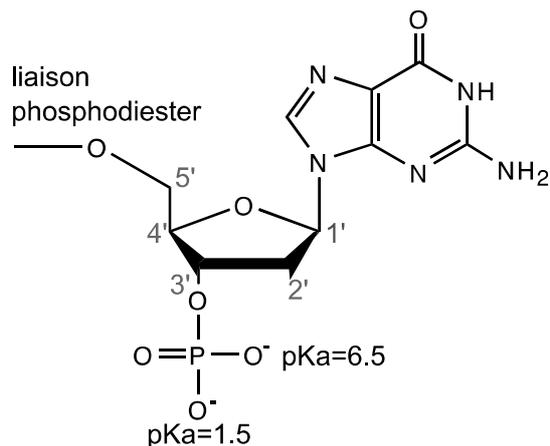
## A PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ADN

En comparaison avec d'autres biomolécules, les molécules d'ADN sont relativement peu réactives. La principale fonction de l'ADN est en effet d'assurer le stockage et l'intégrité de l'information génétique. Néanmoins, en dehors de l'action des différentes enzymes impliquées dans les fonctions biologiques, l'ADN peut également subir des modifications spontanées de type physique (irradiation) ou chimique (hydrolyse, oxydation, méthylation non-enzymatique principalement). Après la mort de l'organisme, les dommages subis par l'ADN ne sont plus réparés, ce qui constitue une des difficultés majeures de l'étude de l'ADN ancien.

### 1 Généralités

L'unité de base de l'ADN est représentée par le nucléotide, ou plus généralement nucléoside mono-phosphate. Les nucléotides sont constitués d'une base azotée dite purique (adénine et guanine) ou pyrimidique (thymine et cytosine), d'un pentose (sucre à 5 atomes de carbone) relié à la base par une liaison osidique (Figure II-2), et relié au groupement phosphate par une liaison (phospho)ester. Avant d'être incorporés dans la chaîne d'ADN, les nucléosides possèdent trois groupements phosphate (désoxyribonucléosides triphosphate ou dNTP) et sont obtenus par la réduction du groupement hydroxyle (OH) en position 2' du pentose des nucléosides triphosphates (ATP, GTP, TTP, CTP). L'ADN polymérase, dans les processus *in vivo* et *in vitro* (ex. PCR), catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre l'extrémité 3'OH libre du nucléotide de la chaîne d'ADN en croissance et l'extrémité 5'phosphate du NTP ajouté (Bloomfield *et al.*, 2000).

La complémentarité des bases A-T et G-C, qui s'associent par respectivement deux et trois liaisons hydrogène, guident l'empilement successif des nucléotides pour former la double hélice d'ADN, illustrée en Figure II-3. Le squelette externe de la double hélice est formé par l'agencement régulier des groupements sucre-phosphate liés de façon covalente. Les données sensibles de l'ADN, représentées par la succession caractéristique des bases azotées, seront protégées au sein de cette structure, tout en restant accessible à leur lecture par simple dénaturation des liaisons hydrogène.



**Figure II-2** Guanidine mono-phosphate terminale impliquée dans une liaison phosphodiester. L'extrémité phosphate libre possède deux sites d'ionisation, aux valeurs de pKa respectivement de 1,5 et 6,5

Les plans formés par les atomes de ces bases sont parallèles les uns aux autres (plans face à face), perpendiculaires à l'axe de la double hélice et distants entre eux de 0,34 nm. Il existe néanmoins trois conformations possibles pour l'ADN double brin, dont les caractéristiques sont résumées dans le Tableau II-1: la forme B est la conformation la plus stable et correspond à la forme native de l'ADN. En milieu déshydraté, l'ADN peut adopter une conformation dite A plus compactée (hélice plus courte et plus large). L'intérêt biologique de la forme Z est encore mal élucidé, mais dans ce cas, le pas de l'hélice se dirige vers la gauche.

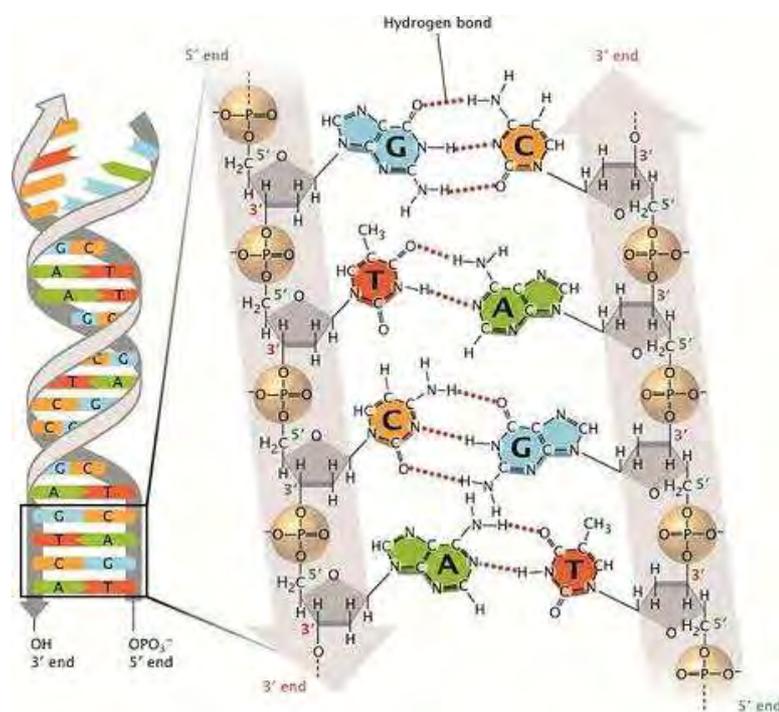
**Tableau II-1** Caractéristiques spatiales idéales des différentes conformations de la double hélice d'ADN d'après S. Mainlt Arnott S. dans S. Neidle (Ed.), *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*, p.35, Oxford University Press, 1999

Propriétés	B	A	Z
sens du pas d'hélice	droit	droit	gauche
pb par tour	10,4	11,6	12 (6 dimères)
pas	3,4 nm	2,8 nm	4,5 nm
hauteur par paires de bases	0,34 nm	0,29 nm	0,74 nm/dimère
diamètre	2 nm	2,6 nm	1,8 nm

## 2 Facteurs de stabilité de la molécule d'ADN double-brin

### 2.1 Stabilité intrinsèque

La stabilité de la double hélice d'ADN met en jeu les propriétés intrinsèques des groupements et des liaisons qui la composent. La conformation tridimensionnelle de cette molécule joue un rôle fondamental : elle découle en partie de ces propriétés, mais dépend fortement de facteurs physico-chimiques environnementaux (température, composition du solvant) (Naimushin *et al.*, 2000).



**Figure II-3 Structure moléculaire d'une région d'ADN double-brin illustrant l'agencement des nucléotides formés par une base azotée (en couleur), un sucre à 5 carbones (en gris), et un groupement phosphate (sphère marron). A gauche : le squelette sucre - phosphate de chaque brin de l'ADN (représenté par deux flèches grises) est agencé de manière antiparallèle (alignement des extrémités 3'OH et 5'OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). A droite : deux liaisons hydrogènes relient les bases T et A, trois liaisons hydrogènes relient G à C. Les groupements phosphate exposent leur charge négative vers l'extérieur de la double hélice**  
© 2013 Nature Education

#### 2.1.1 Squelette sucre-phosphate

La nature de la liaison phosphodiester 3'–5' conditionne à elle seule la dépolymérisation des acides nucléiques (Eglinton *et al.*, 1991). Formée par un groupe de liaisons covalentes

fortes, sa rupture *in vivo* (cf. réparation de l'ADN) ou *post mortem* est essentiellement catalysée par des enzymes.

L'absence du groupement OH libre très réactif en 2' du pentose est un facteur primordial de stabilité de l'ADN vis-à-vis des dommages hydrolytiques. En effet, ce groupement OH se comporte comme un nucléophile vis-à-vis du phosphate impliqué dans la liaison phosphodiester dans l'ARN (Williams, 2004). En milieu alcalin, l'hydrolyse alcaline de la liaison phosphodiester des ARN est rapidement réalisée au profit de la cyclisation du nucléoside ainsi libéré (2'-3'-phosphonucléoside cyclique) (Williams, 2004). Une autre conséquence de cette caractéristique sera la bonne stabilité de l'ADN en milieu alcalin (Lindahl et Nyberg, 1972) (ex. tampon Tris-EDTA, utilisé en routine pour la conservation de l'ADN, ajusté à pH8).

### 2.1.2 Bases azotées

La conformation tridimensionnelle de l'ADN double-brin est guidée par les liaisons hydrogènes entre les bases complémentaires (~1 kcal/mol soit ~4,18 kJ/mol). La dénaturation de l'ADN est ainsi favorisée dans un solvant peu polaire (ex.: éthanol) (Voet et Voet, 2005). Un ADN riche en bases G et C, impliquées dans trois liaisons hydrogènes, sera moins susceptible d'être dénaturé.

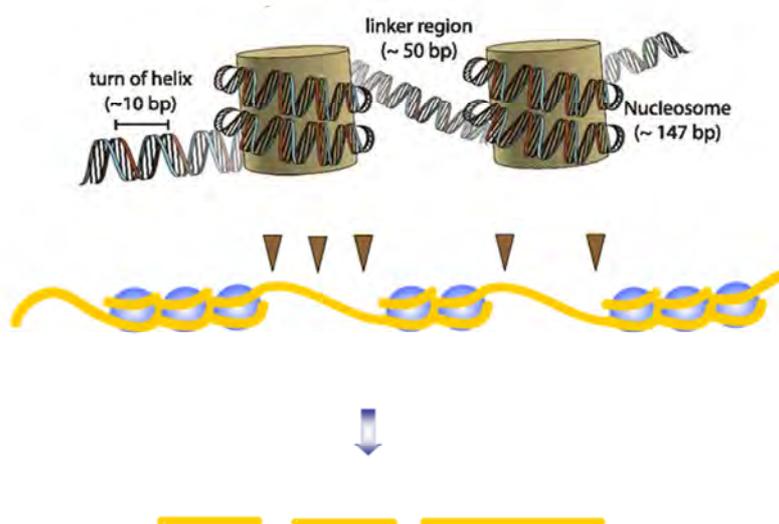
L'ADN simple-brin possède une certaine stabilité liée aux forces d'empilement (Chen *et al.*, 2007). Ces interactions  $\pi$ - $\pi$  entre les cycles aromatiques des bases empilées adjacentes joueraient un rôle plus important que les liaisons hydrogènes dans la stabilité de l'ADN (Mills et Hagerman, 2004). Il a été observé un empilement spontané des bases en solution (Voet et Voet, 2005). Ces interactions incluent des forces de dispersion de London, des attractions dipôle-dipôle, des effets hydrophobes et des interactions électrostatiques (Acharaya, 2006; Chen *et al.*, 2007).

Les brins complémentaires de l'ADN ont tendance à s'apparier spontanément sous forme de double-hélice, configuration plus stable que l'ADN simple-brin. L'ADN simple-brin est bien moins résistant à la dégradation que l'ADN double-brin, notamment en offrant une meilleure protection des bases vis-à-vis des dommages hydrolytiques (Lindahl, 1993). L'ADN extrait de substrats anciens est classiquement retrouvé sous forme double-brin, comme un substrat d'ADN natif (Orlando et Hänni, 2000). Les bases de l'ADN ancien

(ADNa) seront cependant sujettes à des modifications chimiques voire à des excisions (voir Chapitre II.B2).

### 2.1.3 Histones et autres protéines

La structure tertiaire correspond aux surenroulements de l'ADN nucléaire, que l'on retrouve *in vivo*, induits par l'action des topoisomérases, qui permettent le conditionnement du génome nucléaire (trois milliards de pb) dans un volume nucléaire moyen de 100-120  $\mu\text{m}^3$ . Dans les cellules eucaryotes, l'ADN nucléaire est protégé et condensé à l'intérieur du noyau par son association avec de nombreuses protéines. Ces particules nucléoprotéiques constituent le premier degré de compaction de la chromatine, illustrée sur la Figure II-4. Les nucléosomes sont ainsi formés par un complexe de huit histones, petites protéines basiques en raison des fonctions amine portées par les résidus arginine et lysine, dont les charges positives interagissent avec les charges négatives des phosphates de l'ADN, sur une longueur de 147 pb au niveau du cœur du nucléosome. La région de liaison entre deux nucléosomes s'étend quant à elle sur environ 50 pb.



**Figure II-4** *En haut*. Représentation schématique de l'enroulement de l'ADN nucléaire autour du nucléosome (d'après Pedersen *et al.*, 2014). *En bas*. Effet d'une digestion DNasique d'un fragment de chromatine au niveau des sites internucléosomiques (pointés par des flèches) © Creative Commons

La fragmentation apoptotique de l'ADN nucléaire génère des fragments de 180 pb (ou multiples de 180 pb) en raison de la sensibilité accrue de l'ADN internucléosomique à la

digestion enzymatique (Bortner *et al.*, 1995). Les histones pourraient donc jouer un rôle non négligeable dans la préservation de l'ADN nucléaire en limitant l'action des endonucléases endogènes qui clivent les molécules d'ADN lors de la mort cellulaire.

Les fragments d'ADN extraits de restes squelettiques anciens ont cependant habituellement une longueur nettement inférieure à 150 pb, avec une moyenne qui se situe autour de 50 à 80 pb (Dabney *et al.*, 2013; García-Garcerà *et al.*, 2011 ; Pedersen *et al.*, 2013). Cependant, l'empreinte du nucléosome a pu être mise en évidence sur des molécules d'ADN ancien (Pedersen *et al.*, 2014). En effet, les régions (autrefois) occupées par le nucléosome sont mieux préservées, ce qui permet un plus grand nombre de lecture de ces séquences, en comparaison avec l'ADN internucléosomique. De plus, selon la même étude, la fragmentation du génome nucléaire ancien étudié révèle un motif périodique de 10 pb, ce qui correspond à un tour de spire de la double-hélice. Ceci pourrait être le reflet du clivage préférentiel dans les zones où l'ADN qui n'est plus protégé par le nucléosome (voir Figure II-4)

L'ADN mitochondrial fait également partie d'un système nucléoprotéique, même si les protéines impliquées dans la stabilité/protection de l'ADN restent mal connues.

**L'ADN ancien, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est donc susceptible d'être associé à des protéines à plus ou moins long terme, voire au moment de son extraction**

## 2.2 Stabilité et réactivité de l'ADN en solution aqueuse

### 2.2.1 Propriétés acido-basiques

Dans un solvant polaire, à pH physiologique, l'ADN est sous sa forme de base conjuguée. Le site d'ionisation libre du phosphate a en effet un  $pK_a=1,5$ . L'autre site d'ionisation ( $pK_a=6,5$ ), habituellement impliqué dans la liaison phosphodiester, est également partiellement ionisé au niveau de l'extrémité 5'P à pH physiologique (Acharaya, 2006) (les  $pK_a$  des fonctions acides des groupements phosphate sont indiqués sur la Figure II-2). Par conséquent, l'ADN, dans les fluides biologiques, se comporte en réalité comme un sel au sein d'un système à plusieurs composantes impliquant notamment les sites déprotonés, leurs co-ions, c'est-à-dire les protons libérés par la déprotonation d'une fonction acide du phosphate,

et les contre-ions :  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , ou encore les fonctions amines des polyamines, des résidus arginine ou lysine (Kabir *et al.*, 2013; Lindahl, 1996; Shew et Yethiraj, 2002).

En condition fortement basique ( $\text{pH} > 10$ ), la dénaturation de l'ADN double-brin est obtenue suite à la protonation des bases et la déstabilisation des liaisons hydrogène. À l'inverse, à pH très acide ( $\text{pH} < 3$ ), l'hydrolyse des liaisons phosphodiester dégrade l'ADN. Pour des valeurs de pH acide supérieures, l'ADN précipite sans être hydrolysé ( $3 < \text{pH} < 4$ ). Historiquement, l'acide trichloracétique à 8% (voire l'acide chlorhydrique) était en effet employé pour précipiter les acides nucléiques (Didier de Saint-Amand et Zuckerman, 1968 ; Fries, 1952)<sup>13</sup>.

### 2.2.2 Solubilité

Contrairement à l'intérieur de la double hélice où les bases empilées sont liées par des interactions qui sont de type hydrophobe (Voet et Voet, 2005), le squelette sucre-phosphate de l'ADN est hydrophile, ce qui rend la molécule d'ADN hautement polaire. Les molécules d'eau se lient fortement (Lindahl, 1996) à l'ADN de manière quasi-stœchiométrique au sein des sillons de la double-hélice ( $\sim 20$  mol  $\text{H}_2\text{O}$ /mol pb) (Douarche, 2007; Lindahl, 1996; Mrevlishvili *et al.*, 2001). Celles-ci s'agencent au niveau des phosphates  $\text{PO}_2^-$ , ou au niveau des sucres et des bases, par des liaisons hydrogènes respectivement faibles et fortes ; elles jouent un rôle structural fondamental, notamment dans les transitions entre les configurations possibles de la double-hélice (ex. transition B-Z) (Khesbak *et al.*, 2011).

En revanche, ces sels d'ADN précipitent dans les solvants non polaires (éthanol, isopropanol) en présence de fortes concentrations en sels, du fait de la diminution de l'hydratation des molécules. En effet, le départ des molécules d'eau enveloppant le squelette sucre-phosphate favorise les interactions entre les groupements  $\text{PO}_4^{2-}$  des polynucléotides et les cations en solutions. Cette propriété est couramment utilisée pour purifier l'ADN en solution aqueuse (Sambrook et Russell, 2001).

---

<sup>13</sup> Cette propriété explique la difficulté d'un dosage d'ions phosphate libres en présence d'ADN (cf. partie matériels et méthodes).

### 3 Biopolymère anionique

Les acides nucléiques sont des polymères de nucléotides. Etant donné que les groupements phosphates sont susceptibles de s'ioniser et de s'associer avec des contre-ions, la molécule d'ADN peut donc être considérée comme un polyélectrolyte (ou macro-ion), à l'instar d'autres biomolécules comme les protéines ou les glycosaminoglycanes. En effet, chaque paire de base est associée à deux groupements phosphate ionisés à pH physiologique, soit deux charges négatives sur une distance de 0,34 nm (ADN-B). La structure compacte en double-brin de l'ADN peut être décrite comme un cylindre « simple-brin », avec une répartition des charges négatives tous les 0,17 nm.

Quelques notions générales de physique des polymères sont introduites ici pour aider à la compréhension des phénomènes d'adsorption de l'ADN à un substrat.

#### 3.1 Notions générales de conformation appliquées à un polymère neutre

Considérant une chaîne idéale où chaque monomère est indépendant l'un de l'autre, la probabilité que la distance entre les deux extrémités de la chaîne (ou **longueur de contour**) soit égale à la longueur de la chaîne suit une loi gaussienne (Douarche, 2007). Dans ce cas, la géométrie de la chaîne correspond au modèle de la chaîne librement jointe ou de la marche aléatoire.

Dans le cas de l'ADN dans un très bon solvant, les différents segments de la chaîne éviteront de s'entrecouper, ce qui peut être décrit par un comportement de type marche auto-évitante (Douarche, 2007) ou de volume exclu (Esquenet, 2003). Dans ce cas, le volume occupé par la chaîne est plus important que pour la chaîne gaussienne (on définit alors un coefficient de gonflement).

Une autre mesure courante qui caractérise la configuration d'un polymère est le **rayon de giration** ( $R_G$ ). Le rayon de giration est la moyenne quadratique de la distance d'un ensemble de segments à partir de leur centre de gravité commun (le cas échéant, du centre de la pelote). Le rayon de giration peut être exprimé en fonction du degré de polymérisation par la relation  $R_G \propto N^{\nu} \cdot l$  où  $N$  et  $l$  sont respectivement le nombre et la longueur des segments (Esquenet, 2003; Trabuco et Villa, n.d.). L'exposant  $\nu$  renvoie aux travaux de Flory qui a élaboré une théorie de champ moyen pour décrire les polymères en tenant compte des interactions entre

monomères (Flory, 1953). En régime de volume exclu, cet exposant est égal à 0,588 (d'après les travaux de de Gennes) (de Gennes, 1979).

En réalité, les liaisons entre monomères présentent une certaine rigidité. Ceci induit une certaine résistance à la flexion (ou élasticité) définie par la **longueur de persistance**. C'est la longueur au-delà de laquelle deux segments de la chaîne ne sont plus corrélés en position. Plus la longueur de persistance est grande, plus le polymère sera rigide. De cette propriété découle plusieurs modélisations possibles : le modèle du ver (« *continuous worm-like chain* ») ou celui de la marche aléatoire de segments rigides, dits de Kuhn (modèle du « *nunchuk* » ou « *discrete worm-like chain* »).

Le modèle du ver considère une élasticité continue sur toute la longueur de la chaîne, avec un coût énergétique pour « tordre » la molécule inversement proportionnel à la longueur et qui dépend également de la température, de l'angle de rotation et de la longueur de persistance. L'énergie nécessaire pour tordre la molécule sera donc plus importante si la chaîne est courte. Ce modèle ne s'appliquerait qu'aux longues chaînes d'ADN, de plusieurs centaines de microns (Jeon et Sung, 2013). De la même façon, la relation  $R_G \propto N^{0.588}$  ne s'appliquerait qu'à des molécules plus grandes que 6 à 10 kilobases (Douarche, 2007).

Le modèle de la chaîne équivalente de Kuhn – ou du « *nunchuk* » (Brinkers *et al.*, 2009; Jeon et Sung, 2013; Phillips *et al.*, 2012) (voir Figure II-1) – est un modèle utile à la compréhension des possibilités de compaction de l'ADN. Selon ce modèle, le polymère est discrétisé en une série de segments rigides, de longueur égale au double de la longueur de persistance dans le cas d'une chaîne semi-flexible et connectés par des régions flexibles (Phillips *et al.*, 2012). Les différentes portions parallèles de la chaîne se rapprochent l'une de l'autre en fonction de la concentration saline du milieu (Brinkers *et al.*, 2009; Gelbart *et al.*, 2000; Rudiuk, 2009).

En première approximation, un fragment d'ADN de longueur inférieure à sa longueur de persistance se comportera en solution comme une tige flexible (Jeon et Sung, 2013). Néanmoins, cette flexibilité est sous-estimée par les modélisations classiques (Naimushin *et al.*, 2000; Wiggins *et al.*, 2006).

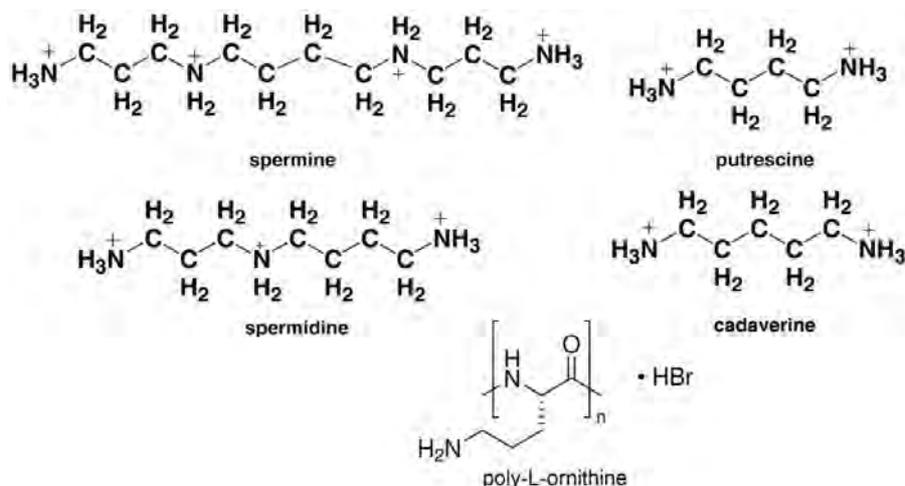
### 3.2 Conformation d'un polyélectrolyte

La molécule d'ADN double-brin est en réalité un polyélectrolyte semi-flexible appartenant à un ensemble complexe incluant les contre-ions qui assurent l'électroneutralité

du système (Shew et Yethiraj, 2002). En l'absence de sels, la conformation tridimensionnelle de la molécule d'ADN dépend d'un régime de répulsion entre les charges négatives exposées à la surface de la double-hélice (Tomić *et al.*, 2012). Dans sa thèse, C. Douarche cite « *des phénomènes de répulsion entre les monomères [qui] conduisent par exemple à une expansion de la chaîne par rapport à la conformation qu'aurait une chaîne chimiquement identique mais neutre. La chaîne d'ADN est caractérisée par une marche auto-évitante* ».

La longueur de persistance de l'ADN double-brin varie en fonction de la concentration et la valence des sels de la solution. En présence de cations monovalents, la longueur de persistance est évalué à 100 nm pour une force ionique (ions monovalents) de 1,9 mM, et décroît jusqu'à 50 nm (environ 150 pb) pour une force ionique de 4 mM à 1 M (Douarche, 2007; Gelbart *et al.*, 2000; Naimushin *et al.*, 2000; Rudiuk, 2009). Dans ce cas, la diminution de la longueur de persistance liée à la présence de cations en solution découle de la neutralisation partielle des charges portées par l'ADN. En condition physiologique, les cations monovalents au voisinage de la double hélice jouent un rôle important dans la stabilité et la flexibilité de celle-ci. Selon une modélisation possible (découlant de la relation de Poisson-Boltzmann), la répulsion électrostatique entre deux chaînes ou segments chargées décroît en fonction de la distance qui les sépare, de façon monotone en solution non saline, de façon exponentielle en présence de sels (Gelbart *et al.*, 2000). Mais ceci ne peut expliquer le phénomène de condensation de l'ADN en présence d'ions plurivalents.

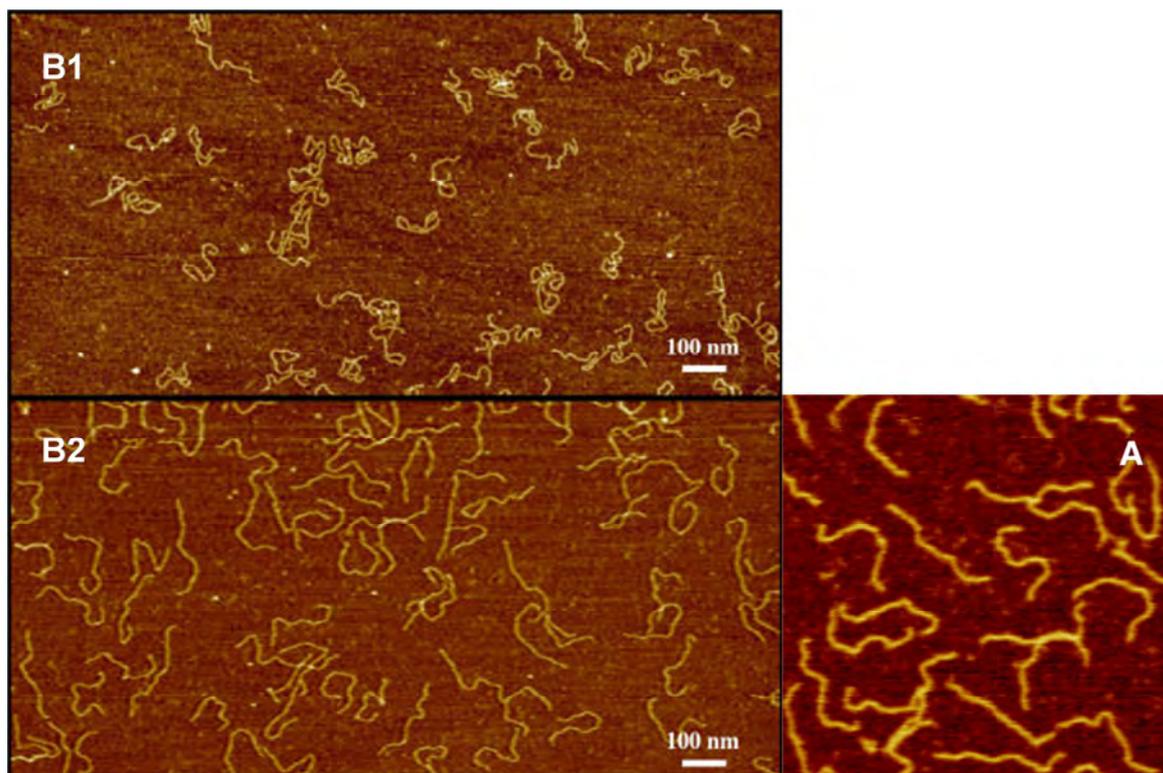
En présence d'ions plurivalents, par exemple de type polyamine, il est reporté une diminution de la longueur de persistance jusqu'à 35 pb (Podesta *et al.*, 2005). A l'instar des histones, les polyamines ont une grande affinité pour l'ADN et peuvent réduire le phénomène de répulsion entre les charges négatives des phosphates de telle sorte que les brins d'ADN se condensent en solutions diluées. Ces composés produisent un effondrement d'une chaîne sur elle-même en condition diluée ou une agrégation à l'échelle de plusieurs molécules en condition plus concentrée ; ce phénomène dépend de la concentration en ions polyvalents (visible sur la Figure II-6). Les polyamines d'origine biologique jouent un rôle dans le maintien de la structure, de la conformation et des fonctions de l'ADN au sein de la cellule, notamment en influant sur la compaction du génome à l'intérieur du noyau. Ces composés sont susceptibles d'être liés à l'ADN dans les premiers stades *post mortem*. Comme leurs noms l'indiquent, putrescine (butane-1,4-diamine) et cadavérine (1,5-diaminopentane) proviennent de la dégradation d'acides aminés dans les organismes morts, par la décarboxylation respective de l'ornithine et de la lysine.



**Figure II-5 Formules chimiques développées des polyamines d'origine biologique et de la poly-L-ornithine**

La microscopie à force atomique (AFM pour *Atomic Force Microscopy*) permet d'obtenir des données qualitatives et quantitatives sur les conformations possibles de l'ADN adsorbé sur une surface plane et homogène (mica). La Figure II-6A représente de tels fragments (~540 pb), en présence de concentrations faibles en ions mono- et divalents (Lysetska *et al.*, 2002). Des fragments courts d'ADN (1 à 3 kb) présentent des degrés de flexion variables en fonction de la concentration en ions polyvalents (poly-L-ornithine, voir formule dans la Figure II-5), ce qui est visible sur la Figure II-6B (Podesta *et al.*, 2005; Wiggins *et al.*, 2006).

Il est intéressant de noter que les polyamines se lient plus ou moins fortement en fonction de la charge de l'amine selon la relation spermine > spermidine > putrescine > cadavérine (Kabir *et al.*, 2013) (voir formules sur la Figure II-5). En effet, spermidine et spermine possèdent respectivement trois et quatre fonctions amines ionisées tandis que les diamines n'en possèdent que deux.



**Figure II-6** Fragments d'ADN adsorbés sur une surface de mica visualisés par AFM (A) Fragments d'ADN double-brin de 538 pb en présence de 2 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM NiCl<sub>2</sub>, 8 mM HEPES, pH 8 (Lysetska *et al.*, 2002) (B) Les molécules d'ADN de 896 pb sur une surface prétraitée à la poly-L-ornithine de 49 kDa sont plus compactes en présence de 100 µg/ml (B1) qu'en présence de 0,018 µg/ml de polyamine (B2) (Podesta *et al.*, 2005)

### 3.3 Viscosité

La viscosité de l'ADN en solution, c'est-à-dire sa résistance à l'écoulement, est une propriété hydrodynamique qui dépend de plusieurs propriétés de la molécule d'ADN : le degré de polymérisation des molécules (ex. solution d'ADN génomique), les possibilités d'interactions intermoléculaires ainsi que la conformation de la molécule. Par conséquent, la viscosité de la solution d'ADN est, dans une certaine mesure, corrélée à la concentration en cations (Scruggs et Ross, 1964) : la viscosité de la solution diminue quand la concentration en cations divalents augmente. L'effet est moindre pour les cations monovalents ; aucun changement de viscosité n'est observé entre 0,1 et 0,5M. Ces phénomènes sont d'autant plus importants que la longueur des fragments d'ADN est importante. Pour des fragments courts (20 – 400 pb), l'effet de la force ionique sur la viscosité de la solution est négligeable (Tsortos *et al.*, 2011) ; cette longueur se situe en effet aux alentours de la longueur de persistance de l'ADN.

La dépendance de la viscosité d'une solution de polyélectrolyte vis-à-vis de la concentration est moindre que pour une solution de polymère neutre. En effet, la viscosité d'un polyélectrolyte en solution est proportionnelle à la racine carrée de la concentration (Dobrynin et Rubinstein, 2005); pour les polymères non chargés, la viscosité est proportionnelle à la concentration en polymère. Ceci permet l'existence de solution d'ADN de concentration élevée, de haute viscosité, sans phénomène de précipitation ou séparation de phase (Gelbart *et al.*, 2000). C'est notamment le cas de la solution d'ADN partiellement fragmenté commercialisée par Trevigen<sup>®</sup>, utilisée dans cette étude, et concentrée à 10 mg/mL. Cette valeur de concentration serait également celle de l'ADN nucléaire dans le noyau des cellules de Mammifères (Tsortos *et al.*, 2011). Une viscosité importante de la solution liée à la concentration d'ADN est un facteur limitant pour atteindre l'équilibre à saturation lors des isothermes d'adsorption.

Cependant, après la mort de l'organisme, l'autolyse cellulaire, la dégradation enzymatique de biopolymères et la libération de fragments courts de génome dans le milieu tendent à considérer les molécules d'ADN dans un régime semi-dilué à dilué où les interactions polymère-polymère impactent peu. Dans ce cas, plusieurs paramètres influent sur la viscosité dite « intrinsèque » : la masse molaire (ou longueur de la molécule d'ADN) selon la relation de Mark–Houwink (Équation II-1), la conformation de l'ADN en solution (liée à la force ionique), la nature du solvant et la température (Lee et Tripathi, 2005).

$$[\eta] = K \times M^\alpha \quad \text{Équation II-1}$$

[η]	<i>viscosité intrinsèque</i>
M	<i>masse molaire</i>
K, α	<i>paramètres déterminés graphiquement liés au système solvant-polymère</i>

#### 4 Remarques conclusives

Le comportement hydrodynamique de l'ADN en solution est sous la dépendance de sa nature polymérique et anionique. Les propriétés physiques intrinsèques du polymère dictent ses possibilités de conformation, en déterminant son degré de flexibilité (longueur de persistance) et le volume qu'il occupe en solution. Etant donné son degré d'ionisation, les interactions de type électrostatique – qui peuvent être modulées en fonction de la force ionique – jouent un rôle fondamental dans la conformation.

Les phénomènes électrostatiques déterminent en effet la conformation tridimensionnelle de l'ADN en solution, en raison du régime de répulsion électrostatique intramoléculaire lié à l'exposition des charges négatives par les groupements phosphate. La conformation de l'ADN sera susceptible d'influencer en retour les aspects qualitatifs et quantitatifs de l'adsorption de l'ADN sur un substrat solide (Figure II-7). Une conformation plus relâchée favorisera les contacts multidentates, tandis qu'une conformation plus compacte augmentera le nombre de molécules adsorbées par unité de surface. D'autre part, la conformation pourra également influencer sur les réactions enzymatiques à l'origine de la dégradation de l'ADN.

La charge de l'ADN et de la surface de l'adsorbant sont susceptibles de déterminer les caractéristiques physico-chimiques de l'interaction ADN-adsorbant. S'ils sont négligeables en solution diluée, les phénomènes de répulsion entre molécules d'ADN seront significatifs à la surface du solide lors de l'adsorption. Les contre-ions en solution pourront diminuer les phénomènes répulsifs, ou au contraire masquer les charges à l'origine de l'interaction. Parallèlement, la contrainte imposée au polyelectrolyte par l'adsorption sur une surface solide pourra induire des changements dans sa conformation.

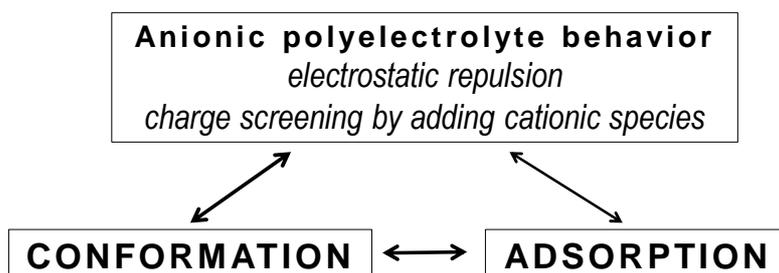


Figure II-7 Représentation schématique des conséquences de la nature polyelectrolytique de l'ADN sur sa conformation et ses propriétés d'adsorption

## **B DEGRADATION ET MODIFICATIONS CHIMIQUES TAPHONOMIQUES DE L'ADN**

Un ensemble de processus taphonomiques contribuent à la dégradation de l'ADN. Le principal phénomène de dégradation de l'ADN est d'origine enzymatique et a lieu juste après la mort de l'organisme par l'action successive des enzymes endogènes (autolyse) et des enzymes d'origine microbienne (putréfaction).

L'ADN peut également subir plusieurs types de réactions spontanées liées à la chimie des solutions. Ces événements surviennent de façon beaucoup plus lente, et sont intimement liés à des variables environnementales. En effet, dans un contexte environnemental favorable, il est généralement observé une stabilité de la taille des fragments d'ADN ancien sur des périodes de temps allant 4000 à 600 000 ans

### **1 Dégradation enzymatique de l'ADN**

Dans la littérature médico-légale anglo-saxonne, le terme *decay* (décomposition) peut renvoyer à la dégradation aérobie des protéines tissulaires (Lyman, 1994). Plus classiquement, la décomposition *post mortem* des tissus est scindée en deux phénomènes (Alaeddini *et al.*, 2010; Vass, 2001) :

- l'**autolyse** décrit la rupture des cellules et des tissus sous l'action des enzymes intracellulaires de l'organisme (ces enzymes prenaient part aux fonctions métaboliques de la cellule vivante),
- la **putréfaction** désigne la dégradation des protéines tissulaires en anaérobiose par des bactéries d'origine endogène ou exogène.

#### **1.1 Action précoce des nucléases endogènes (autolyse)**

La décomposition d'un individu débute quelques minutes après le décès. En raison de l'arrêt de la perfusion sanguine des tissus, une acidification du milieu est constatée, qui fait suite à l'accumulation de sous-produits acides liée à une production d'ATP en condition anaérobie (ex. dans le muscle, l'acide lactique est produit par la dégradation du glycogène) (Alaeddini *et al.*, 2010; Vass, 2001; Warriss, 2010). La mort cellulaire intervient alors selon

deux modalités différentes : l'apoptose ou la nécrose (Alaeddini *et al.*, 2010; Cau et Seïté, 1999; Proskuryakov *et al.*, 2003).

L'*apoptose* est une mort cellulaire programmée qui peut être déclenchée par des signaux extracellulaires (ex. absence de facteurs de croissance, infections virales) ou intracellulaires (ex. anomalie de l'ADN). Cet évènement se traduit d'abord par la perméabilité des membranes (plasmique, mitochondriale) suite à l'altération des phospholipides et l'activation de protéases (hydrolases) cytosoliques, liées au passage de protéines mitochondriales dans le cytoplasme. Par la suite, le noyau est fragmenté, accompagné par une condensation de la chromatine et par une hydrolyse de l'ADN nucléaire en fragments multiples d'environ 180 bp, dits oligonucléosomiques, consécutive à l'activation d'endonucléases endogènes. Cette activation dépend de protéases spécifiquement activées lors de l'apoptose : les caspases.

Les corps apoptotiques formés par le réarrangement des phospholipides membranaires peuvent par la suite subir une nécrose secondaire accompagnée par la rupture des membranes, s'ils ne sont pas phagocytés du vivant de l'organisme (Proskuryakov *et al.*, 2003). La mort des cellules par apoptose est énergie-dépendante ; elle sera notamment sous la dépendance de la capacité du tissu à maintenir un niveau d'ATP suffisant (ex. muscle).

A l'opposé, la *nécrose* (ou mort cellulaire accidentelle) est un phénomène dégénératif passif résultant d'agressions sévères (ex. anoxie, toxines, radiation, chaleur, trauma) subies par la cellule. La première manifestation de la nécrose est le gonflement de la cellule et des organites avec l'apparition de perforations dans les membranes.

L'absence de régulation du calcium durant les premiers stades joue un rôle important dans la dégradation des constituants cellulaires. En effet, la régulation intracellulaire du calcium permet de maintenir la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  aux alentours de  $10^{-7}$  M tandis que le milieu extracellulaire et certains organites (ex. mitochondries, réticulum endoplasmique) affichent des valeurs de l'ordre de  $10^{-2}$  M. Ceci a pour conséquence l'activation des phospholipases liées aux membranes, ce qui engendre leur dégradation et la libération du contenu des organites.

Une fois achevée, la mort cellulaire conduit à l'activation de différentes classes d'enzymes intracellulaires (lipases, nucléases, protéases), notamment lysosomiques. Les lysosomes sont des vésicules intracellulaires ubiquitaires contenant des enzymes hydrolytiques actives à pH acide, sans l'aide de cations cofacteurs. Les protéases lysosomiques sont capables de dégrader les protéines de la chromatine, dont les histones, ce

qui faciliterait l'accès à l'ADN nucléaire par les endonucléases. La nécrose est à l'origine d'une fragmentation aléatoire de l'ADN.

La dégradation à ce stade de l'ADN mitochondrial (ADNmt), dont la taille initiale ne dépasse pas les 16 kb, est un phénomène mal connu. Les études se contredisent sur la fragmentation (délétions) (Ozawa, 1997) ou l'absence de fragmentation de l'ADN mitochondrial (Murgia *et al.*, 1992) lors de la mort cellulaire. Quoiqu'il en soit, le grand nombre de copies de ce génome par cellule permet, le cas échéant, le séquençage de longs fragments (~350 pb en moyenne), qui appartiennent à l'une ou l'autre des deux régions hypervariables, voire de l'ensemble de la région de contrôle (1,1 kb), à partir de spécimens squelettiques anciens sur une période allant jusqu'à 400 000 ans (Adler *et al.*, 2011; Keyser *et al.*, 2009; Reich *et al.*, 2010).

Dans les premiers stades *post mortem*, l'importance de la dégradation enzymatique de l'ADN dépend de facteurs liés au tissu considéré et de facteurs environnementaux (Vass, 2001) :

- dépendance au tissu, aux types d'enzyme qu'il exprime ainsi qu'à leurs niveaux d'expression : dans les organes tels que le rein ou le foie, les processus autolytiques sont ainsi plus rapides,
- dépendance aux facteurs physico-chimiques d'activation enzymatique spécifiques (présence de cations divalents, pH), et non spécifiques (humidité, température)
- on pourrait déjà mentionner ici l'adsorption de l'ADN à une phase solide comme facteur limitant l'accessibilité des enzymes ayant l'ADN comme substrat. La protection de l'ADN adsorbé vis-à-vis des nucléases a notamment déjà été démontrée pour des molécules d'ADN bactérien adsorbées à une phase minérale (sable, autres minéraux des sols) ou organique (acide humique) (Crecchio et Stotzky, 1998 ; Lorenz et Wackernagel, 1987).

Une corrélation statistique entre la fragmentation de l'ADN et l'intervalle *post mortem* est observée au niveau du muscle durant un intervalle variable situé entre 0 et 56 heures, avec une vitesse maximale durant les premières 24 heures (Alaeddini *et al.*, 2010). La cinétique des processus nucléasiques se ralentit ensuite, de telle façon que la quantité d'ADN de haut poids moléculaire (HPM), pouvant être extraite à partir de tissus mous, décroît de façon exponentielle avec le temps, sur une période d'un mois. Au-delà, seul le tissu cérébral permet le recueil de tels fragments (Bär *et al.*, 1988; Ludes *et al.*, 1993). Ces grands fragments peuvent provenir du clivage de la chromatine au niveau de sites sensibles à l'action des

nucléases. Le Tableau II-2 liste une partie des nucléases impliquées dans la mort cellulaire, la nature des cations impliqués en tant que cofacteur et leur localisation dans les organes investigués.

**Tableau II-2 Activités endonucléasiques impliquées dans la mort cellulaire selon Alaeddini et al., 2010**

Cofacteur cationique	Nom	pH	Tissus	Localisation intracellulaire	Activation	Inhibiteur naturel	Types de fragmentation
Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	DFF40 <sup>a</sup>	neutre	organes	cytoplasme noyau	caspase 3	DFF45	rupture double-brin internucléosomique
Mg <sup>2+</sup>	GAAD <sup>b</sup>	neutre		lymphocyte T	granzyme A	lysosome	coupure simple-brin fragment de HPM
	Endo G <sup>c</sup>	neutre	cerveau	mitochondrie			internucléosomique
	Exo G <sup>c</sup>	pH6		mitochondrie			endo et exonucléase
Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	DNase <sup>d</sup>	neutre /acide	variés	noyau /cytoplasme		Zn <sup>2+</sup>	internucléosomique
	DNases II <sup>e</sup>	acide	variés	lysosome, noyau			aléatoire

<sup>a</sup> Nucléase activée par la caspase 3

<sup>b</sup> DNase activée par le granzyme A

<sup>c</sup> Endonucléase G et exonucléase G

<sup>d</sup> DNase X (muscles squelettiques, myocarde), DNase  $\gamma$  (organes et macrophages), DNAS<sub>1</sub>L<sub>2</sub> (cerveau, poumon)

Peu de données sont en revanche disponibles sur l'état de dégradation de l'ADN pour les tissus squelettiques à ce stade très précoce de la diagenèse, notamment en raison de l'utilisation préférentielle de marqueurs courts de l'ADN inférieurs à 300 pb qui sont amplifiés par PCR.

Néanmoins, l'extraction de fragments d'ADN nucléaire de haut poids moléculaire à partir de spécimens dentaires artificiellement dégradés par traitement thermique est possible avant 32 heures de chauffe. L'amplification de fragments courts (164 et 260 pb) permet d'obtenir de bons résultats sur des durées supérieures, tout en affichant une diminution drastique du signal après les premières heures de traitement (Dobberstein *et al.*, 2008). D'autre part, la pulpe dentaire présente une vitesse de décomposition *post mortem* moindre par rapport aux autres tissus mous. Les raisons invoquées sont la protection vis-à-vis de micro-organismes exogènes, mais aussi la nature particulière des cellules de ce tissu. En effet, des preuves de la viabilité exceptionnelle de la pulpe dentaire ont été apportées (Boy *et al.*, 2003; Higgins et Austin, 2013) : au moins 50% des cellules sont vivantes après un intervalle *post mortem* de 12 heures, elles sont encore détectables après 24 heures (Caviedes-Bucheli *et al.*, 2006; Higgins et Austin, 2013).

Par ailleurs, la stabilité de l'ADN dans l'os compact est supérieure à celle des tissus mous. Des fragments longs d'ADN nucléaire ont été extraits en vue d'une analyse du

polymorphisme de longueur des fragments de restriction sur une période *post mortem* de trois mois, et quatre semaines dans un environnement thermique défavorable (Rankin *et al.*, 1996). A ce stade, la protection particulière de l'ADN au sein des tissus squelettiques peut provenir des caractéristiques métaboliques et histologiques de l'os. En effet, les ostéocytes sont des cellules quiescentes, isolées au sein de lacunes ostéocytaires. Les cellules plus actives de l'os (ostéoblastes et ostéoclastes) et de la dent (odontoblastes) se retrouvent plutôt dans les zones périphériques, ou au sein des canaux anatomiques (Havers et Volkmann pour l'os, compartiment pulpaire pour la dent). L'activité enzymatique dans les cellules des tissus durs est globalement réduite par rapport à celle des organes vitaux.

Considérant une interaction ADN-minéral très précoce lors de la libération des fragments d'ADN après l'autolyse cellulaire, il est donc possible que les fragments adsorbés soient initialement de haut poids moléculaire. Cependant, la taille moyenne des fragments extraits d'un spécimen squelettique se situe entre 30 et 80 pb et excède rarement 1,5 kb (Höss *et al.*, 1996; Paabo, 1989 ; Dabney *et al.*, 2013; García-Garcerà *et al.*, 2011). Cette valeur est relativement stable dans le temps : il a été en effet démontré que la taille des fragments n'est pas corrélée à l'intervalle *post mortem* mais dépend plutôt des conditions de conservation (ex. Dobberstein *et al.*, 2008; Götherström *et al.*, 2002; Höss *et al.*, 1996; Poinar et Stankiewicz, 1999; Tuross, 2002). Cette constatation doit cependant être nuancée à la lumière des travaux d>Allentoft *et al* (2012) que nous évoquerons plus loin, sur la cinétique de dégradation de l'ADN mitochondrial d'ossements de Moa, évaluée sur une période de plus de 7000 ans.

Ainsi, peu de données concrètes ne permettent d'estimer les caractéristiques qualitatives et quantitatives des fragments d'ADN qui viennent interagir avec la surface des cristaux d'apatite. De plus, les processus de diffusion des fragments d'ADN vers la surface des cristallites peuvent varier d'un tissu à l'autre, par exemple si l'on prend en compte la possibilité d'une pénétration de l'ADN pulpaire dans le tissu dentinaire (Higgins et Austin, 2013), ou la différence de rendement de l'extraction d'ADN d'une pièce squelettique à une autre (Mundorff et Davoren, 2014).

## 1.2 Dégradation liée à l'activité de (micro)-organismes (putréfaction)

En ce qui concerne les Vertébrés, des caractéristiques liées au vivant (niveau trophique, type de comportement, habitat) vont influencer sur le contexte du décès de l'organisme et sur l'histoire taphonomique de sa dépouille (Lyman, 1994). Des facteurs culturels ou médico-

légaux (Lyman, 1994; Vass, 2001) seront prépondérants en ce qui concerne l'espèce humaine. Une fois la dépouille déposée dans un milieu donné, de nombreux agents de dégradation affectent sa structure à toutes les échelles.

### 1.2.1 Insectes

Sans entrer dans les détails, il existe trois catégories d'insectes typiquement observables sur les restes de tissus mous, déposés en milieu naturel : les insectes et larves nécrophages, les prédateurs et parasites de ceux-ci et les insectes omnivores (Lyman, 1994). Des recherches sont menées pour établir les taxa d'insectes caractéristiques d'un stade de la décomposition. En médecine légale, ceci aide à la détermination de l'intervalle *post mortem* (Wyss et Cherix, 2006). Certains insectes peuvent consommer les tissus osseux. A l'inverse, le nettoyage des pièces squelettiques par les insectes qui dévorent les parties molles favorise la conservation à long terme des ossements en supprimant la majeure partie du substrat des bactéries.

### 1.2.2 Microorganismes

La dégradation aérobie et anaérobie de la matière organique d'origine microbienne (bactéries, levures, champignons) est sous-tendue par le relargage de fluides riches en nutriments dans les derniers stades de mort cellulaire (Vass, 2001). Les tissus internes se décomposent les premiers, sous l'action essentiellement anaérobie de la flore endogène entérique, voire celle du tractus respiratoire. Par la suite, le développement de microorganismes de l'environnement implique une dégradation supplémentaire des macromolécules, dont l'ADN. En effet, ces micro-organismes environnementaux ont généralement la capacité de sécréter des nucléases (Hofreiter *et al.*, 2001).

Cette étape entraîne également l'accumulation dans les fluides environnants de sous-produits, sous forme liquide ou gazeuse, issus des composants tissulaires (ex. muscle squelettique) : sulfhémoglobine, acides gras volatiles, composés phénoliques et glycérols, et autres composés issus de la dégradation des acides aminés : indole, skatole, putrescine, cadavérine...La présence de ces composés favorise la dégradation des macromolécules d'intérêt au début de la diagénèse (Vass, 2001).

La colonisation bactérienne, ou fongique, des tissus dépend notamment des caractéristiques physico-chimiques du milieu (température pH, concentration ionique, présence de donneurs/accepteurs d'électrons, absence de métaux toxiques...) (Alaeddini *et al.*,

2010). Des conditions humides et des températures modérées sont favorables à la putréfaction. En revanche, un milieu très riche en sels, une dessiccation ou des températures inférieures à 4° C freinent la putréfaction en inhibant la croissance bactérienne (ex. Lindahl, 1993; Paabo, 1989). L'enfouissement du corps fait en général baisser, et stabilise, la température environnante. Ceci est en faveur d'une inhibition du développement de germes saprophytes, dont les champignons qui nécessitent des conditions aérobies (Lyman, 1994).

Ainsi, une persistance à long terme des composés organiques d'intérêt est exceptionnelle car elle nécessite des circonstances favorables qui puissent apporter simultanément une protection vis-à-vis des micro-organismes et des fluides environnants, notamment dans les stades *post mortem* précoces, et un environnement propice d'un point de vue physico-chimique (milieu sec, basses températures...). C'est pourquoi la protection des molécules organiques au sein de la matrice osseuse ou dentinaire est généralement invoquée pour expliquer la préservation à long terme de l'ADN ou du collagène dans les tissus squelettiques (Campos *et al.*, 2012; Geigl, 2002; Götherström *et al.*, 2002; Lindahl, 1993; Salamon *et al.*, 2005; Tuross, 1994).

## **2 Dégradation non-enzymatique de l'ADN**

La dégradation non-enzymatique de l'ADN implique différents agents physiques ou chimiques dans des processus catalytiques plus lents que les mécanismes enzymatiques. La température joue un rôle-clé dans la préservation de l'ADN en ralentissant les cinétiques de réactions impliquées, schématisées sur la Figure II-8.

### **2.1 Hydrolyse de l'ADN**

L'hydrolyse est une réaction catalytique en milieu aqueux. Sur l'ADN, les dommages hydrolytiques se manifestent à différents niveaux.

#### **2.1.1 Hydrolyse de la liaison N-glycosidique**

Un dommage prépondérant de l'ADN est l'hydrolyse de la liaison N-glycosidique entre le sucre et la base azotée provoquant le départ de celle-ci. Les bases puriques sont plus sensibles à ce mécanisme (dépuration) que les bases pyrimidiques (Lindahl et Nyberg,

1972; Lindahl, 1993). L'hydrolyse de la liaison N-glycosidique est rapidement suivie d'une réaction de  $\beta$ -élimination à l'origine d'une rupture du brin (Hofreiter *et al.*, 2001). A partir de données expérimentales, le taux de dépurination d'un ADN double-brin en condition proche de la physiologie (37°C et pH7,4) est estimé  $3.10^{-11} \text{ sec}^{-1}$ , soit une demi-vie de 730 ans par base purique. Ce taux de fragmentation s'accroît en présence d'aldéhydes, de tris, d'ions  $\text{Mg}^{2+}$ , d'amines primaires (glycine, lysine, histidine, arginine) et de protéines basiques. La putrescine à 0,01M augmente le taux de fragmentation au niveau d'un site apurinique d'un facteur 25 (Alaeddini *et al.*, 2010). La dépurination est favorisée en milieu acide (pH<6) et en présence de faibles concentration saline : une augmentation de la force ionique diminue le taux de dépurination d'un facteur 5 à 10 (Lindahl et Nyberg, 1972; Lindahl, 1996). Par ailleurs, Tomas Lindahl (Lindahl, 1993) affirme, d'après des données non publiées, que l'adsorption de l'ADN à l'hydroxyapatite réduirait de moitié le taux de dépurination, ce qui expliquerait la meilleure conservation de l'ADN à partir de spécimens squelettiques anciens.

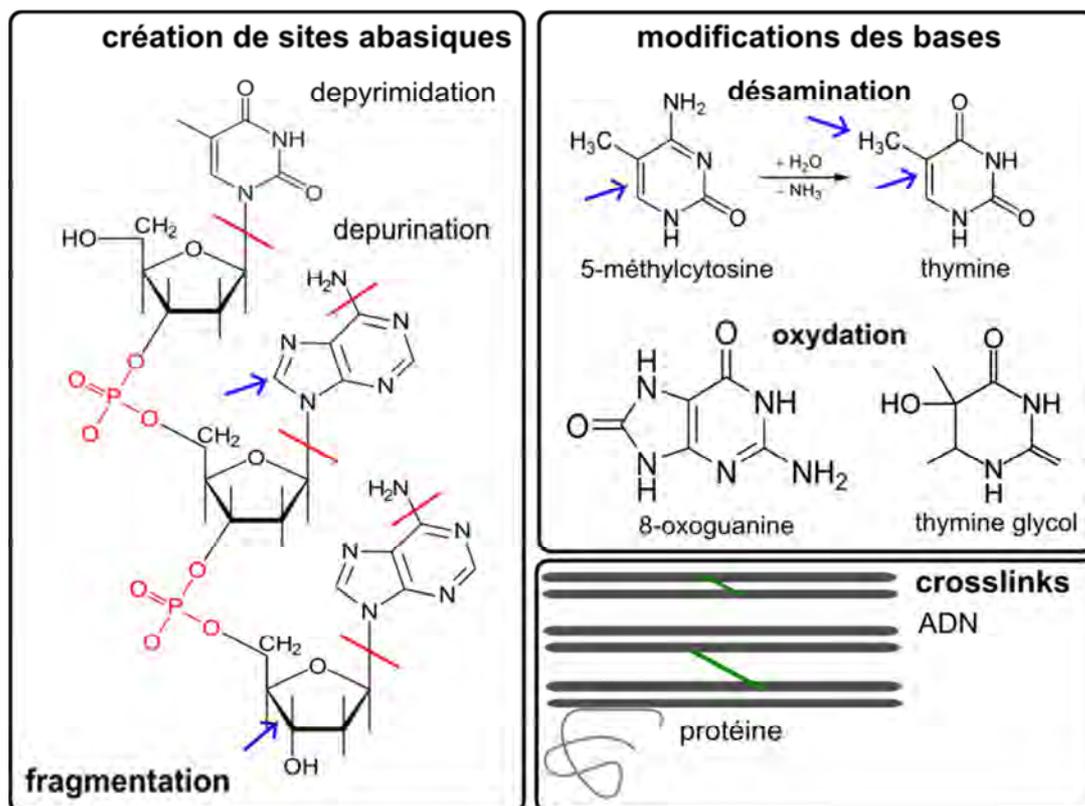


Figure II-8 Types de dommages subis par l'ADN. Sites de dommage hydrolytiques (en rouge) : dépurination par rupture de la liaison  $\beta$ -osidique, fragmentation par clivage de la liaison phosphodiester favorisée au niveau des sites a-puriques. Sites préférentiels d'oxydation indiqués par une flèche bleue. Exemples de modifications chimiques des bases (désamination et oxydation). Crosslinks ADN-ADN ou ADN-protéine

### 2.1.2 Désamination hydrolytique

Les lésions hydrolytiques entraînent aussi la perte des groupements amines des bases azotées. La désamination hydrolytique touche principalement les résidus cytosine et 5-méthylcytosine qui sont convertis en uracile ou thymine (voir Figure II-8) mais également l'adénine et la guanine qui sont converties en hypoxanthine et xanthine (Hofreiter *et al.*, 2001; Lindahl, 1993). Parmi ces bases dérivées, seule la thymine est normalement présente dans l'ADN, néanmoins cette désamination fausse globalement la lecture de la séquence originelle car les bases modifiées n'ont pas les mêmes spécificités d'hybridation que les bases dont elles dérivent. Ces changements ont pour conséquence l'incorporation de bases incorrectes (A/G et C/T) lors de l'amplification par PCR, ce qui peut conduire à des erreurs lors de l'analyse et de l'interprétation des résultats (Eglinton *et al.*, 1991). Cependant, la désamination survient de façon beaucoup plus rare (la demi-vie d'une cytosine à 37°C est estimée à 30 000 ans) (Lindahl, 1993).

Ce type d'erreur explique la nécessité de répéter plusieurs fois les analyses d'un échantillon à partir de plusieurs extraits d'ADN afin de détecter d'éventuelles erreurs survenues durant la PCR. L'importance du nombre de facteurs dont dépendent les mécanismes hydrolytiques (de nature spontanée ou enzymatique) explique la variabilité dans la préservation de l'ADN ancien extrait dans un contexte archéologique ou médico-légal spécifique. La variabilité des susceptibilités intrinsèques des composés chimiques à ce type de réaction pourrait expliquer pourquoi il est si difficile de trouver des corrélations entre la préservation de l'ADN et d'autres indices diagénétiques (cf. chapitre I, section C.4) comme la racémisation des acides aminés, la dégradation du collagène.... Il en est de même pour des facteurs généraux (âge, température...). La définition de l'âge thermique (Smith *et al.*, 2003, 2001) ne permet pas de prendre en compte l'ensemble des acteurs de la diagénèse et une évaluation des vitesses de réaction par site est préconisée (Hansen, 2006).

## 2.2 Oxydation de l'ADN

Les dommages oxydatifs sont causés par l'action des espèces réactives de l'oxygène générés sur l'ADN. Ces radicaux libres sont créés à partir des molécules d'eau, notamment par le métabolisme aérobie (ex. phosphorylation oxydative), liés à l'activité des micro-organismes, ou par l'action d'agents physiques (rayonnements ionisants, ultraviolets) (Rudiuk, 2009;

Thèves, 2006). Pourtant, les dommages oxydatifs seraient moins sensibles à la dessiccation (Paabo, 1989).

Le radical hydroxyle  $\text{OH}\cdot$ , ainsi que le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sont les principales espèces oxydantes responsables (Spotheim-Maurizot *et al.*, 2003). Les conséquences du stress oxydatif sur l'ADN sont l'oxydation des bases modifiées, les coupures simple et double-brin, la formation de sites abasiques et de complexe ADN-protéine (Rudiuk, 2009; Spotheim-Maurizot *et al.*, 2003; Thèves, 2006).

Les bases ainsi modifiées ont des formes très variées (voir Figure II-8). Les principales sont, pour les bases puriques, l'hydroxyguanine (8-OH-Gua), et pour les bases pyrimidiques, les formamidopyrimidines, le thymine-glycol et les hydantoïnes de pyrimidines (les hydantoïnes sont des composés hétérocycliques saturés dérivés de l'imidazole) (Höss *et al.*, 1996).

La 8-hydroxyguanine s'apparie préférentiellement avec une adénine, ce qui provoque des mutations par transversion lors de la réplication (Lindahl, 1993). Néanmoins, ce sont les bases pyrimidiques qui sont le plus dégradées : au moins une base pyrimidique sur 10 serait ainsi oxydée (Paabo, 1989).

Ces phénomènes seront prépondérants dans la mitochondrie, siège du cycle de Krebs impliqué dans la chaîne respiratoire. Le métabolisme de l'oxygène est en effet relégué dans la mitochondrie, notamment pour protéger l'ADN nucléaire des dommages oxydatifs (le noyau cellulaire est un milieu anoxique). Le taux d'oxydation des bases serait 2 à 3 fois supérieur dans l'ADNmt que dans l'ADN nucléaire (Bohr *et al.*, 2002), d'autant plus que cet ADN n'est pas protégé par des histones. Ceci confère à l'ADNmt un taux de mutation et une capacité d'évolution particuliers, notamment à l'origine de la définition d'haplogroupes, par l'analyse concomitante de portions réduites du génome<sup>14</sup>. Cependant, ces modifications de bases (ex. hydantoïnes) ont tendance à empêcher l'élongation du brin par la polymérase et donc rendent impossible l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

### 2.3 Action directe des rayonnements ionisants et non-ionisants

Dans le domaine de l'ultraviolet (UV-C), les bases, dont le maximum d'absorbance se situe autour de 260 nm, peuvent subir des phénomènes de dimérisation par action directe du

---

<sup>14</sup> Si l'on étudie simultanément plusieurs marqueurs uniparentaux de l'ADN, sur l'ADNmt ou sur le chromosome Y (cf. section C4.4), il est possible d'associer à un individu un ensemble de polymorphismes que l'on nomme «haplotype». L'étude de la diversité génétique des individus permet de regrouper les haplotypes voisins en «haplogroupes» afin notamment de préciser les relations entre les différentes populations.

faisceau d'onde. Les dimères de pyrimidine peuvent bloquer l'ADN polymérase, lors de la phase d'élongation, et peuvent ainsi gêner l'amplification de l'ADN ancien. Les radiations de plus haute énergie, dites ionisantes (rayon X, rayon  $\gamma$ ), peuvent également induire des modifications de bases (ex. thymine glycol) (Orlando et Hänni, 2000).

## 2.4 Crosslinks

Les liaisons croisées de l'ADN (Figure II-8) surviennent entre les deux brins de l'ADN ou entre l'ADN et une molécule d'une autre nature (protéines, sucres et produits de Maillard, acides gras) et sont favorisées au niveau des sites abasiques. Les complexes de Maillard se forment entre les fonctions réductrices des sucres et les groupements amines de l'ADN ou des protéines (Amory, 2007). L'alkylation peut également être responsable de ce type de dommage. Ces modifications gênent la réplication en empêchant la séparation des deux brins (Pääbo *et al.*, 2004). L'étude de Hansen *et al.* (Hansen, 2006) tend à montrer que ces lésions sont responsables de la majeure partie des échecs de l'amplification d'ADN ancien en s'accumulant entre 70 et 2500 fois plus rapidement que des fragmentations respectivement simple et double-brin. Toutefois, les résultats obtenus *in vitro* à 4°C estiment une proportion de liaisons croisées six fois inférieure à celle des sites apuriniques (Alaeddini *et al.*, 2010).

## 3 Remarques conclusives

Compte tenu de la susceptibilité de l'ADN vis-à-vis des dégradations enzymatiques et physico-chimiques, la conservation de fragments d'ADN s'expliquerait par l'existence de facteurs de protection. En se basant sur les données expérimentales des cinétiques de dégradation de l'ADN en solution (hydrolyse et oxydation), l'étude de Lindahl (Lindahl 1993) prédit une dégradation spontanée d'un ADN hydraté en fragments courts sur une période de quelques milliers d'années à température modérée. Ses travaux antérieurs permettent de prédire une dégradation totale d'un fragment de 800 bp à 15°C après 5000 – 10 000 ans (Lindahl et Nyberg 1972). Par ailleurs, il est désormais établi que les molécules d'ADN ancien double-brin possèdent des **extrémités non franches** (Briggs *et al.*, 2007; Dabney *et al.*, 2013; Meyer *et al.*, 2012; Orlando *et al.*, 2011).

L'influence de la température est primordiale : les fragments extraits à partir de restes squelettiques vieux de 500 000 ans proviennent de régions froides voire permafrostiques.

Néanmoins, il est possible d'obtenir des séquences très anciennes dans un contexte climatique plus défavorable, comme c'est le cas pour les restes néandertaliens du site de Feldhofer (17 000 ans à 10°C) (Smith *et al.* 2001) et ceux du site de Sima de los Huesos (300 000 ans (!) à 10°C) (Meyer *et al.*, 2013). De plus, l'estimation de Lindahl ne tient pas compte des évènements enzymatiques, pourtant majeurs, et omet certaines réactions spontanées (*crosslinks*, dommages physiques). Par ailleurs, les tissus squelettiques sont des tissus peu cellulaires qui contiennent initialement peu d'ADN. Ces éléments sont en faveur d'une protection particulière de l'ADN au sein de la matrice minérale, que seule la protection vis-à-vis des micro-organismes ne peut expliquer.

La dépendance au facteur temps dans la cinétique de dégradation de l'ADN ne peut généralement pas être étudiée en raison de nombreuses autres variables co-occurentes (physico-chimiques et biologiques). Cependant, l'étude exceptionnelle de Allentoft *et al.* (2012) qui porte sur des fossiles osseux de Moa datés entre 600 et 7840 ans avant le présent a permis de contourner en partie ces difficultés. Ce modèle cinétique, établi à partir de la quantification d'ADNmt de spécimens anciens, prédit la préservation de fragments d'une dizaine de pb après 10 000 ans, à 15°C (pH7,5). La vitesse de dégradation calculée à partir du modèle cinétique d'Allentoft *et al.* est environ cinq fois plus lente que celle estimée *in vitro* par Lindahl et Nyberg, ou deux fois plus lente si l'on prend en compte la réduction d'un facteur 2 de la vitesse de dépurination en cas d'adsorption de l'ADN à l'hydroxyapatite citée dans les travaux de 1972.

## C INTRODUCTION AUX METHODES D'ETUDE DE L'ADN ANCIEN

Les fragments ou pièces squelettiques ayant permis d'extraire de l'ADN proviennent de sites très hétérogènes dans leur répartition spatio-temporelle (zones tempérées ou permafrostiques, sites récents ou vieux de plus de 500 000 ans) et leur contexte de découverte (médico-légal, archéologique ou encore spécimens de musée).

### 1 Prétraitements de l'échantillon

#### 1.1 Recueil des échantillons

Avec le recul, les paléogénéticiens se sont rendu compte du caractère crucial de cette étape dans le succès des études d'ADN ancien. Les recommandations actuelles en matière de recueil sont strictes. Les spécimens anciens susceptibles de contenir des molécules d'ADN sont manipulés par un nombre réduit de personnes porteurs de gants, masques et blouses stériles afin d'éviter la contamination par un ADN moderne. Dans tous les cas, le recueil doit être suivi rapidement d'une congélation à -20°C pour inhiber le développement de germes.

L'étude de Pruvost *et al.* (2007) a démontré un taux de succès bien meilleur pour l'analyse d'ADN ancien de spécimens issus d'un même site venant d'être exhumés que pour ceux qui ont été conservés dans des collections muséales. Il est ainsi préconisé de ne pas traiter l'échantillon (ni lavage, ni brossage, ni traitements physiques ou chimiques) pour préserver les conditions liées à l'environnement sédimentaire (pH, force ionique, température...) qui ont permis la mise en place d'un microenvironnement adapté à la conservation de l'ADN (Bollongino *et al.*, 2008; Pruvost *et al.*, 2007). La notion de « niche de préservation moléculaire » renvoie ici à ce concept de l'importance du milieu environnant dans la préservation *in situ* de l'ADN, par la conjugaison de facteurs biologiques et physico-chimiques favorables (Geigl, 2002). Pour mieux appréhender l'impact des sédiments sur les conditions physico-chimiques de préservation, il serait néanmoins intéressant de comparer le rendement d'extraction d'ADN ancien entre des spécimens congelés, conservés avec ou sans sédiment.

## 1.2 Décontamination des échantillons et réduction en poudre

Les procédures de décontamination dépendent de la nature de l'échantillon et varient d'un laboratoire à l'autre (O'Rourke *et al.*, 1996). En général, pour échantillonner un spécimen osseux, la zone médiane de l'os compact est préférentiellement prélevée à l'aide d'un disque. Cette méthode est destructrice d'un point de vue anatomique, c'est pourquoi la trépanation est parfois indiquée pour minimiser l'impact du prélèvement (Keyser-Tracqui et Ludes, 2005). Quelques exemples de prétraitements avant extraction d'ADN ancien à partir de spécimens osseux sont résumés dans le Tableau II-3.

**Tableau II-3 Exemples d'études de l'ADN ancien employant des méthodes pour décontaminer la surface d'un spécimen osseux avant réduction en poudre (etOH : éthanol)**

Réf.	Traitement mécanique	Traitement chimique	Traitement physique	Réduction en poudre
Mendisco, 2011	Scalpel, abrasion de surface à la Dremel®		UV 250 nm (15 min)	Trépanation chirurgicale
Pruvost <i>et al.</i> , 2007	Abrasion mécanique		UV	Cryobroyage
Salamon <i>et al.</i> , 2005	Dremel®	NaOCl 2,5%		Mortier, tamisage (<500µm)
Keyser-Tracqui et Ludes, 2005	Scalpel, Dremel®			Cryobroyage ou trépanation
Amory <i>et al.</i> , 2012	Dremel®	NaOCl (x2), Eau, etOH 96%	Séchage	Blender
Rohland et Hofreiter, 2007a	Nettoyage manuel, Dremel® (embout à usage unique)	UltraPure Water (eau ultrapure)		
Loreille <i>et al.</i> , 2007	Dremel®	NaOCl, Eau, etOH 100%	Sonication	Cryobroyage Blender
Hofreiter, 2012	Nettoyage avec un tissu	Eau		Aucun
Kolman et Tuross, 2000	Prétraitement de la poudre d'os à l'EDTA 0,5M pendant 2 jours			

La variabilité observée dans les protocoles de décontamination suggère l'absence de consensus pour parvenir à la décontamination de l'échantillon, sans dégrader l'ADN endogène. L'utilisation de NaOCl est notamment controversée pour l'os. Pour la dent, étant données sa structure et la composition particulière de l'émail, son utilisation est plus répandue,

notamment dans les cas où seule la pulpe est récupérée après incision (Grimoud *et al.*, 2004). Que ce soit pour l'hypochlorite de sodium ou pour les prétraitements à l'EDTA, ces protocoles considèrent que l'ADN contaminant est plus accessible, ou moins fortement lié à la matrice minérale, que l'ADN endogène. L'ADN serait ainsi protégé à l'intérieur d'agrégats cristallins, notamment vis-à-vis de l'agression oxydative de l'eau de Javel (Kemp et Smith, 2005; Salamon *et al.*, 2005).

Le cryobroyage est la méthode de réduction en poudre la plus répandue, car elle évite une dégradation de l'ADN liée au dégagement thermique. L'usage d'une instrumentation mécanique (Dremel®, trépan), sans système de refroidissement, pour échantillonner un spécimen peut dramatiquement diminuer le rendement d'extraction d'ADN ancien, à l'exception d'un usage à vitesse réduite (100 rpm) (Adler *et al.*, 2011; Ginolhac *et al.*, 2012).

D'après nos observations, la qualité granulométrique de la fraction obtenue est très variable pour un même temps de broyage et peut dépendre de la quantité de matière organique (protéine voire lipide) ou de la cristallinité de l'échantillon.

## **2 Extraction de l'ADN ancien**

L'extraction de l'ADN ancien est classiquement réalisée à partir du broyat de l'échantillon squelettique. Trois problématiques liées à l'extraction de l'ADN ancien d'origine osseuse ou dentaire attirent notre attention.

En premier lieu, l'extraction d'acides nucléiques à partir de tissus durs représente un défi car les protocoles doivent d'une part, désorganiser suffisamment les composants organiques et minéraux du tissu pour permettre la libération de l'ADN en solution afin qu'il puisse être purifiée ; d'autre part, cette méthode doit prévenir la co-extraction d'impuretés et la dégradation supplémentaire de l'ADN.

En deuxième lieu, l'optimisation des protocoles s'opère dans une dynamique exploratoire, en raison de l'absence de données concrètes sur la (ou les) localisation(s) précise(s) de l'ADN. Les standards des procédures actuelles dérivent des premières extractions à partir de tissus mous (Higuchi *et al.*, 1984; Paabo, 1989) et des techniques de biologie moléculaire destinées aux matériaux récents (O'Rourke *et al.*, 1996).

Enfin, la variabilité des protocoles, suite aux améliorations proposées dans la littérature, n'est pas toujours liée à la variabilité des échantillons, ni d'un point de vue de leurs caractéristiques (micro)structurales diagénétiques, ni d'après leur contexte de découverte

(archéologique, médico-légal). Il s'agit plutôt à l'heure actuelle d'une variabilité inter-laboratoire. Ceci s'explique par le nombre réduit d'échantillons comparables à disposition pour la réalisation d'études plus systématiques sur l'influence des modifications des protocoles dans le rendement d'extraction (Kitayama *et al.*, 2010; Rohland et Hofreiter, 2007b). Une meilleure connaissance des caractéristiques physico-chimiques des échantillons et des relations que l'ADN entretient avec les composants des tissus minéraux a donc deux finalités intéressantes :

- évaluer les chances de succès, d'après l'état de conservation de l'échantillon, avant de procéder à sa destruction, bien que la rareté des spécimens archéologiques motive tout essai d'extraction d'ADN, même si les chances d'en retrouver sont minces,
- adapter les protocoles en fonction de données qualitatives et quantitatives concrètes.

Parmi les différentes méthodes d'extraction possibles, la meilleure méthode pourrait être celle qui s'adapte le mieux à l'échantillon.

## 2.1 Broyage

L'extraction d'ADN est classiquement réalisée sur poudre d'os ou de dents. Selon toute vraisemblance, un broyage grossier aurait tendance à produire des amas dans lesquels des molécules d'ADN restent piégées à défaut de pouvoir être solubilisées dans le tampon d'extraction. En effet, une augmentation de la surface spécifique résultant du broyage permet une meilleure digestion (Barnett et Larson, 2012). Un meilleur rendement est d'ailleurs observé après réduction par cryobroyage que pour une réduction en amas grossiers à l'aide d'un mortier et d'un pilon (Rohland et Hofreiter, 2007b).

Cependant, dans la plupart des protocoles rencontrés, la réduction en poudre fine est rarement réalisée. La différence entre une poudre fine obtenue par cryobroyage et une poudre plus granuleuse après réduction au blender (Waring®) ne permet pas d'évoquer un impact réel de la granulométrie sur le rendement en ADN ancien (Loreille *et al.*, 2007).

Nos observations, suite à la manipulation de spécimens anciens, tendent à considérer l'impact de la diagenèse sur la friabilité du matériau. En effet, la diagenèse osseuse a tendance à rendre le matériau sec et poreux, en favorisant la dessiccation et la dégradation de la matière organique (protéines, lipides), ce qui facilitera sa réduction en poudre. A l'inverse, un os mieux conservé (plus riche en ADN) sera plus difficilement broyé dans les mêmes conditions, avec la collecte d'une poudre assez grossière comportant encore de gros amas.

L'extraction d'ADN peut être pratiquée sur des prélèvements osseux non broyés, pour des raisons de préservation patrimoniale de l'échantillon ou pour limiter les possibilités de contamination (Hofreiter, 2012; Kitayama *et al.*, 2010; Tuross, 1994). Dans le premier cas, une pièce entière (pouvant être décontaminée aux UV ou seulement essuyée avec un tissu humide) est incubée pendant un ou plusieurs jours dans le tampon d'extraction avant purification du bain sur colonne de silice (Hofreiter, 2012). Dans le deuxième, on procède à une décontamination mécanique (abrasion) puis chimique (solutions A et B extraites d'un kit Hitachi Software Engineering, Tokyo, Japon) avant l'étape de décalcification (solution C) et de protéolyse (Kitayama *et al.*, 2010). Ces méthodes semblent donner de bons résultats pour le séquençage de fragments d'ADNmt, et d'ADN nucléaire dans une moindre mesure, sous réserve de non contamination.

## 2.2 Solubilisation (tampon d'extraction)

De façon générale, cette étape doit permettre la solubilisation de l'ADN dans le tampon d'extraction. Pour cela, les méthodes actuelles reposent sur deux processus principaux : la décalcification et la protéolyse. Ces deux processus peuvent être réalisés simultanément ou successivement. D'autres principes adjuvants permettent d'optimiser la libération de l'ADN à partir de complexes de nature protéique ou non.

### 2.2.1 EDTA

A l'exception du recueil direct de la pulpe dentaire après section de la dent (Calvo *et al.*, 2001), la décalcification de l'échantillon est classiquement réalisée de façon partielle ou totale à l'aide d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique). L'EDTA (voir Figure II-9) est un agent chélatant fort qui lie les cations métalliques divalents sous sa forme de base conjuguée.

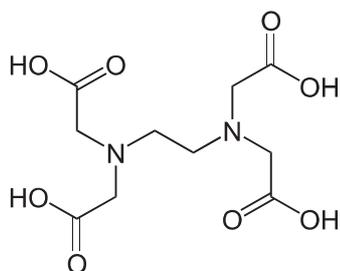


Figure II-9 Formule chimique de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) sous sa forme acide

### ***Tampon sans agent chélatant***

Sur la base d'une interaction possible de l'ADN à l'hydroxyapatite par l'intermédiaire des groupements  $\text{PO}_2^-$  de l'ADN, deux études comparées de l'effet d'un tampon phosphate, par rapport à l'EDTA, ont été réalisées : un tampon composé par 30 mM de phosphate (dans tampon PCR) (Tuross, 1994) ou contenant du phosphate de sodium 0,5M (à pH6,8 à 60°C pendant 24h) (Herrmann et Hummel, 1994). L'utilisation d'un tampon sans agent chélatant se révèle moins efficace dans ces cas.

Dans le chapitre III (section C3.3), nous avons pu mettre en évidence l'effet positif des ions phosphates sur la désorption de l'ADN adsorbée à l'apatite. De la même façon, un tampon phosphate est classiquement utilisé pour éluer l'ADN adsorbée sur une colonne d'hydroxyapatite dans les techniques de purification par chromatographie (Bernardi, 1965; Main *et al.*, 1959; Yu *et al.*, 2008). Cependant, notre substrat minéral présente des caractéristiques plus simples et plus homogènes, qui ne peuvent reproduire à l'identique l'environnement diagénétique de l'ADN dans les substrats squelettiques. Les différences significatives sont notamment :

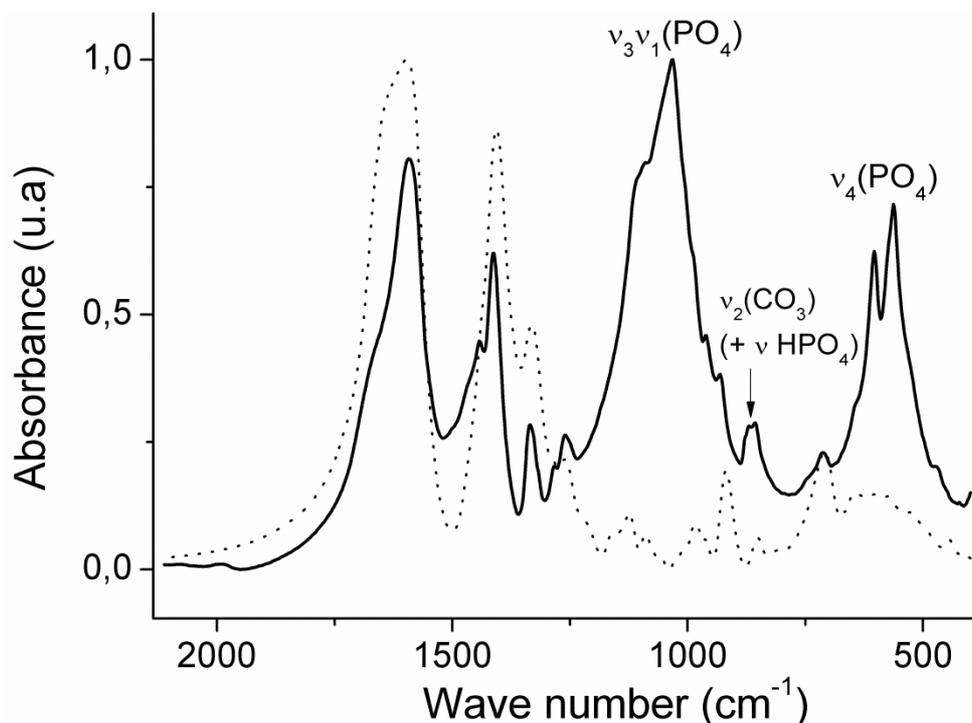
- l'absence de collagène associé à la phase minérale,
- la présentation du minéral apatitique sous forme de poudre fine (granulométrie comprise entre 100 et 200  $\mu\text{m}$ ), ce qui en augmente la surface spécifique,
- une quantité d'ADN adsorbée bien supérieure à la quantité d'ADN ancien,
- une taille de fragment d'ADN moderne bien supérieure, estimée entre 300 et 1000 pb.

### ***Déminéralisation partielle ou totale***

Une déminéralisation totale à l'EDTA (Amory *et al.*, 2012; Loreille *et al.*, 2007) pourrait permettre d'obtenir de meilleurs résultats qu'une déminéralisation partielle, en favorisant la libération d'un plus grand nombre de copies du génome. Cette méthode s'est révélée efficace pour l'obtention d'un profil génétique partiel, alors que la méthode conventionnelle s'avérait pratiquement inefficace. Pour l'ADNmt, le rendement quantitatif serait augmenté par un facteur de 2,5 à 1000. Par conséquent, une moindre quantité d'échantillon pourrait être initialement utilisée.

La déminéralisation partielle est généralement pratiquée. Toutefois, il apparaît clairement qu'elle ne procède pas à la désorganisation cristalline totale, comme l'atteste le spectre infrarouge d'un culot de lysat d'os obtenu après extraction et centrifugation, effectué dans le cadre de ce travail de thèse. Les bandes typiques des phosphates apatitiques ( $\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$ ,

$\nu_4(\text{PO}_4)$ ,  $\nu(\text{HPO}_4)$ ) voire des carbonates ( $\nu_2(\text{CO}_3)$ ) sont clairement identifiable sur la Figure II-10). Des bandes additionnelles dans le domaine d'absorption  $1750\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$  sont attribuables à l'EDTA.



**Figure II-10** Spectre infrarouge ( $2300\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ ) d'un résidu osseux après lyse (tampon d'extraction : EDTA 0,5M, DTT 1M, protéinase K 20 mg/mL) (trait plein), et de l'EDTA utilisé dans ce même protocole (trait pointillé)

De façon plus ancienne, certains auteurs (Geigl 2002) ont avancé l'effet négatif d'une solubilisation de l'ADN par l'EDTA, sur le rendement d'extraction, parfois sur la base de l'interaction potentielle ADN-apatite, qui permettrait la conservation de l'ADN sous une forme « géologique », insoluble, échappant à la chimie des solutions (Geigl, 2002). Cependant, les moindres résultats obtenus en cas de décalcification impliquaient une élimination du surnageant, et donc d'une partie de l'ADN potentiellement associé au minéral, avant de procéder à la digestion protéique. De plus, l'absence de solubilisation préalable au typage de l'ADN ancien impose une limitation méthodologique difficile à contourner

*Remarque* : Effet d'un autre agent chélatant (EGTA)

Une étude récente (Kemp *et al.*, 2014) a montré que l'utilisation de l'EGTA (éthylène glycol de l'acide tétra-acétique) pouvait remplacer l'EDTA, en raison de ses propriétés

chélatantes particulières. Contrairement à l'EDTA, l'EGTA a une affinité plus grande pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  que pour les ions  $\text{Mg}^{2+}$ , ce qui pourrait permettre une meilleure décalcification. Cependant, la digestion à la protéinase K apparaît moins efficace en présence d'EGTA. L'observation des lysats purifiés montre par ailleurs une moindre coloration des extraits, ce qui serait en faveur d'une moindre co-extraction d'inhibiteurs. L'ensemble de ces éléments sont susceptibles d'expliquer les meilleurs résultats d'amplification sur extraits non dilués obtenus après décalcification totale à l'EGTA plutôt qu'à l'EDTA. Cette augmentation de l'efficacité n'est pas observée après dilutions des extraits.

### 2.2.2 Protéolyse

L'action de la protéinase K (endopeptidase) à forte concentration (au moins 20 mg/mL) agit seule sur la dégradation des protéines éventuellement liées à l'ADN (ex. histones) et du collagène. Eventuellement, l'ajout d'un détergent (SDS ou sodium dodecyl sulfate) ou de dithiothreitol (DTT) permet d'optimiser cette étape, notamment pour des échantillons qui contiennent encore une fraction protéique importante. Le DTT est un agent réducteur qui clive les ponts disulfures au niveau des résidus cystéine, et vient potentialiser les effets de la protéinase K (proK) en détruisant la structure tertiaire de certaines protéines (Barnett et Larson, 2012).

Etant donnée la grande variabilité de la concentration de protéinase K (entre 0,25 et 100 mg/mL) parmi les protocoles cités dans le Tableau II-4, il est vraisemblable que ce paramètre ne joue pas un rôle significatif dans les rendements d'extraction.

### 2.2.3 Additifs

Les détergents et autres adjuvants ont un intérêt plus discuté, mais peuvent, selon des cas précis, apporter des améliorations. L'utilisation routinière de détergents qui solubilisent les lipides et dénaturent les protéines (SDS, Triton-X100, lauryl-sarcosinate), initialement retrouvée dans les protocoles pour l'ADN moderne afin de détruire protéines et membranes cellulaires, tend à disparaître pour les échantillons anciens. Ces agents semblent avoir peu d'impact sur la qualité d'extraction d'ADN à partir d'os ou de dents, quelle que soit la nature des échantillons (Rohland et Hofreiter, 2007b). Si la persistance de membrane cellulaire semble peu probable dans un contexte archéologique, l'ajout de détergent peut s'avérer utile en présence de spécimens récents (médico-légaux), ou conservés dans des environnements

très favorables à la conservation, comme le *permafrost*, pour lesquels la matière organique d'origine protéique ou lipidique est encore présente en grande quantité.

**Tableau II-4 Exemples de composition du tampon d'extraction utilisés dans des études de l'ADN ancien à partir d'os ou de dents réduits en poudre**

Réf.	EDTA (M)	DTT (mM)	Détergents SDS, Triton-X	GuSCN (M)	Sodium acétate (M)	PTB (mM)	NaCl (mM)	ProK (mg/mL)
Amory, 2007	0,5		2%		0.3	(1)*		1
Rohland et Hofreiter, 2007a	0,45	(50)*	(1%)*					0,25
Anderung <i>et al.</i> , 2008	0,5		0,5%					100
Lacan, 2011	0,5	1.10 <sup>3</sup>						20
Barnett et Larson, 2012	1	500	10%w/v			2,5		25
Hofreiter, 2012	20.10 <sup>-3</sup>	50	1,3%	5			25	
Kemp et Smith, 2005	0,5 EDTA/EGTA							30

\* amélioration du protocole pour certains types d'échantillons

D'autres additifs peuvent être utilisés, comme l'acétate de sodium qui a un effet stabilisateur sur l'ADN double-brin en agissant en tant que contre-ions (Sambrook et Russell, 2001), et le PTB (*N*-phenacylthiazone bromide) pour aider à la libération des fragments d'ADN piégés au sein de crosslinks ADN-protéine (Amory, 2007; Barnett et Larson, 2012). Les solutions Tris-HCl et Tris base permettent la stabilisation du pH pour augmenter la stabilité de l'ADN, notamment à pH8.

Le protocole qui inclue un sel chaotrope<sup>15</sup>, l'isothiocyanate de guanidinium (GuSCN), est destiné à l'extraction non destructive d'ADN ancien (Hofreiter, 2012). L'incubation dans le tampon d'extraction dure 5-7 jours, en présence d'une concentration faible d'EDTA, afin de ne pas endommager les spécimens. La présence à ce stade de GuSCN permet de procéder à la purification du bain entier sur colonne de silice (le rôle des agents chaotropiques est détaillé dans la section 3.2.3).

<sup>15</sup> Un sel chaotrope est un agent qui, en solution, peut rompre le réseau de liaisons hydrogène entre les molécules d'eau

### 3 Purification

Une fois l'ADN libéré de la matrice osseuse ou dentaire, la purification des acides nucléiques s'effectue selon deux méthodes, à partir du surnageant obtenu après centrifugation du lysat. La méthode conventionnelle utilise l'extraction au phénol-chloroforme, suivie d'une étape de concentration. Actuellement, cette méthode est peu à peu remplacée par la mise en œuvre de colonnes de purification à base de silice (Anderung *et al.*, 2008; Kemp *et al.*, 2014; Kitayama *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010). La première méthode procède à l'élimination des substances indésirables tout en laissant l'ADN en solution, tandis que la deuxième se base sur la fixation de l'ADN sur un support solide, de type silicique, qui ne retient pas les impuretés, ou permet leur relargage spécifique en conditions contrôlées (Gimat *et al.*, 2012).

#### 3.1 Extraction liquide-liquide au phénol-chloroforme

La méthode au phénol-chloroforme se base sur la solubilité différentielle entre les impuretés (protéines, lipides) et l'ADN dans un solvant organique. En premier lieu, le phénol solubilise les débris lipidiques et provoque la précipitation des protéines qui vont se concentrer à l'interphase. Ensuite, le chloroforme permet d'éliminer les traces de phénol qui nuiraient à l'action des enzymes.

En biologie moléculaire, le protocole est généralement suivi par l'ajout d'éthanol en présence de cations monovalents, ce qui induit une précipitation de l'ADN. Cependant, en présence de très petites quantités d'ADN, le risque de perte du précipitât après lavage à l'éthanol rend cette étape impropre à l'extraction d'ADN ancien. L'extraction organique est donc généralement suivie directement par la concentration de l'échantillon sur colonne (Barnett et Larson, 2012) ou par une étape intermédiaire de purification.

Néanmoins, l'optimisation des protocoles tend à la réduction des réactifs et du nombre d'étapes utilisées. Par exemple :

- l'utilisation d'un mélange phénol-chloroforme ou phénol-chloroforme-alcool isoamylique permet d'effectuer l'extraction organique en une seule étape,
- l'étape de concentration sur colonne (ex. Centricon, Amicon) de l'échantillon n'est réalisée que si nécessaire (Liu, 2009).

L'extraction au phénol-chloroforme présente de nombreux inconvénients, dont l'utilisation de solvants toxiques, la difficulté technique de la séparation des phases, une diminution du rendement par la répétition parfois nécessaire des extractions.

### 3.2 Extraction sur support solide

L'extraction en phase solide (ou *Solid Phase Extraction*, SPE) utilise un support qui interagit de façon spécifique avec l'ADN. Les supports à base de silice sont les plus courants, néanmoins d'autres matériaux existent dont la cellulose, les résines anioniques, les particules magnétiques, voire l'hydroxyapatite (chromatographie). La plupart de ces adsorbants utilisent les interactions de nature ionique, hydrophobe ou polaire. Plusieurs facteurs expliquent le succès de la séparation en phase solide (Liu, 2009):

- une meilleure efficacité de la fixation spécifique de l'ADN pour prévenir la co-extraction de substances inhibitrices des réactions enzymatiques ultérieures (sels, acides humiques...) (Höss et Pääbo, 1993),
- une meilleure efficacité en termes de rendement (Davoren *et al.*, 2007),
- la suppression éventuelle de l'étape de concentration (Liu, 2009),
- la bonne compatibilité de cette méthode pour extraire l'ADN à partir de pièces du squelette que l'on souhaite garder intactes (Hofreiter, 2012),
- la multiplication des kits commerciaux reposant sur ce principe,
- une facilité et une rapidité de mise en œuvre (colonnes adaptées à la centrifugeuse, utilisation possible en parallèle) (Liu, 2009).

Les principes de séparation et les applications de trois principes de purification d'acides nucléiques sur support solide sont résumés dans le Tableau II-5. Quelle que soit la nature du support, le principe de séparation s'effectue selon le même procédé, qui comprend trois étapes, éventuellement précédées par le conditionnement ou l'équilibrage de la colonne à l'aide d'un solvant pour mouiller l'adsorbant : (1) la fixation de l'ADN et de quelques impuretés au support (2) le lavage des molécules liées à la matrice pour éliminer les impuretés, et enfin (3) l'élution de l'ADN. De plus, la modulation de l'interaction de l'ADN avec le support entre ces trois phases implique une variation du pH et de la force ionique dans tous les cas.

**Tableau II-5 Caractéristiques de trois technologies de purification des acides nucléiques sur support solide (Résine anionique, membrane de silice et particules magnétiques), modifiées d'après Qiagen® (<http://www.qiagen.com/>)**

	Résine anionique	Membrane de silice (gel, fibres)	Particules magnétiques
<b>Principe de séparation</b>	chromatographie à échange d'ions (ex.DEAE <sup>1</sup> sur support silice, Qiagen®)	Adsorption sélective sur membrane en contrôlant les conditions ioniques	Liaison à des particules de silice magnétiques
<i>Liaison</i>	0,1<[NaCl]<0,6M 6<pH<9	Force ionique élevée (sels chaotropiques)	Force ionique élevée (sels chaotropiques)
<i>Lavage</i>	Force ionique intermédiaire		Force ionique faible
<i>Élution</i>	Force ionique et pH variables	Force ionique faible	Force ionique faible
<b>Concentration</b>	Précipitation à l'éthanol	Éluât prêt à l'emploi	Éluât prêt à l'emploi
<b>Applications</b>	– Purification d'ADN de haut poids moléculaire (50-100 kb) (suivie par une précipitation à l'éthanol) – Séparation ARN/ADN	Purification à partir de différents substrats, dont tissus, gel électrophorèse, milieu de réaction enzymatique	Purification d'ADN à partir de différents substrats biologiques

<sup>1</sup>résine fonctionnalisée avec des groupements diéthylaminoéthyle ionisables (charge positive) en fonction du pH.

L'utilisation de la silice pour la purification des acides nucléiques a été introduite en 1990 (Boom *et al.*, 1990). La formulation de ce matériau varie selon les études: poudre, gel ou fibres, avec ou sans fonctionnalisation de surface. Il en est de même pour le type d'agent chaotrope utilisé lors de l'étape d'accrochage. A l'inverse, les solutions de lavage et d'élution varient relativement peu. Quelques formulations, et compositions des solutions associées, retrouvées dans la littérature sont résumées dans le Tableau II-6.

**Tableau II-6 Etudes mettant en œuvre un protocole de purification d'acides nucléiques à base de silice : formulation, spécificités de l'étude et nature du sel chaotrope employé (Gimat *et al.*, 2012)**

Forme de la silice	Réf.	Binding	Washing <sup>3</sup>	Elution	Spécificités de l'étude
Poudre mise en suspension « Lait de silice »	Zhuo-hua <i>et al.</i> , 2000	NaI saturé	50% éthanol pH7,5 100mM NaCl 1mM EDTA	TE <sup>2</sup>	Extraction de gel d'agarose
Poudre	Rohland et Hofreiter, 2007a	GuSCN pH4	50% éthanol pH8 125mM NaCl 1mM EDTA	TE <sup>2</sup>	Extraction à partir d'os et de dents Étapes similaires aux kits

Fibres de verre silicaté et borosilicaté	Lee <i>et al.</i> , 2010	GuHCl	50% éthanol pH7,5 30mM EDTA	Eau	Purification de plasmides Filtre borosilicaté plus efficace que silicaté
Fibres de verre borosilicaté	Borodina <i>et al.</i> , 2003	GuHCl MES <sup>1</sup> Ethanol EDTA	1) GuSCN 5M, EDTA, pH8 2) 80% éthanol pH 7,5	Tris- HCl pH8,5	Whatman «Glass microfiber binder free Grade GF/F» non greffé
Fibre avec greffage d'amines	Tiainen <i>et al.</i> , 2007				Chromatographie anionique Amines tertiaires meilleures
Gel de silice	Xu <i>et al.</i> , 2011	GuSCN CH <sub>3</sub> COOK pH5	70% éthanol	Eau	Comparaison action du sel de guanidinium sur extraction au phénol et support de silice

<sup>1</sup> Acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique

<sup>2</sup> Tampon TE (Tris-EDTA): Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH8

<sup>3</sup> Les concentrations de Tris/Tris-HCl dans cette solution ne sont pas indiquées ici (seul le pH est indiqué)

### 3.2.1 Formulation de la silice

#### *Poudre en suspension ou « lait de silice » (glass milk)*

Le lait de silice se prépare à partir de la mise en suspension de poudre de dioxyde de silicium (ou terre de diatomée<sup>16</sup>) dans l'eau. Les particules les plus lourdes sont récupérées et traitées par une solution acide. Cette formulation est utilisée dans certains kits commerciaux (ex. *GeneClean® Kit For Ancient DNA*). La colonne peut aussi être préparée manuellement, ce qui présente l'avantage de pouvoir s'adapter à la quantité d'échantillons à purifier (Rohland et Hofreiter, 2007a) et permet une mise en contact direct avec le milieu d'extraction, sous agitation, ce qui pourrait augmenter la quantité d'acides nucléiques retenus. Cependant, la préparation manuelle de la suspension peut s'avérer chronophage et augmente le risque de contamination. De plus, l'utilisation d'une silice en poudre nécessite une nouvelle suspension entre chaque étape. Les kits commerciaux (ex. *Qiagen® Qiamp Blood kit*) semblent présenter une meilleure efficacité (Kaiser *et al.*, 2008; Liu, 2009). Cependant, une préparation hautement optimisée en laboratoire (Rohland et Hofreiter, 2007b) peut s'avérer plus adaptée qu'un kit, surtout lorsqu'il s'agit de traiter des spécimens diagénétiques.

<sup>16</sup> La terre de diatomées ou céliste est une poudre naturelle de particules poreuses de SiO<sub>2</sub>

### ***Gel de silice (silica-gel)***

La préparation à base de poudre présente des analogies avec la formulation gel, évoquée comme substrat solide dans de la plupart des kits Qiagen® à base de silice destinés à la purification des acides nucléiques. L'utilisation de gel de silice est également très répandue en chromatographie. La structure poreuse de ce matériau lui procure une surface spécifique élevée, ce qui est recherché dans ces types d'applications. Dans ce cas, la réactivité intrinsèque de la silice peut dépendre des groupes silanols (Si-OH) exposés en surface, qui ont un caractère polaire. Ils sont donc susceptibles d'interagir avec certains groupements phosphates de l'ADN sous forme acide P(O)OH, dans des conditions de faible force ionique, au moyen de liaisons hydrogène. L'ADN serait retenu dans les pores du matériau, pour un pH ~3,5 (Fujiwara *et al.*, 2005). La présence d'eau pourrait cependant diminuer la polarité de surface de ce matériau en formant une enveloppe d'hydratation par liaisons hydrogène H<sub>2</sub>O-silanols. Cependant, la surface de la silice, tout en étant globalement négative (point de charge nulle à pH3), peut exposer différents types de fonctions silanols,  $\equiv\text{SiOH}$ ,  $\equiv\text{SiOH}_2^+$ ,  $\equiv\text{SiO}^-$ . Ces groupements de surface sont tous susceptibles d'interagir avec un éventail large de macromolécules, principalement par liaisons hydrogène<sup>17</sup> (Zhuravlev, 2000).

Ces groupements peuvent sinon permettre le greffage d'autres fonctions (ex. groupements alkyles pour conférer des propriétés hydrophobes au matériau). Sinon, c'est l'action des sels chaotropiques qui va déterminer les propriétés d'accrochage de la silice, selon des mécanismes que nous tenterons de préciser dans la section suivante.

En comparaison à la poudre, le gel préviendrait le transfert de silice dans le milieu de réaction enzymatique, et par conséquent l'inhibition de la PCR.

### ***Fibres***

Ces fibres peuvent éventuellement présenter des caractéristiques additionnelles, comme la porosité ou le greffage facilité de fonctions pour de meilleures performances. Les microfibres de verre (boro) silicaté utilisées dans les kits commerciaux ont fait l'objet d'un brevet (Il, 1999). Une préparation manuelle de colonnes à partir de filtres en microfibres de verre borosilicaté grade GF/F (Whatman®, England) est également pratiquée (Borodina *et al.*, 2003). En comparaison avec des kits commerciaux utilisant un gel de silice (ex. Qiagen® Qiaprep), ces colonnes « faites maison » avec deux filtres Whatman® permettent l'élution de

---

<sup>17</sup> C'est notamment le cas, à pH6, entre groupements chargés négativement du polyacrylamide (-COO<sup>-</sup>) et la surface de la silice (Wiśniewska, 2012).

l'ADN dans un volume moindre. Une étape de concentration de l'échantillon pourrait ainsi être évitée.

Le greffage de fonctions amine sur des fibres de silice non poreuses présenterait par ailleurs des performances intéressantes en chromatographie anionique pour purifier des plasmides (Tiainen *et al.*, 2007).

### 3.2.2 Agents chaotropiques

Les sels chaotropiques sont utilisés pour potentialiser la rétention de l'ADN sur support solide à base de silice. Ils peuvent théoriquement favoriser trois types d'interaction (Melzak *et al.*, 1996):

- les forces de répulsion électrostatique,
- les liaisons hydrophobes,
- les liaisons hydrogène.

#### *Agent dénaturant*

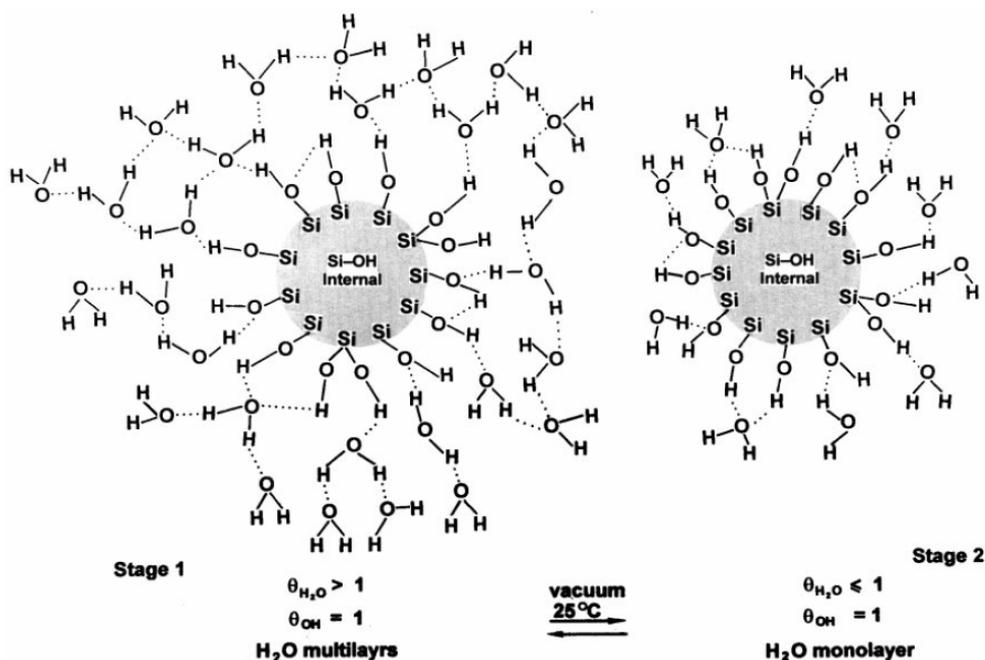
Ils peuvent aussi avoir une action dénaturante (Higgins et Austin, 2013) selon des modalités d'action variables (Kamoun *et al.*, 2003) :

- neutralisation de charges ioniques des protéines nécessaires à leur solubilité,
- action sur les couches d'hydratation des protéines suite aux interactions de l'agent chaotrope avec les molécules d'eau entourant la molécule : l'absence de solvatation de la protéine conduit à sa précipitation,
- dénaturation par rupture des liaisons hydrogènes et agrégation des parties hydrophobes.

Certains agents chaotropiques ont cette action dénaturante (ex. perchlorate de sodium  $\text{NaClO}_4$ , thiocyanate de guanidinium  $\text{GuSCN}$ , iodure de sodium  $\text{NaI}$ , chlorure de lithium  $\text{LiCl}$ ). D'autres agents n'ont pas cette propriété ( $\text{NaCl}$  à forte concentration, sulfate d'ammonium) (Gimat *et al.*, 2012).

#### *Agent déshydratant*

Le degré d'hydratation d'une particule de silice théorique (Zhuravlev, 2000), exhibant une fonction silanol pour chaque atome de silice exposé en surface, est illustré dans la Figure II-11. Cette enveloppe de molécules d'eau fait diminuer la polarité de surface en interagissant avec les fonctions hydroxyles. Une déshydratation de la silice serait donc en faveur d'une plus grande réactivité de cet adsorbant.

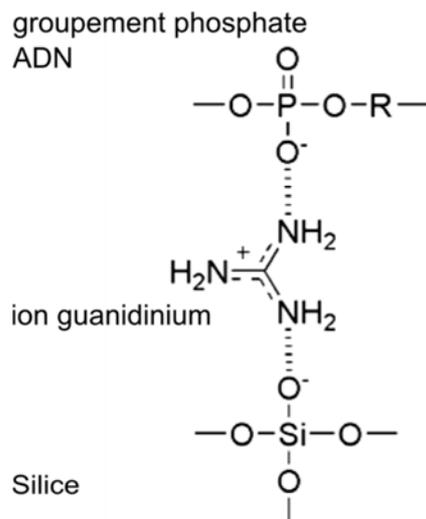


**Figure II-11 Effet d'un traitement physique (vide) sur l'enveloppe d'hydratation d'une particule sphérique de silice. La disparition du caractère multicouche de l'enveloppe est réversible en présence d'eau en excès.**

Dans le cas d'une adsorption d'acides nucléiques sur silice microcristalline, la déshydratation de la silice par interaction du perchlorate de sodium 6M (pH8) avec l'enveloppe d'hydratation serait la force prédominante à l'origine d'un complexe ADN-silice (Melzak *et al.*, 1996). Les interactions entre l'ADN et la silice seraient favorisées par la déshydratation et la haute force ionique induite par la présence des sels chaotropiques.

D'un autre côté, l'augmentation de la quantité d'ADN adsorbée en diminuant le pH de 8 à 5,5 serait une conséquence de la protonation de la silice. Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer cette potentialisation de l'interaction ADN-silice en fonction du pH : la diminution de la charge négative de surface (Vandeventer *et al.*, 2012), liaisons hydrogènes avec les nouveaux groupements hydroxyles en surface, ce qui serait favorisé également par la diminution des hydroxyles libres (diminution de la compétition entre ces groupements et l'ADN) (Melzak *et al.*, 1996).

D'autres auteurs (Davoren *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2011) suggèrent la formation d'un pont cationique (voir Figure II-12) entre la silice et les acides nucléiques chargés négativement à l'aide du guanidinium, suite notamment à l'observation de l'influence de la concentration en guanidinium sur le partage liquide/solide.



**Figure II-12 Modélisation possible de l'interaction du guanidinium formant un pont ionique entre les groupements phosphates négatifs des acides nucléiques et les groupements hydroxyles de la silice (silanol) (Xu *et al.*, 2011)**

Plus spécifiquement, pour l'extraction d'ADN à partir de spécimens anciens, l'utilisation de GuSCN semble prévenir l'adsorption de substances inhibitrices co-extraites. En effet, l'utilisation de sels non chaotropiques (ex. NaCl) permet l'extraction d'une grande, voire plus grande quantité d'ADN, mais également d'une grande quantité d'inhibiteurs de la PCR. En revanche, les autres biomolécules à caractère acide (protéines et acides aminés, lipides, polysaccharides) ne se lient pas à la silice en conditions chaotropiques et peuvent être facilement éliminées lors du lavage (Liu, 2009).

L'intérêt de cette technique associant silice et sels chaotropiques semble aussi résider dans la modulation possible de l'affinité silice-ADN entre la phase d'accrochage et la phase d'élution (Liu, 2009), afin de pouvoir récupérer l'ensemble des fragments d'ADN adsorbés à la matrice.

### **3.3 Identification de la nature et de la fonction d'un kit d'extraction par la caractérisation physico-chimique de ses composants**

En vue d'une application future des résultats de notre investigation des interactions ADN-apatite, la caractérisation physico-chimique d'un kit d'extraction employé au laboratoire d'Anthropologie Moléculaire et d'Imagerie de Synthèse (AMIS, CNRS UMR 5288) a été incorporée en tant que sous-thématique de cette thèse. Les résultats expérimentaux

présentés ci-dessous sont le fruit d'un projet de recherche (projet 3A<sup>18</sup>) que nous avons proposé et encadré en 2011, impliquant trois élèves ingénieurs (Alice Gimat, Cécile Oblette, Claire Perrot).

Selon les indications du fabricant, le kit en question est destiné à la purification des amplicons à partir du milieu de réaction enzymatique ou d'un gel d'électrophorèse. Ce kit cible donc la purification de fragments courts du génome. Il est constitué de colonnes à base de silice, s'adaptant aux microtubes de type Eppendorf® (et aux portoirs de centrifugation correspondants), et de trois solutions: une solution de *binding* (accrochage), une solution de *washing* (lavage), et une solution d'*elution* (élution). Une étape ultérieure de concentration permet l'élimination d'une partie supplémentaire d'inhibiteurs (dont les fragments polynucléotidiques inférieurs à 50 pb).

Les grandes étapes du protocole mené au laboratoire pour des spécimens osseux et dentaires sont résumées dans le Tableau II-7.

**Tableau II-7 Etapes du protocole de préparation (préparation destructrice ou plus conservatrice), d'extraction et de purification d'ADN ancien à partir de spécimens dentaires ou osseux, pratiqué au laboratoire AMIS (CNRS UMR 5288)**

Echantillon	Os	Dent
<b>Décontamination</b>	Abrasion de surface (Dremel®) puis UV	NaOCl 30% Eau ultrapure UV 30 min/côté
<b>Réduction en poudre</b>	Cryobroyage Trépanation	Nettoyage et rinçage Inclusion dans silicone Section corono-radulaire Recueil de la partie interne (pointe diamantée)
<b>Lyse</b>	EDTA 0,5M, DTT, protéinase K 20 mg/mL 50-56°C toute la nuit, centrifugation, récupération du surnageant	
<b>Purification</b>	<b>Accrochage</b>	Ajust de la solution <i>binding</i> , transfert sur colonne, centrifugation
	<b>Lavage</b>	Ajust de la solution <i>washing</i> dans la colonne, centrifugation
	<b>Séchage</b>	Centrifugation
	<b>Elution</b>	Ajust de la solution <i>elution</i> dans la colonne, incubation, centrifugation
<b>Concentration</b>	Colonne Amicon Ultra-0,5 (Millipore®), seuil de coupure 30 kDa	

Les spécifications techniques fournies par le fabricant donnent peu d'indications sur la nature des différents composants du kit, à l'exception des données suivantes : le tampon

<sup>18</sup> Stage de 3ème année de l'INPT-ENSIACET intitulé « Caractérisation d'un kit d'extraction d'ADN ancien ». Ce stage s'est déroulé de novembre 2011 à février 2012.

*binding* contient du thiocyanate de guanidinium, le tampon *washing* doit être dilué à l'éthanol, le tampon *elution* contient 5 mM de Tris/HCl pour un pH8,5.

Une démarche analytique de caractérisation physico-chimique a eu pour but de confirmer (ou infirmer) et de compléter les renseignements fournis par le fabricant, pour une meilleure compréhension des principes d'action mis en œuvre. La purification de l'ADN à partir de substrats anciens doit répondre à un cahier des charges bien spécifique, qui inclut le rendement d'extraction maximum, l'élimination des substances inhibitrices de la PCR, la stérilité de l'ensemble des composants, la réduction des étapes et des réactifs (sources de contamination potentielles), un coût réduit, une rapidité de mise en œuvre. En ce qui concerne l'extraction en phase solide, la possibilité de modulation de la liaison de l'ADN au support, en contrôlant les conditions (sels, pH), doit autoriser successivement la fixation, les lavages successifs pour l'élimination des impuretés, puis l'élution de l'ADN.

### 3.3.1 Observations microscopiques

#### *Filtre*

En microscopie optique, la colonne se présente sous la forme d'un petit cylindre comprenant un joint circulaire, deux filtres reposant sur une membrane plus épaisse. Les filtres ont « *un aspect cotonneux, de surface irrégulière et souple qui se déforme facilement* » (Gimat *et al.*, 2012). Les dimensions du filtre sont d'environ 7 mm de diamètre pour une épaisseur d'environ 0,5 mm. La colonne entière mesure environ 30 mm pour 8,5 mm de diamètre.

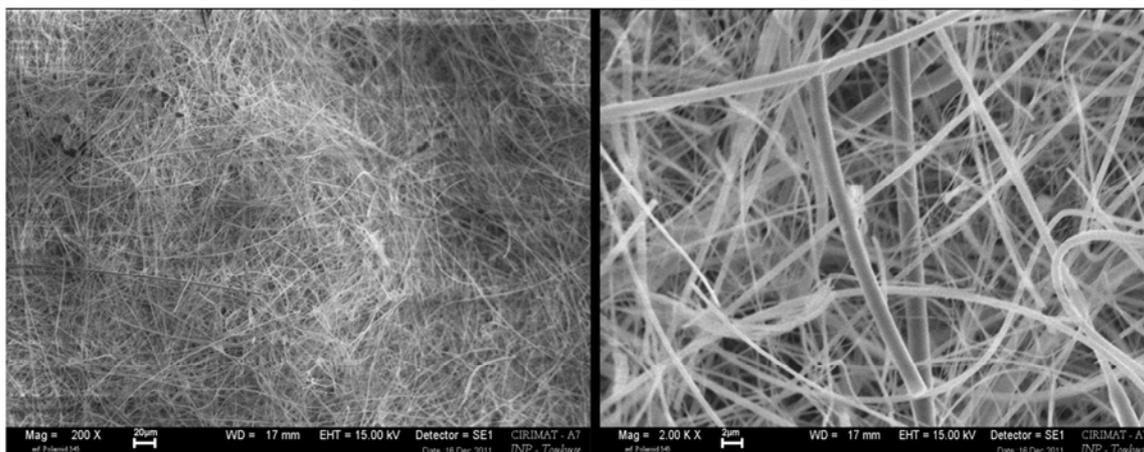


Figure II-13 Cliché MEB, après métallisation, du filtre de la colonne du kit, agrandissement x200 (à gauche) et x2000 (à droite)

En microscopie électronique à balayage (MEB LEO 435VP) en mode électrons secondaires, la structure du filtre nous apparaît sous la forme d'un enchevêtrement de fibres non tissées. Le diamètre des fibres varie entre 1 et 2  $\mu\text{m}$  (Figure II-13). Cette configuration en fibres, de diamètre de l'ordre du  $\mu\text{m}$ , a l'avantage d'augmenter considérablement la surface spécifique par rapport à une configuration en billes.

### **Membrane**

La membrane sur laquelle repose le filtre est légèrement plus épaisse (1,5 mm). Elle est constituée par des grains, lui conférant une macroporosité globale. L'observation en MEB permet de distinguer deux structures différentes : une partie « *granulaire* » et une partie « *fondue* » sous-jacente (voir Figure II-14). Les analyses chimiques présentées ci-après vont permettre de préciser le rôle de cette membrane dans la purification de l'ADN.

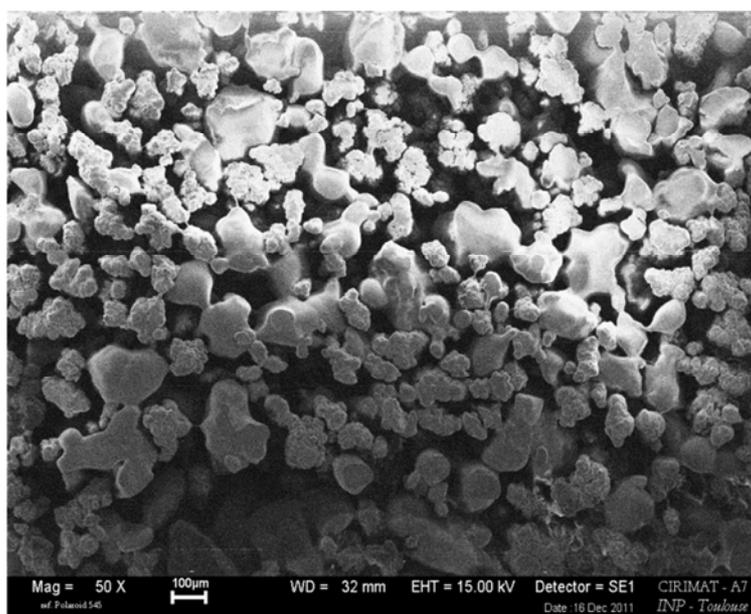


Figure II-14 Cliché MEB (LEO 435VP) de la membrane située sous le filtre de la colonne du kit commercial de purification de l'ADN

### **Solutions tampons**

Les solutions lyophilisées ont également été analysées au MEB (Figure II-15). Pour la solution d'accrochage (*binding*), de gros cristaux sont observables. A l'inverse, la solution de lavage comporte des particules beaucoup plus fines.

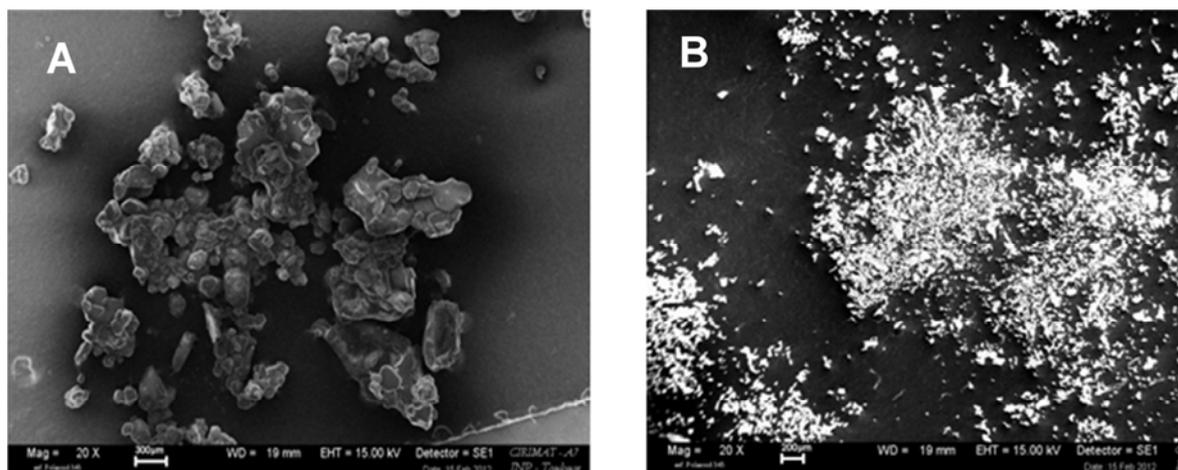


Figure II-15 Cliché MEB (LEO 435VP) des solutions d'accrochage lyophilisées (A) et de lavage (B) en agrandissement x20, issues du kit de purification de l'ADN

### 3.3.2 Analyses chimiques

#### *Filtre*

#### Analyse EDS (ou EDX) (Energy Dispersive X-ray Spectrometry)

L'analyse EDS du filtre (Figure II-16) confirme la présence majoritaire des éléments silicium et oxygène composant la silice, aux côtés d'éléments plus minoritaires (l'argent étant uniquement issu du prétraitement de métallisation).

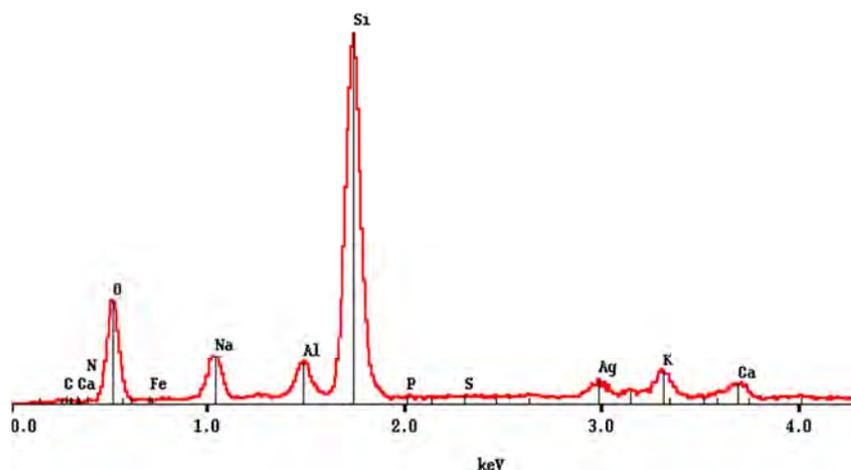


Figure II-16 Spectre EDS du filtre d'une colonne neuve du kit commercial de purification de l'ADN

#### Spectroscopies vibrationnelles

La spectroscopie infrarouge, en mode réflexion totale atténuée (IR-ATR), permet d'identifier certains environnements chimiques des éléments identifiés par la nature des

liaisons (vibrateurs) qu'ils forment. A l'exception du CO<sub>2</sub> gazeux artefactuel, deux bandes attribuables à la liaison Si-O sont détectables sur ce spectre (voir Annexe B1):

- bande à ~1080 cm<sup>-1</sup> assignée aux vibrations d'élongation (νSi-O),
- bande à ~800 cm<sup>-1</sup> assignée aux vibrations de déformation (δSi-O) (Smith, 1960).

La bande moins intense vers 1400 cm<sup>-1</sup> n'a pas pu être attribuée à une fonction amine, parfois observée en tant que greffage, sous différentes formes, sur la silice (Aureau *et al.*, 2010; Silván *et al.*, 2006).

Par ailleurs, on constate l'absence de vibrations liées aux groupements silanols Si-OH, vers 960 et 850 cm<sup>-1</sup> (Smith, 1960), qui seraient notamment observables sous la forme d'un épaulement sur la ν(Si-O). Plus généralement, l'absence de groupements OH (à 1625 cm<sup>-1</sup> et dans le domaine 3700-3000 cm<sup>-1</sup>) suggère l'absence de ce type de fonction sur le filtre. Cependant, il est possible qu'en présence d'eau, certaines fonctions siloxane se protonent, ce qui permettrait la formation de liaisons hydrogène entre ADN et silice (Gimat *et al.*, 2012).

L'analyse en spectroscopie Raman (Annexe B2) pourrait permettre de mettre en évidence un tel greffage, notamment s'il ne représente qu'un faible pourcentage du filtre (5-10%). Pourtant, aucune bande distincte de celles habituellement retrouvées pour la silice ne nous a permis de supposer l'existence d'un greffage, que ce soit sur un filtre neuf, ou filtre ayant servi à la purification d'une solution d'extraction (voir spectres en annexe). Dans le dernier cas d'un filtre usagé, des bandes supplémentaires (vers 1100 et 2400 cm<sup>-1</sup>) sont certainement liées aux impuretés d'origine organique que le filtre a retenues. Par ailleurs, les bandes caractéristiques de la silice (aux alentours de 500, 800, 1000 et 1600 cm<sup>-1</sup>) sont plus larges que la silice cristallisée, ce qui est évocateur d'une silice vitreuse.

Etant donnée l'absence de fonctionnalisation détectable, la liaison sélective de l'ADN au filtre de la colonne dépend vraisemblablement de l'importance de la surface spécifique des fibres de silice, mais surtout de la solution d'accrochage contenant du GuSCN.

### ***Membrane***

L'analyse EDS de la membrane ne permet pas d'établir de différence significative entre la partie granulaire et la partie fondue (Annexes 3A et B). Le seul élément commun détecté est le carbone. L'oxygène et le fer signalés sur le spectre de la partie fondue semblent être un artefact, consécutivement à la découpe au scalpel du filtre.

Les spectroscopies vibrationnelles permettent de préciser efficacement la composition de cette membrane en dévoilant la nature des liaisons impliquant le carbone. Les bandes obtenues en IR-ATR et en Raman (Annexe 4 et 5), résumées dans le Tableau II-8, sont toutes attribuées aux liaisons CH ou CH<sub>2</sub>, caractéristiques du polyéthylène (PE) (voir formule, Figure II-17).

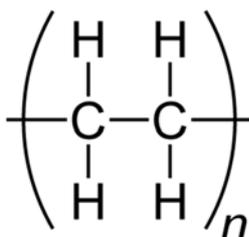


Figure II-17 Formule développée du polyéthylène

Tableau II-8 Attributions des bandes après analyse de la membrane en spectroscopies vibrationnelles. Les différentes liaisons impliquant le carbone sont caractéristiques du polyéthylène

Bandes	Dénomination	Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )	
		IR-ATR	Raman
δ(CH)	cisaillement C-H	1470	1416, 1441, 1467
γ(CH)	balancement de la chaîne polymère	730	
v <sub>as</sub> (CH <sub>2</sub> )	élongation asymétrique -CH <sub>2</sub> -	2912	
v <sub>s</sub> (CH <sub>2</sub> )	élongation symétrique -CH <sub>2</sub> -	2845	2850
δ <sub>as</sub> (CH <sub>3</sub> )	déformation asymétrique -CH <sub>3</sub>	1460 ?	
δ <sub>s</sub> (CH <sub>3</sub> )			1300
v <sub>s</sub> (CH <sub>3</sub> )			2885
vCC	élongation de la liaison C-C		1063, 1129, 1173

De par sa localisation, sa morphologie et sa fonction, la membrane semble jouer un rôle de support du filtre, dont la souplesse a été décrite précédemment. L'utilisation de ce type de matériau pour une telle application est courante. Sans cela, le filtre risquerait de se déformer, voire de rompre, sous l'effet des forces gravitationnelles indiquées dans ce protocole (jusqu'à 11 000g). Par ailleurs, le PE a été préalablement utilisé pour la rétention de protéines (Bohrer *et al.*, 2001), afin de, par exemple, purifier un échantillon de son contenu protéique avant HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*). La membrane pourrait donc avoir une double fonction de support et de purification.

### Solutions

Les résultats de l'étude des solutions par différentes techniques sont résumés dans le Tableau II-9. Les spectres IR-ATR sont visibles en la section B des Annexes, annexes 6, 7 et 8.

**Tableau II-9 Caractéristiques physico-chimiques des trois tampons du kit commercial de purification de l'ADN, en fonction des moyens techniques mis en œuvre**

Type d'analyse	Tampon <i>binding</i> Accrochage	Tampon <i>washing</i> Lavage	Tampon <i>elution</i> Elution
pH	4,8	(éthanol)	7,7
EDS	C, N, O, Na, S, Cl	C, N, O (signal faible), Na, Cl	volume insuffisant pour lyophilisation
IR-ATR	$\nu\text{NH}_2$ , $\nu\text{C}\equiv\text{N}$ , $\nu\text{C}=\text{N}$ , $\delta\text{NH}$ , $\gamma\text{NH}$	$\nu\text{OH}$ , $\nu\text{CH}$ , $\delta\text{CH}$ , $\nu\text{CO}$	$\nu\text{OH}$
RMN $^1\text{H}$		Non concluant	

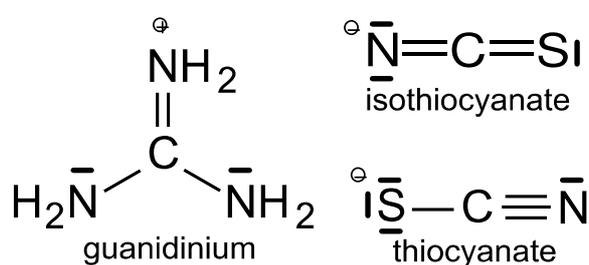
$^1$ Résonance magnétique nucléaire

Peu de données ont été recueillies pour la solution d'éluion. En absence de pics intenses ou clairement identifiables en IR-ATR, les résultats indiquent que cette solution est surtout composée d'eau. En pratique, l'éluion a déjà été pratiquée efficacement, à partir de colonnes de billes de résine, en ajoutant de l'eau chaude (75°C). Dans cette étape, il s'agirait surtout d'éliminer les sels (chaotropiques) qui faciliteraient la liaison de l'ADN à la silice.

La solution de lavage est une solution hydroalcoolique (80% v/v d'après les indications du fabricant). La présence de NaCl a été mise en évidence par l'analyse EDS, ce qui serait en faveur d'un effet de la force ionique sur la potentialisation de la liaison ADN-silice à ce stade. Les cations monovalents en solution, en présence d'ADN, jouent un rôle stabilisateur important en diminuant les phénomènes de répulsion entre deux brins d'ADN adjacents, ce qui, on l'a vu, a des conséquences sur la conformation, et donc potentiellement sur l'adsorption de l'ADN vis-à-vis d'un substrat solide. En revanche, l'éthanol garantirait un lavage efficace des impuretés, sans éluer les sels chaotropiques. Des traces d'éléments organiques sont également détectées par EDS. Les éléments C, N et O pourraient être présents sous la forme de Tris ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ). L'ensemble de ces données concorde avec celles de la littérature sur la composition de la solution de lavage.

L'analyse EDS de la solution d'accrochage met en évidence des éléments chimiques qui sont cohérents avec le thiocyanate de guanidinium (voir Figure II-19). Ces résultats sont confirmés par les types d'environnements mis en évidence sur le spectre IR-ATR (groupes NH<sub>2</sub>, C≡N, C=N, N-H):

- les fonctions amine (νNH<sub>2</sub> à 3352 et 3183 cm<sup>-1</sup>) peuvent être assignées au guanidinium,
- les liaisons C≡N (2054 cm<sup>-1</sup>) et C=N (1653 cm<sup>-1</sup>) correspondent aux vibrations respectives de l'ion thiocyanate et isothiocyanate<sup>19</sup> (voir formule Figure II-18).



**Figure II-18** Formule développée du thiocyanate de guanidinium. L'ion thiocyanate existe sous forme de deux isomères

La présence d'éléments organiques (C, N, O) pourrait être reliée au guanidinium, comme au Tris. Toutefois, le soufre, mis en évidence par une forte réponse EDS, est caractéristique de l'ion thiocyanate. La présence additionnelle des éléments Na et Cl pourrait, là encore, jouer le rôle de contre ions pour les autres espèces chargées en présence (dont l'ADN).

L'absence d'éléments interprétables qui pourraient être attribués à ces éléments en RMN du proton est en faveur d'une concentration modérée du GuSCN en solution. Ce constat tend à exclure l'hypothèse d'un pont ionique (Xu *et al.*, 2011) : une interaction efficace entre les phosphates de l'ADN et les fonctions silanols du filtre nécessiterait une quantité importante de cations. Etant donnée l'absence de mise en évidence d'un greffage, la déshydratation induite par le GuSCN est le mécanisme le plus plausible.

<sup>19</sup> La vibration à 1653 cm<sup>-1</sup> pourrait également être attribuée à une vibration de déformation de la liaison N-H, voire à la combinaison des deux vibrations mentionnées (épaulement visible).

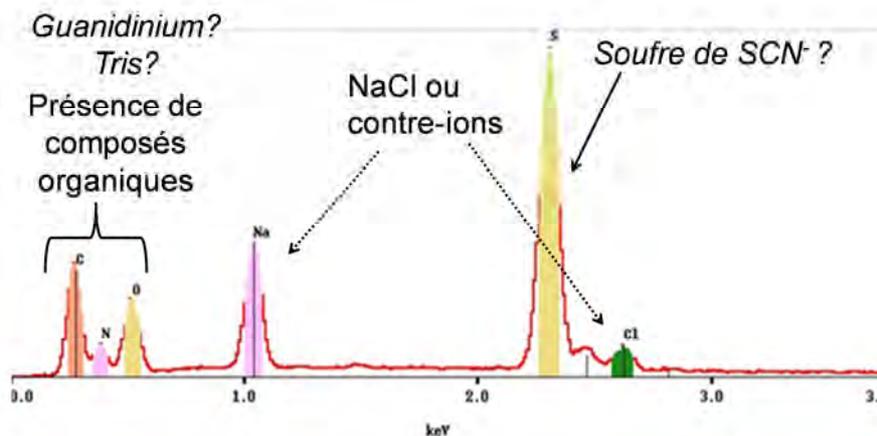


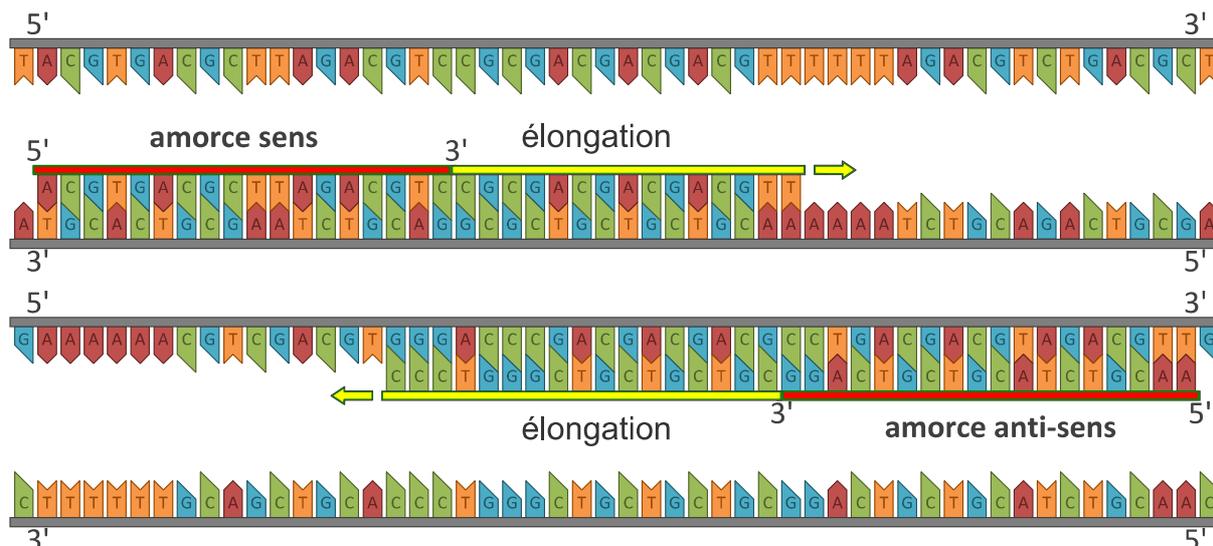
Figure II-19 Spectre EDS de la solution d'accrochage (*binding*)

#### 4 Amplification et typage

##### 4.1 Principes de l'amplification par PCR

L'invention de la technique de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en 1985 (Saiki *et al.*, 1985), suivie de l'isolation de l'ADN polymérase thermorésistante *Taq polymerase* à partir de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* a offert une alternative de choix au clonage bactérien en vigueur depuis le milieu des années 1970. Alors que la PCR se base sur l'activité d'une seule enzyme, le clonage bactérien utilise l'ensemble de la machinerie répliquative de bactéries transformées après insertion du fragment d'intérêt. Son application en ADN ancien s'est heurtée aux limites imposées par le faible nombre de molécules d'ADN présentes et par les modifications *post mortem* altérant l'ADN.

Dans l'idéal, la PCR permet, en quelques heures, d'amplifier en plusieurs millions de copies une séquence d'ADN d'intérêt, à partir d'un faible nombre, voire d'une seule copie d'ADN de façon fidèle et reproductible. Le fragment cible est localisé grâce à l'hybridation spécifique d'amorces complémentaires de part et d'autre de la séquence. La PCR n'est donc pas une technique analytique, ce n'est qu'une étape permettant de disposer d'une quantité suffisante d'ADN en vue de son séquençage.



**Figure II-20** Représentation schématique des deux types d'élongation, sens et anti-sens, sur deux molécules d'ADN double-brin. La synthèse du brin complémentaire à l'un et l'autre brin d'un fragment d'ADN bicaténaire permet une amplification théorique d'une séquence de  $2^n$  ( $n$ , nombre de cycles), modifiée d'après Richard Wheeler (<http://www.calculatedimages.blogspot.fr/>)

La PCR est constituée par la répétition 30 à 35 fois d'un cycle de réactions successives, qui sont fonction de la température. Chaque cycle comprend (1) une étape de dénaturation (90-95°C) de l'ADN double-brin en ADN simple-brin, (2) une étape d'hybridation (50-60°C) des deux amorces à l'ADN cible et (3) une étape d'élongation (72°C) des oligonucléotides par ajout de nucléotides complémentaires par l'ADN polymérase dans le sens 5'P-3'OH (voir Figure II-20). Le milieu réactionnel doit donc contenir :

- le fragment d'ADN à amplifier ou ADN cible,
- les deux amorces oligonucléotidiques monocaténares,
- des désoxyribonucléosides triphosphates libres dATP, dCTP, dGTP, dTTP (monomères nécessaires à la formation du brin d'ADN néosynthétisé),
- la *Taq* polymérase,
- un milieu tamponné contenant notamment du  $Mg^{2+}$  sous forme de  $MgCl_2$ . L'ion  $Mg^{2+}$  est un cofacteur indispensable à l'ADN polymérase.

En principe, l'amplification par PCR conduit à la synthèse de  $2^n$  molécules,  $n$  étant le nombre de cycles. Cependant, différents facteurs viennent limiter ce rendement.

## 4.2 Limites de la PCR

### 4.2.1 Contamination

Un problème majeur de l'analyse de l'ADN ancien réside dans les contaminations possibles des échantillons par l'ADN moderne, exogène. En effet, les molécules d'ADN moderne seront préférentiellement amplifiées en raison du très petit nombre de copies et de l'état de dégradation des molécules d'ADN ancien. Le protocole d'extraction d'ADN à partir de substrats anciens doit donc remplir un cahier des charges très strict afin de pouvoir répondre aux critères d'authentification des résultats (Cooper et Poinar, 2000). Les principales règles de travail sont listées dans le Tableau II-10.

**Tableau II-10 Précautions liées à la sélection, la manipulation et l'authentification de séquences d'ADN ancien, modifié d'après Orlando et Hänni (2000)**

#### Sélection des échantillons

Précautions lors du recueil du spécimen pour minimiser toute contamination moderne des échantillons (gants, masque), limitation de nombre de manipulateurs  
Conditions favorables à la préservation (milieu froid, pauvre en oxygène et riche en sels)  
Diagnostic de conservation de l'ADN à l'aide d'indice diagénétiques (cf. Chapitre I, section C)

#### Manipulation des échantillons fossiles

Abrasion de la surface externe de l'échantillon, décontamination chimique (NaOCl, EDTA) ou physique (UV)  
Locaux dédiés (pré-PCR), traitée à l'eau de Javel, irradiée sous UV, en surpression (limitation des apports exogènes), à accès restreint  
Stérilisation des tampons par autoclavage et filtration  
Témoins négatifs d'extraction et d'amplification, interdiction des témoins positifs d'amplification  
Alternance d'échantillons d'espèces différentes pour détecter toute contamination croisée  
Optimisation de la PCR : amplification de marqueurs courts du génome, PCR en émulsion

#### Authentification des résultats

Reproductibilité du résultat  
Si possible, réplication des analyses dans un laboratoire indépendant  
Position phylogénétique (détection des contaminants interspécifiques)  
Distribution des erreurs d'élongation de la *Taq* polymérase évaluées par clonage

Alors que l'ADN issu de bactéries ou de micro-organismes environnants contribue majoritairement à la contamination d'un échantillon en termes de quantité, les contaminations les plus problématiques, en anthropologie ou en médecine légale, sont d'origine humaine (manipulateurs, réactifs). Ce phénomène est d'autant plus limitant pour des échantillons très

anciens, provenant de spécimens d'Hominidés contenant peu de molécules endogènes, pour lesquels le nombre de cycle de PCR doit être augmenté.

#### 4.2.2 Inhibiteurs

L'autre souci majeur dans l'analyse de l'ADN ancien est la présence d'inhibiteurs de la PCR. Ces substances sont co-purifiées avec l'ADN lors de l'extraction et exercent une action néfaste sur l'efficacité de l'ADN polymérase. Pour ces échantillons, l'échec de l'amplification ne résulte donc pas de l'absence d'ADN, mais de l'inhibition de la PCR.

Les inhibiteurs les plus fréquemment rencontrés sont des substances contenues dans le sol comme les acides humiques et fulviques, les tannins, les ions métalliques. Ces agents ont une action inhibitrice directe sur la réaction de PCR. Les acides humiques et fulviques ont des propriétés chélatrices des ions  $Mg^{2+}$ , cofacteur indispensable de la *Taq* polymérase. Une affinité expérimentale de l'acide humique pour l'ADN a d'ailleurs été reportée (Crecchio et Stotzky, 1998). Les composés présents dans les fluides corporels tels que l'urée et l'héparine peuvent aussi être responsables d'une inhibition pour des échantillons de nature médico-légale.

D'autres substances inhibitrices indirectes sont représentées par des substances qui viennent diminuer le rendement de la PCR, notamment en empêchant la lecture de la séquence cible adéquate, ex. ADN endogène fortement fragmenté (moins de 50 pb), ADN bactérien, altérations de la séquence (agents alkylants, complexes de Maillard) (Amory, 2007).

### 4.3 Séquençage

La méthode de séquençage mise en point par Frederick Sanger en 1977 est une méthode enzymatique. Au lieu d'une élongation du brin dans le sens  $5' \rightarrow 3'$  classique, l'ADN polymérase incorpore également des didésoxynucléotides marqués (ddNTP), ce qui provoque l'arrêt de la synthèse. En effet, la perte du groupement hydroxyle en  $3'$  sur le ddNTP empêche l'ajout d'un nucléotide supplémentaire. Une électrophorèse capillaire ultrasélective permet de trier les fragments qui diffèrent d'une seule paire de base, tandis qu'un système de détection automatique permet la lecture de la séquence en fonction de la fluorescence détectée (les 4 ddNTP sont couplés à des fluorochromes émettant à des longueurs d'onde différentes).

Les progrès importants réalisés dans le domaine de la génomique permettent l'application de séquenceurs de « nouvelle génération » (ex. Roche 454 GS-FLX, Illumina,

Helicos, Applied Biosystem SOLiD) au typage de l'ADN ancien. Ces approches reposent simultanément sur de nouvelles méthodes de PCR et de séquençage. Les nouvelles méthodes de PCR reposent sur le principe d'un greffage des amorces sur une surface solide, ce qui a le double avantage de pouvoir amplifier l'ensemble des molécules-cibles en présence et ainsi diminuer l'impact d'une contamination par un ADN moderne. Dans la PCR à émulsion, les amorces sont greffées sur des billes magnétiques (chaque bille se comporte comme un microréacteur pour l'amplification d'une seule séquence-cible). Dans la PCR en pont, la séquence cible peut s'hybrider à une ou deux amorces complémentaires ancrées au support.

Par la suite, le séquençage utilise une approche enzymatique (ADN polymérase) massivement parallèle par la lecture de nombreux amplicons ainsi ancrés sur support. Les techniques de détection varient d'un système à l'autre (Feuillie, 2012):

- 454-FLX, Roche : détection de l'émission de photons lors de l'incorporation des nucléotides (pyroséquençage)
- Illumina/Solexa : lecture de la fluorescence au fur et à mesure de l'incorporation de nucléotide marqué par un fluorophore différent
- Applied Biosystems SOLiD : lecture de la fluorescence après hybridation et liaison au niveau de l'amorce (ADN ligase) de courtes séquences marquées en fonction de la nature des deux premières bases. Suite au clivage du fluorochrome, une deuxième séquence s'hybride sur le même principe. Le même processus est reproduit sur le brin antiparallèle avec un décalage d'une base pour permettre la lecture de la totalité de la séquence.

Dans le séquençage de troisième génération, une lecture directe des brins d'ADN dénaturé, sans amplification préalable (*tSMS* pour *True Single Molecule Sequencing*), est possible par la détection en temps réel du nucléotide incorporé par leur émission fluorescente. La séquence cible est immobilisée, après ajout d'une extrémité 3'OH polyA, sur un support revêtu d'un oligonucléotide complémentaire (oligo-dT50) (Orlando *et al.*, 2011).

#### 4.4 Analyse des marqueurs moléculaires

Une séquence d'ADN peut être différente d'un individu à l'autre, comme sa fréquence peut l'être d'une population à l'autre. L'étude de ces différences génétiques, transmises héréditairement et connues sous le nom de « polymorphismes », peut apporter des informations importantes sur les relations de parenté entre individus et sur l'histoire des

différentes populations. Parmi ces marqueurs polymorphes, on peut citer les polymorphismes ponctuels et les polymorphismes de longueur.

### ***Polymorphismes ponctuels***

Les polymorphismes ponctuels ou SNP (« *Single Nucleotide Polymorphism* ») correspondent à des variations portant sur un seul nucléotide avec des fréquences supérieures à 1% dans les chromosomes d'une population.

### ***Polymorphismes de longueur des séquences***

Les polymorphismes de longueur des séquences correspondent à une variabilité dans le nombre de répétition d'un motif de base dans une région non codante de l'ADN. Cette variabilité est induite le plus souvent par un mécanisme de recombinaison inégale. Le nombre de répétitions varie d'une personne à l'autre. Il peut correspondre soit à la répétition de quelques paires de bases seulement (2 à 6 pb), ce que l'on appelle les microsatellites ou STR (« *Short Tandem Repeats* »), soit à des répétitions d'un nombre plus important de bases (10 à quelques centaines), ce que l'on appelle les minisatellites ou VNTR (« *Variable Number of Tandem Repeats* »). Quand ces marqueurs sont situés sur les autosomes, ils servent à établir des empreintes ou profils génétiques qui permettent de déterminer la spécificité génétique d'un sujet, mais aussi ses liens de proches parentés par comparaison avec d'autres sujets (ascendants ou descendants).

Parmi les marqueurs génétiques utilisés figurent les marqueurs uniparentaux situés sur l'ADN mitochondrial (ADNmt), hérité de la mère, et sur le chromosome Y, hérité du père. Ces marqueurs échappent tous deux à la recombinaison méiotique. Ils sont donc transmis sans modification d'une génération à la suivante. Les seules modifications qui apparaissent proviennent de mutations. Ainsi, tous les ADN mitochondriaux présents dans les populations humaines peuvent provenir d'un ancêtre maternel commun et les chromosomes Y, d'un ancêtre paternel commun. Par ailleurs, l'ADNmt et le chromosome Y sont peu sujets à la sélection naturelle. Ils sont par conséquent particulièrement bien adaptés pour suivre l'évolution des populations.

En raison de son abondance, l'ADNmt est un matériel de choix pour les études portant sur des échantillons anciens, dans lesquels l'ADN est fortement dégradé (Orlando et Hänni, 2000). En effet, les mitochondries sont présentes en nombre variable dans le cytoplasme des cellules (de 75 dans la queue du spermatozoïde à 100 000 dans l'ovocyte) et possèdent

plusieurs copies d'ADNmt dont la séquence est connue depuis 1981 (Anderson *et al.*, 1981). Il a également été rapporté que la membrane des mitochondries, qui persistent plus longtemps que la membrane nucléaire après la mort cellulaire, pourrait représenter une barrière vis-à-vis des agents participant à la dégradation des acides nucléiques et offrir une protection dont l'ADN nucléaire ne bénéficie pas (Gilbert *et al.*, 2006). Le génome mitochondrial est principalement composé de régions codantes, à l'exception d'un fragment d'environ 1100 pb qui est impliqué dans les fonctions de régulation : il s'agit de la région contrôle ou D-loop, qui comprend trois régions hypervariables (HV1, HV2 et HV3). Des mutations ponctuelles sont présentes à des positions connues à l'intérieur de ces régions hypervariables HV1 et HV2. L'ADNmt mute environ 10 fois plus que les gènes nucléaires ce qui permet d'observer un nombre élevé de polymorphismes. L'analyse conjointe de plusieurs mutations permet de définir des haplotypes identiques entre individus de même lignée maternelle.

Néanmoins, en raison de ces mêmes caractéristiques (taux de mutation élevé, lignage exclusivement maternel), l'ADNmt ne permet pas de témoigner de l'ensemble du patrimoine génétique d'un individu ou d'une espèce éteinte. En ce sens, si l'étude exclusive du génome néandertalien mitochondrial semblait exclure la possibilité d'une contribution de cette espèce au génome de l'homme moderne, le typage plus récent de séquences d'ADN nucléaire pourrait, selon les interprétations, infirmer cette hypothèse (Kring's *et al.*, 1997; Orlando *et al.*, 2006; Serre *et al.*, 2004) vs. (Green *et al.*, 2010, 2006; Sankararaman *et al.*, 2012). Ces études de l'ADN nucléaire ont été possibles grâce aux développements des outils biotechnologiques, qui permettent notamment l'exploitation de fragments plus courts du génome (<100pb) (Meyer *et al.*, 2013; Orlando *et al.*, 2011) et, par conséquent, l'extension de l'étude des génomes anciens vers le Pleistocène moyen (de 125 à 780 000 ans avant le présent).

## **Chapitre III. Etude expérimentale de l'interaction entre ADN et apatites biomimétiques**

---

### **A Données générales et bibliographiques sur l'adsorption et la désorption**

- 1 Généralités
- 2 Adsorption et désorption impliquant des matériaux apatitiques

### **B ADN modèle utilisé pour l'adsorption**

- 1 Comportement de l'ADN lors de l'adsorption
- 2 Caractérisation et quantification de l'ADN
- 3 Protocoles de dégradation de l'ADN

### **C Protocoles d'adsorption entre ADN et apatite biomimétique**

- 1 Historique du protocole
- 2 Etude expérimentale de l'adsorption d'ADN de thymus de veau partiellement fragmenté sur des nanocristaux d'apatite nanocristalline, utilisée comme modèle du minéral osseux et dentinaire
- 3 Expériences additionnelles

### **D Discussion**

## Préambule

A l'heure actuelle, le rôle protecteur du minéral et de certaines conditions environnementales favorables est établi, dans le contexte de l'ADN ancien d'origine squelettique, sur la base de constatations relativement empiriques. Certains résultats expérimentaux *in vitro* apportent toutefois des éléments concrets qui corroborent cette hypothèse. Ainsi, l'adsorption de molécules sur une surface minérale présente potentiellement un rôle protecteur vis-à-vis:

- des réactions hydrolytiques (Brundin *et al.*, 2013), par la réduction de la teneur en eau d'un tel système (Moreno *et al.*, 1984),
- des bactéries et de leurs enzymes : la moindre susceptibilité de l'ADN adsorbé à une phase minérale, apatitique ou autre, à la dégradation enzymatique (DNase), a été démontrée à plusieurs reprises (Brundin *et al.*, 2013; Crecchio et Stotzky, 1998; Lorenz et Wackernagel, 1987; Romanowski *et al.*, 1991). Il serait la conséquence d'une réduction des mouvements moléculaires et/ou à des changements conformationnels du substrat enzymatique (ADN) ainsi adsorbé.

Cependant, *la nature physico-chimique des interactions* entre les macromolécules d'ADN et les apatites nanocristallines – dont on a vu qu'elles possédaient des propriétés significativement distinctes de l'hydroxyapatite stœchiométrique – n'a jamais été explorée directement à notre connaissance.

Ce chapitre décrit l'élaboration d'un modèle biomimétique expérimental *in vitro* qui vise à étudier l'affinité de l'ADN pour une apatite nanocristalline analogue au minéral osseux voire dentaire. Cette étude a pour objectif d'apporter des éléments qualitatifs et quantitatifs pouvant valider ou invalider l'hypothèse d'une adsorption des molécules ou fragments d'ADN, issus de la dégradation cellulaire, sur des cristaux d'apatites osseux ou dentaires.

Les aspects expérimentaux de ce travail ont été explorés à travers plusieurs étapes:

- synthèse et caractérisation d'une apatite nanocristalline carbonatée biomimétique (décrite dans le chapitre I, section B)
- étude qualitative et quantitative (cinétiques et isothermes) de l'adsorption d'ADN sur ce composé apatitique biomimétique
- détermination de la nature de l'interaction entre les molécules d'ADN et la surface des cristaux d'apatites : adsorption «simple» ou échange ionique de surface, notamment

par le dosage des espèces ioniques libérées lors de l'adsorption, ou encore l'investigation de la désorption de l'ADN

- étude des effets sur l'adsorption de plusieurs paramètres tels que le pH, la température, la force ionique, qui influent sur la diagenèse des tissus minéraux et sur la dégradation de l'ADN.

Le choix d'une analyse *in vitro* est dicté par les nombreuses limitations d'une analyse directe des environnements chimiques de l'ADN dans les tissus minéralisés. Ces limitations proviennent notamment de la densité minérale, de la quantité infime de molécules d'ADN au sein de l'échantillon et des modifications chimiques qu'elles subissent. En outre, la plupart des méthodes d'analyse de l'ADN, même les plus sensibles (ex. AFM, spectroscopie Raman exaltée ou SERRS, *True single-molecule DNA sequencing*) nécessitent au préalable une solubilisation et une purification de l'ADN (Feuillie, 2012; Orlando *et al.*, 2011; Wiggins *et al.*, 2006).

Néanmoins l'étude de Reiche *et al.* (2012), qui a ciblé l'interface organo-minérale de spécimens squelettiques anciens par la combinaison de plusieurs techniques de caractérisation physico-chimique avancées, offre des pistes d'investigation vers une plus ample connaissance de la localisation de molécules organiques dans l'os.

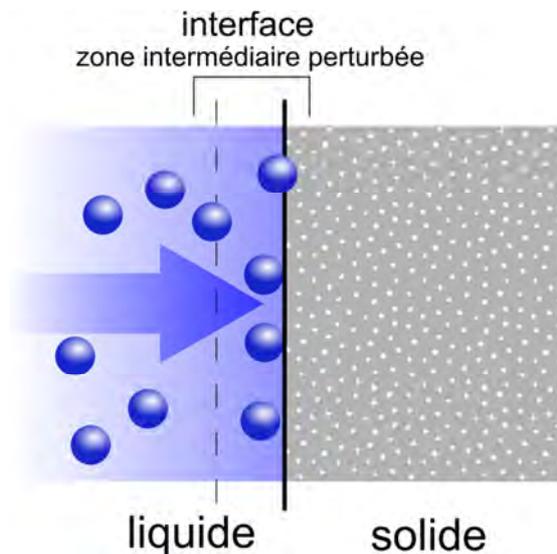
Dans notre cas, compte tenu de l'absence d'antériorité de cette étude, le choix d'un modèle simplifié a été réalisé en première intention. Les chapitres précédents ont eu pour but de démontrer une réalité plus complexe, avec la conjoignance potentielle d'autres acteurs à l'interface ADN – apatite :

- le collagène et autres protéines non collagéniques ayant une affinité pour le minéral osseux,
- les ions citrate, voire d'autres molécules préadsorbées qui pourraient agir comme agent de liaison ou comme compétiteur,
- les histones, qui se lient à l'ADN nucléaire à l'intérieur des nucléosomes.

## A DONNEES GENERALES ET BIBLIOGRAPHIQUES SUR L'ADSORPTION ET LA DESORPTION

### 1 Généralités

Tout matériau, liquide ou solide, est en contact avec le milieu extérieur par un ensemble de points séparateurs qui correspondent à une « surface ». D'un point de vue physico-chimique, une surface constitue toujours un système particulièrement difficile à appréhender d'autant plus qu'elle va interagir avec un milieu environnant hétérogène. L'interface entre un solide et un liquide peut être définie comme la zone intermédiaire entre les phases solide et liquide non perturbées, comme illustré sur la Figure III-1. En effet, les phases en contact ne sont pas absolument homogènes jusqu'à l'interface: elles sont séparées par une couche interfaciale qui peut présenter une composition différente des phases elles-mêmes (Ruysen et Molle, 1965).



**Figure III-1 Représentation schématique du processus de sorption<sup>1</sup> (adsorption « simple » ou échange ionique) à l'interface solide-liquide**

Classiquement, la concentration dans la couche interfaciale s'exprime en masse ou en moles par unité de surface : on admet ainsi arbitrairement que la couche interfaciale est une surface géométrique (et non pas un volume) qui sépare les deux phases. On dit qu'une substance est adsorbée à l'interface lorsque sa concentration dans la couche interfaciale est plus élevée qu'à l'intérieur des phases limitrophes ; l'adsorption est donc déterminée par une

différence de concentration, quelle que soit la manière dont cette dernière se produit (Ruyssen et Molle, 1965). Sous le nom d'adsorbant, on désigne la phase à la surface de laquelle l'adsorption se produit, tandis que le terme adsorbat désigne uniquement le corps adsorbé.

Des forces se manifestent à la zone de séparation de deux phases. La nature de ces forces est variée (attractions de nature physique, interactions électrostatiques, liaisons chimiques...) néanmoins on peut distinguer deux types de mécanismes impliqués dans l'adsorption:

- la *physisorption* est due à des interactions qui génèrent une chaleur de réaction faible (quelques kilocalories) par des liaisons faibles de type liaison hydrogène, van der Waals ou bien électrostatiques ; ces interactions sont rapides, le plus souvent réversibles et d'une intensité modérée ; elles n'engendrent aucune modification de la structure des molécules physisorbées,
- la *chimisorption* implique, quant à elle, la formation de liaisons chimiques (avec déplacement d'électrons entre deux atomes), ce qui met en jeu une importante enthalpie, de l'ordre d'une centaine de kilocalories. Ces liaisons se font au niveau de sites d'adsorption préférentiels, et peuvent être irréversibles.

Un troisième mécanisme<sup>20</sup> fait intervenir des phénomènes de surface plus complexes qui impliquent un échange d'ion entre l'adsorbant et l'adsorbat. Certains substrats, que l'on peut trouver naturellement dans les sédiments, ont cette propriété : ils peuvent être d'origine minérale (montmorillonite, argile) ou organique (humus, acide humique) (Cai *et al.*, 2008, 2006; Crecchio et Stotzky, 1998; Saeki *et al.*, 2011; Sciascia *et al.*, 2011). Dans ces cas, une espèce ionique appartenant à l'adsorbant sera déplacée et pourra être dosée en solution. L'ADN peut s'adsorber *in vitro* à l'ensemble de ces substrats (montmorillonite, argile, acide humique) (Beall *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2006; Saeki *et al.*, 2011)

Par ailleurs, on considère en général que, pour les solutions diluées (où la quantité de solide est faible par rapport au volume de liquide), l'effet de l'adsorption du *solvant* est négligeable (Ruyssen et Molle, 1965). Le pouvoir adsorbant sera donc évalué par la différence de concentration, à l'équilibre, de l'adsorbat, avant et après son incorporation.

Les paramètres quantitatifs et qualitatifs, qui permettent d'évaluer le pouvoir adsorbant d'un solide pour une substance en solution, sont déterminés d'après le suivi expérimental de la cinétique d'adsorption et la construction d'isothermes d'adsorption.

---

<sup>20</sup> Le terme « sorption » permet d'envisager simultanément les processus d'adsorption qui n'impliquent que des phénomènes à l'interface, et les mécanismes d'échange ionique entre groupements ioniques appartenant à la molécule adsorbée ou à la surface de l'adsorbant.

## 1.1 Généralités sur les cinétiques de l'adsorption

L'étude cinétique sert à décrire la vitesse d'adsorption, qui contrôle à son tour le temps de séjour de l'adsorbat à l'interface solide-solution (Ho et McKay, 1999). La cinétique d'adsorption peut varier considérablement d'un type d'interface à une autre. Dans le cas d'une chimisorption « classique » (par greffage moléculaire, mais sans libération ionique simultanée), l'équilibre d'adsorption correspond en effet à un état dynamique où le nombre de molécules qui se désorbent est équivalent au nombre de molécules qui s'adsorbent. Comme cela est le cas pour certains systèmes adsorbant-apatite tels que bisphosphonates/apatite (Errassifi *et al.*, 2010; Pascaud *et al.*, 2013), on assiste à une libération en solution d'ions appartenant au solide. Dans ces cas plus complexes, l'adsorption moléculaire se réalise par l'accroche de la molécule en lieu et place d'ions qui constituent initialement la surface de l'adsorbant. La cinétique d'adsorption servira alors simplement à quantifier la vitesse globale de ces phénomènes.

De façon pratique, l'étude cinétique, pour un système adsorbant/adsorbat et des conditions expérimentales données (température, force ionique...), permet de déterminer le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre d'adsorption (atteinte du nombre maximum de molécules adsorbées par unité de masse ou de surface du solide). Il sera en effet nécessaire de connaître ce temps pour la détermination expérimentale d'isothermes d'adsorption, pour lesquels chaque point aura été obtenu après un temps supérieur ou égal au temps nécessaire pour atteindre l'équilibre.

Il peut en outre s'avérer informatif de modéliser mathématiquement les données cinétiques de quantités adsorbées en fonction du temps,  $N_{ads}(t)$ , et de comparer le type d'équation trouvé avec d'autres systèmes adsorbant/adsorbat, pour identifier des similitudes ou des différences. Cependant, cette tâche de modélisation (qui peut par exemple permettre de déterminer l'ordre de réaction ou *rate law*) est l'une des principales difficultés de l'étude cinétique.

Les paragraphes suivants décrivent certaines de ces équations élaborées à partir de données expérimentales et/ou théoriques et qui ont servi à décrire des phénomènes d'adsorption à différentes interfaces.

Considérant une réaction réversible d'adsorption (Équation III-1) d'un élément  $E$  sur la surface  $S$ ,



avec :

$S$ , nombre de site d'adsorption libre à la surface du solide

$E$ , concentration en élément  $E$

$k_a$  constante de vitesse d'adsorption, et  $k_d$  constante de vitesse de désorption

la vitesse de la réaction d'adsorption  $r_a$  dépend notamment de la concentration en élément  $E$  et de la surface disponible, selon un ordre défini par la somme des éventuels exposants. En réalité, dans le cas de réaction d'adsorption, les paramètres de concentration et de surface disponible sont exprimés par la capacité d'adsorption, c'est-à-dire, dans notre cas, la quantité d'ADN adsorbé  $N_{ads}$ . Cette variable est exprimée en masse (voire en mole) par unité de surface, ou par unité de masse de l'apatite, soit dans notre cas en mg/g (ou mg/m<sup>2</sup>, μmol/g ou μmol/m<sup>2</sup>).

A l'instant  $t$ , la quantité d'ADN adsorbé par unité de surface sera notée  $N_t$  (ou  $N_{ads}(t)$ ), et à l'équilibre  $N_e$ . Les constantes (constante de vitesse, ordre de la réaction) sont déterminées expérimentalement à l'aide d'un ajustement de courbes théoriques (issues de modèles mathématiques) aux données expérimentales, à l'équilibre d'adsorption. Les modélisations les plus couramment proposées pour l'adsorption d'espèces ioniques ou moléculaires sur un solide sont décrites ci-dessous.

### 1.1.1 Equations simples

Une réaction est dite de premier ordre (Équation III-2) quand elle dépend d'un seul réactif, sans exposant, telle que :

$$r_a = \frac{dN_t}{dt} = k_a \cdot N_t \quad \text{Équation III-2}$$

Généralement, le processus d'adsorption peut s'exprimer sous la forme d'une équation dite de pseudo-premier ordre, définie par la relation (Équation III-3):

$$\frac{dN_t}{dt} = k_a(N_e - N_t) \quad \text{Équation III-3}$$

Ce modèle, proposé en premier lieu par Lagergren (1898), a été initialement utilisé pour décrire l'adsorption à l'interface liquide-solide de molécules organiques ou d'ions métalliques

sur du charbon ou autres types d'adsorbants (fibres végétales, kaolinite...). Il est classiquement utilisé dans l'adsorption d'impuretés à partir d'eaux polluées par différents substrats (Yuh-Shan, 2004).

L'équation de pseudo-second ordre est une alternative de ce modèle, qui décrit mieux les cinétiques d'adsorption d'ions métalliques sur substrats minéraux (ex. silicate de calcium) ou organique (ex. tourbe), mais aussi d'ions phosphate sur charbon activé d'origine naturelle (écorce de tamarin) (Ho et McKay, 1999). Ce modèle est formulé par l'Équation III-4:

$$\frac{dN_t}{dt} = k_a(N_e - N_t)^2 \quad \text{Équation III-4}$$

### 1.1.2 Equations complexes

L'application d'équations complexes pour décrire la cinétique d'adsorption est la manifestation de la variabilité des propriétés des systèmes étudiés (nature de l'adsorbant, irréversibilité de l'adsorption, variation des types d'interactions impliquées, nature plus ou moins complexe du soluté...). D'autres modèles ont donc été élaborés de façon empirique pour mieux correspondre les phénomènes observés, et permettre de quantifier et de comparer ces comportements.

#### *Modèle de Ritchie*

L'équation de Ritchie (Ritchie, 1997) permet de déduire les constantes d'un modèle de pseudo-premier et pseudo-second ordre, par la formule générale suivante (Équation III-5) :

$$\frac{d\theta}{dt} = k_n(N_e - N_t)^n \quad \text{Équation III-5}$$

avec :

$\theta$  représente le taux de recouvrement au temps  $t$  (c'est-à-dire  $N_t/N_e$ )

$n$  représente l'ordre de la réaction

#### *Modèle d'Elovich*

L'équation d'Elovich, formulée en 1939, s'applique dans des cas d'adsorption chimique et convient particulièrement aux systèmes qui incluent des surfaces adsorbantes hétérogènes (Wu *et al.*, 2009). Cette équation a notamment été utilisée pour décrire la cinétique d'adsorption de molécules gazeuses (ex. hydrogène) sur des solides de type oxyde (Aharoni et Tompkins, 1970; Thomas et Thomas, 1996), adsorption caractérisée par une stabilisation lente du processus, non suivie par la désorption des produits. L'équation d'Elovich (Équation

III-11) permet de rendre compte de la diminution de la vitesse d'adsorption en fonction du temps, en raison de l'augmentation du recouvrement de la surface.

$$\frac{dN_t}{dt} = a \cdot \exp(-b \cdot N_t) \quad \text{Équation III-6}$$

avec :

$a$ , constante de vitesse initiale, en mg/(g.min) car  $dN_t/dt$  tend vers  $a$ , quand

$N_t$  tend vers 0

$b$ , constante d'Elovich, en g/mg

Cette équation a été appliquée par la suite avec succès dans des systèmes solide-liquide, pour décrire l'adsorption d'ions métalliques sur différents substrats organiques (lignite, algue de thé) ou minéraux (charbon d'os, argiles) (Cheung *et al.*, 2001; Gupta et Bhattacharyya, 2006; Razmovski et Šćiban, 2008; Wu *et al.*, 2009; R. Zhang *et al.*, 2010). Elle a également été utilisée pour décrire l'adsorption d'ions phosphate sur des sédiments et minéraux du sol (Chien et Clayton, 1980; House *et al.*, 1995; Torrent, 1987), ou encore de colorants sur chitosan (Wu *et al.*, 2009).

Des phénomènes d'adsorption de molécules organiques plus complexes s'appuient également sur l'équation d'Elovich. Cette dernière permet notamment de décrire la cinétique d'adsorption de l'atrazine (pesticide organique de formule  $C_8H_{14}ClN_5$ ) (Inoue *et al.*, 2004; Kovaïos *et al.*, 2011) et de la porphyrine (M. Zhang *et al.*, 2010) sur des échantillons de sols, sur l'acide humique ou sur la silice. Dans le domaine de l'adsorption de polyélectrolytes sur un substrat solide, le modèle d'Elovich est relativement peu utilisé, bien qu'il pourrait rendre compte d'une certaine réalité expérimentale (Reihs *et al.*, 2004). Il a néanmoins été appliqué avec succès pour modéliser l'adsorption de l'acide humique – acide organique complexe qui peut être considéré comme un polyélectrolyte anionique en raison de sa richesse en groupements  $-COO^-$  – sur hématite (oxyde de fer), en présence d'ions phosphate (Qin *et al.*, 2012). Dans ce dernier cas, une compétition au niveau des sites d'adsorption de l'hématite entre les ions phosphate du tampon utilisé et l'acide humique est à l'origine d'une diminution de la vitesse d'adsorption (par rapport à la cinétique en absence d'ions phosphate).

L'emploi du modèle d'Elovich se justifie en présence de systèmes qui incluent d'éventuelles interactions entre les molécules d'adsorbats, sous la dépendance du taux de recouvrement de la surface, et en présence d'adsorbats et de surfaces chargées (effet du potentiel de surface sur l'adsorption) (M. Zhang *et al.*, 2010).

### **Modèle double-exponentiel**

Le modèle double-exponentiel est une option mathématique qui permet de rendre compte de l'adsorption d'un soluté sur deux types de site. Il a été par exemple utilisé pour décrire l'adsorption de nucléotides sur une argile (montmorillonite) qui possède différents types de site d'adsorption (cationique et anionique) (Sciascia *et al.*, 2011). Plus particulièrement, ce modèle permet d'inclure deux vitesses d'adsorption différentes, un phénomène rapide et un second, caractérisé par une stabilisation plus lente. Ces deux phénomènes peuvent être représentés respectivement par un mécanisme rapide de diffusion externe, voire interne, et par une phase lente de diffusion intraparticulaire (Sciascia *et al.*, 2011). Il s'exprime sous la forme d'une somme de deux exponentielles, décrite dans l'Équation III-7 :

$$N_t = N_e - a_1 \cdot \exp(-k_1 t) - a_2 \cdot \exp(-k_2 t) \quad \text{Équation III-7}$$

Ce modèle double-exponentiel est classiquement utilisé pour décrire l'adsorption d'ions métalliques sur différents substrats (charbon, silice) (Chiron *et al.*, 2003; Wilczak et Keinath, 1993).

Les équations intégrées des différents modèles cités, que nous avons testées dans ce travail de thèse dans le cas de l'adsorption d'ADN partiellement fragmenté sur apatite nanocristalline carbonatée, sont résumées dans le Tableau III-1.

**Tableau III-1 Résumé des modèles cinétiques (équations intégrées) testés sur les données expérimentales de l'adsorption d'ADN sur apatite nanocristalline carbonatée**

Modèle	Equation intégrée
Elovich	$N_t = \frac{1}{b} \ln(t + t_0) + \frac{1}{b} \ln(ab)$
Double exponentiel	$N_t = N_e - a_1 \cdot \exp(-k_1 t) - a_2 \cdot \exp(-k_2 t)$
Pseudo-premier ordre	$N_t = N_e(1 - \exp(-k_1 t))$
Pseudo-second ordre	$N_t = N_e \left(1 - \frac{1}{1 + k_2 t}\right)$

## **1.2 Isotherme d'adsorption**

L'isotherme d'adsorption est une relation entre la quantité adsorbée (par unité de masse ou de surface d'adsorbant) et la quantité d'adsorbat qui reste en solution, à l'équilibre.

### 1.2.1 Protocole expérimental

L'étude des isothermes d'adsorption consiste à mettre en contact (en général sous agitation) jusqu'à l'équilibre, une masse déterminée d'adsorbant, avec un volume approprié d'une solution de concentration connue en substance à adsorber. Comme le nom l'indique, ces expérimentations sont réalisées à une température constante. On détermine ensuite la quantité adsorbée (après un temps prédéterminé) et la quantité qui reste en solution (soit la concentration à l'équilibre). La quantité adsorbée peut être déterminée soit par analyse directe du solide, soit par analyse indirecte du surnageant (méthode la plus courante). On ramène alors la quantité de substance adsorbée à un gramme (ou un mètre carré) d'adsorbant. Cette opération est répétée sur toute une série de solutions de la même substance à des concentrations différentes, de manière à pouvoir dresser l'isotherme d'adsorption. Chaque point peut être réalisé plusieurs fois afin de minimiser les incertitudes.

### 1.2.2 Allures de l'isotherme

L'allure de l'isotherme obtenue permet de tirer certaines conclusions relatives à l'affinité de l'adsorbat pour la surface (ex. pente à l'origine) et à la quantité d'adsorbat maximale qui peut être atteinte dans les conditions expérimentales en question (palier de saturation). Plusieurs types d'allure générale d'isothermes peuvent être observés, illustrés sur la Figure III-2, pour l'adsorption de molécules ou d'ions sur un solide (Hubbard, 2002; Sumner, 1999) :

- *Isotherme de type L* : reflète une affinité relativement grande entre l'adsorbant et l'adsorbat, en général en cas de chimisorption d'une monocouche d'adsorbat à la surface du solide.
- *Isotherme de type H* : dérive de l'isotherme de type L et s'applique dans des cas extrêmes d'interaction forte, de type chimisorption, entre adsorbant et adsorbat.
- *Isotherme de type S* : suggère un phénomène de coopération lors de l'adsorption, dans les cas où l'affinité entre molécules d'adsorbat est supérieure à celle entre adsorbat et adsorbant. Le regroupement des molécules d'adsorbat favorise la formation de plusieurs couches à la surface du solide quand la concentration d'adsorbat à l'équilibre augmente. L'interaction adsorbat-adsorbant correspond souvent à une physisorption.
- *Isotherme de type C* : décrit un fractionnement simple de l'adsorbant entre la surface du solide et la molécule d'adsorbat, qui a une affinité relativement constante, plutôt de type

physique (et non chimique) (ex. adsorption de composants organiques non polaires sur la matière organique des sols).

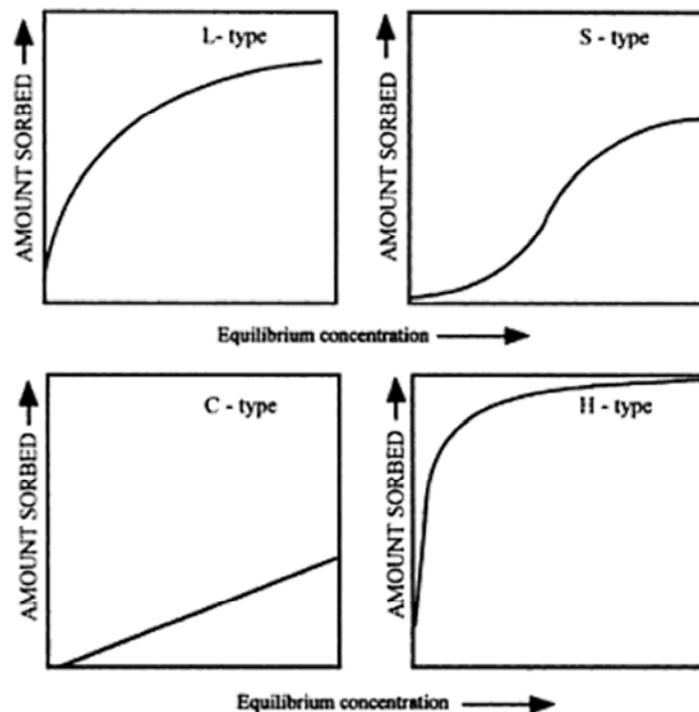


Figure III-2 Classification des isothermes selon leur forme générale, d'après (Sumner, 1999)

Les isothermes les plus courants, impliquant une chimisorption (i.e. isothermes de type L), sont ceux de Langmuir et de Freundlich. Etant donnée la complexité et la variabilité des systèmes d'adsorption possibles, d'autres modèles ont été décrits.

### 1.2.3 Modèle de Langmuir

Le modèle d'adsorption de Langmuir a été initialement conçu pour les réactions d'adsorption réversibles entre un site de surface  $S$  de l'adsorbant et un élément à adsorber  $E$  (cf. Équation III-1). Il se fonde sur certaines hypothèses : une surface uniforme (même énergie d'adsorption pour l'ensemble des sites qui sont donc équivalents), une seule couche de matière adsorbée sur cette surface (chaque site ne pouvant fixer qu'une molécule), une température constante, l'absence d'encombrement stérique et d'interaction entre molécules adsorbées, même proches (Foo et Hameed, 2010).

Dans ces conditions, l'équation de Langmuir découle de la loi d'action de masse décrite dans l'Equation III-1 et la constante d'équilibre  $K$  de cette réaction chimique peut s'écrire :

$$K = \frac{[SE]}{[S] \cdot [E]} \quad \text{Équation III-8}$$

avec :

[SE], concentration de l'élément E sur le solide, soit la quantité adsorbée  $N_{ads}$

[S], concentration en sites de surface non occupés,

[E], concentration de l'élément en solution, soit la concentration à l'équilibre  $C_{eq}$  de l'adsorbant en solution.

Considérant  $N_{max}$  (ou  $N_m$ ) comme étant la couverture maximale de l'adsorbant par l'élément E (soit le nombre total de sites d'adsorption), on peut exprimer [S] par la relation  $[S] = N_{max} - N_{ads}$ . La relation de Langmuir peut alors s'écrire, en fonction de la constante  $K$  :

$$N_{ads} = N_{max} \frac{K \cdot C_{eq}}{1 + K \cdot C_{eq}} \quad \text{Équation III-9}$$

Dans cette expression, on remarque que, lorsque la concentration d'adsorbant  $C_{eq}$  croît,  $N_{ads}$  tend vers  $N_{max}$  (valeur asymptotique). Graphiquement, ceci se caractérise par un plateau à l'équilibre qui traduit l'état de saturation : une fois que la molécule d'adsorbant occupe un site, aucune réaction d'adsorption ne peut avoir lieu à cet endroit (Foo et Hameed, 2010). L'énergie d'adsorption pour ce modèle est indépendante du taux de recouvrement.

#### 1.2.4 Modèle de Freundlich

L'isotherme de Freundlich (Équation III-10) a d'abord été empiriquement établi, pour rendre compte de la non idéalité des résultats expérimentaux obtenus avec de nombreux systèmes adsorbant/adsorbant (ex. composés organiques, espèces chimiques très réactives sur charbon activé d'origine animale). Elle décrit une courbe qui convient plutôt pour des phénomènes d'adsorption généralement faible, réversible et qui ne se limitent pas forcément à une monocouche. Dans ces cas, lorsque l'on trace la concentration de l'espèce adsorbée  $N_{ads}$  en fonction de la concentration  $C_{eq}$  en solution à l'équilibre, il est très fréquent d'obtenir une courbe ne présentant pas de plateau ou d'asymptote.

Contrairement au modèle de Langmuir, tous les sites de la surface ne sont pas équivalents et il existe dans ce cas une distribution de l'énergie d'adsorption selon les sites, qui évolue en particulier avec le taux de recouvrement. En effet, la chaleur d'adsorption décroît lorsque le taux de recouvrement augmente (Foo et Hameed, 2010). Ce modèle conviendrait aux surfaces hétérogènes et aux éléments polarisés qui auraient tendance à se repousser à la surface du

solide, rendant difficile l'adsorption de nouveaux éléments (Destriau *et al.*, 1981). Pour les faibles recouvrements, une telle distribution est formulée par l'Équation III-10 :

$$N_{ads} = K_F \cdot C_{eq}^{\frac{1}{n}} \quad \text{Équation III-10}$$

avec :

$K_F$ ,  $n$  constantes de Freundlich dépendant de la température,  $K_F$  et  $n$  diminue quand la température augmente ( $n \rightarrow 1$ , quand la température augmente)

La quantité adsorbée est la somme de l'adsorption de tous les sites, les sites ayant le plus d'affinité pour l'adsorbat étant occupés les premiers. L'augmentation de la concentration implique ensuite les sites de moins en moins « actifs » dans le processus d'adsorption, avec une décroissance exponentielle de l'énergie d'adsorption au fur et à mesure du processus d'adsorption (Foo et Hameed, 2010).

### 1.2.5 Modèle de Temkin

M. I. Temkin (Temkin et Pyzhev, 1940) propose une distribution de la chaleur d'adsorption selon les sites et s'applique pour des concentrations à l'équilibre modérées. Dans ce cas, un terme est introduit pour rendre compte des interactions adsorbant-adsorbat, ce qui conduit à établir une relation linéaire (et non logarithmique) entre le taux de recouvrement et le logarithme de la concentration (Foo et Hameed, 2010), sous la forme (Équation III-11) :

$$N_{ads} = B \cdot \ln(a_T) + B \cdot \ln C_{eq} \quad \text{Équation III-11}$$

avec

$B = RT/b_T$  où  $b_T$  est la constante du modèle de Temkin liée à la chaleur d'adsorption (J/mol)  
 $a_T$  est la constante d'affinité à l'équilibre correspondant à l'énergie de liaison maximale (L/mg)

Ce modèle permet par exemple de décrire l'adsorption de protéines sur des surfaces fonctionnalisées. Dans ce cas, la décroissance de l'énergie d'adsorption est mise sur le compte de l'implication des contacts multivalents, en termes de deux contributions qui s'opposent l'une à l'autre, lors de l'adsorption. Ceci s'exprimerait sous la forme d'une énergie « favorable » (contact spécifique protéine-site de liaison) et une énergie de liaison « défavorable », à l'origine de l'essai de plusieurs configurations, de conformation et de liaison, afin d'atteindre la situation la plus stable (Johnson et Arnold, 1995).

Initialement, l'équation de Temkin a été construite pour décrire l'adsorption de molécules d'azote sur catalyseur métallique, lors de la synthèse de l'ammoniaque, en relation

avec une cinétique de réaction de type Elovich (Temkin et Pyzhev, 1940). Par la suite, ce modèle a été appliqué à des molécules plus ou moins complexes (mercure, glycolaldéhyde, composé organique dont protéines) qui s'adsorbent sur des surfaces hétérogènes (charbon actif, support de chromatographie) le plus souvent en rapport avec une cinétique d'Elovich (Bockris et Jeng, 1992; Johnson et Arnold, 1995; Skodras *et al.*, 2008; Trasatti et Formaro, 1968; Vannice, 2005).

Dans la pratique, il est possible de déterminer, à partir des données expérimentales, le modèle de chimisorption le mieux adapté au système adsorbat/adsorbant en présence, parmi ceux proposés par Langmuir, Freundlich et Temkin, en testant la linéarité des courbes en fonction des équations de linéarisations résumées dans le Tableau III-2.

**Tableau III-2 Résumé des modèles d'isothermes que nous avons testés pour décrire l'adsorption de l'ADN sur apatite nanocristalline carbonatée (dont formes linéarisées)**

Modèles	Formes non linéaires	Formes linéaires	Tracé
Langmuir	$N_e = N_{max} \frac{K \cdot C_{eq}}{1 + K \cdot C_{eq}}$	$\frac{1}{N_e} = \frac{1}{N_{max}} + \frac{1}{K \cdot N_{max}} \left( \frac{1}{C_{eq}} \right)$	$\frac{1}{N_e} = f \left( \frac{1}{C_{eq}} \right)$
Freundlich	$N_e = K_F \cdot C_{eq}^{\frac{1}{n}}$	$\log N_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_{eq}$	$\log N_e = f(\log C_{eq})$
Temkin	$N_e = B \cdot \ln(a_T) + B \cdot \ln C_{eq}$		$N_e = f(\ln C_{eq})$

### 1.3 Désorption

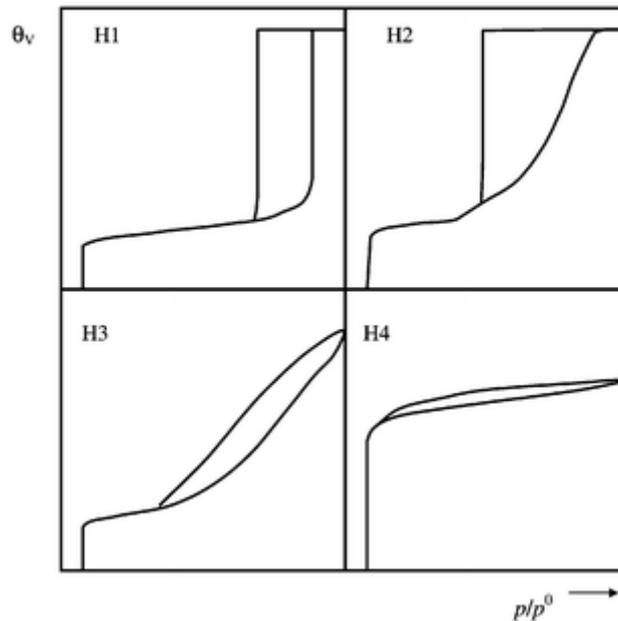
Les phénomènes de désorption sont décrits notamment pour des systèmes gaz-solide ou liquide-solide. A ce stade, il apparaît intéressant de rappeler certains points relatifs à de tels systèmes.

#### 1.3.1 Système gaz-solide

Le suivi de la désorption dans les systèmes gaz-solide peut faire apparaître une *hystérèse*, quand la courbe de désorption ne suit pas la courbe d'adsorption, après avoir atteint la saturation de la surface du solide. Cette hystérèse, quand elle est observée, est la manifestation de la condensation des molécules gazeuses dans les pores du matériau. En fonction de la nature du décalage, le type de porosité du solide peut être déduit. Les différentes formes

d'hystérèse sont classiquement décrites par 4 classes (standards IUPAC, 1985), schématisées sur la Figure III-3. En résumé :

- *type H1* : les branches de l'hystérèse en adsorption et en désorption sont presque parallèles. Ce type d'hystérèse se rencontre pour les adsorbants qui ont une mésoporosité, avec une distribution de pores plutôt cylindriques,
- *type H2* : la lenteur initiale du processus de désorption est mise sur le compte d'une mésoporosité plus complexe, qui freine la désorption des molécules d'adsorbat (porosité interconnectée, en « bouteille »)
- *type H3 et type H4*: l'absence de palier en fin d'adsorption peut être le résultat des conditions expérimentales (absence de stabilisation). Ce type d'hystérèse peut également refléter respectivement une porosité fluctuante ou une macroporosité.



**Figure III-3 Représentation schématique de la classification IUPAC des hystérèses de sorption avec  $\theta_v$ , taux de recouvrement et  $p/p^0$ , pression relative du gaz**

*Remarque* : le suivi de l'isotherme de désorption de molécules d'azote à partir des nanocristaux d'apatite hac S4 a été réalisé par la méthode BET (en utilisant un analyseur Micromeritics® Tristar II). Le type d'isotherme d'adsorption et de désorption observé (le rapport de l'isotherme se trouve en Annexe C) est de type H3. Si la présence d'une mésoporosité (diamètre des pores indiqué ~14,5 nm) du matériau est potentiellement mise en évidence, l'ajustement des conditions expérimentales du protocole doit être poursuivi pour obtenir une meilleure stabilisation du système.

### 1.3.2 Système solide-liquide

L'étude de la désorption de molécules à partir de l'adsorbant permet d'évaluer la réversibilité du processus. Ceci est notamment intéressant dans le cas où l'adsorbat est un soluté. Un processus d'adsorption est dit réversible quand « *la déviation par rapport à l'équilibre initialement établi est tellement petite que les variables qui caractérisent l'état du système passent par les mêmes valeurs dans le sens inverse du processus* » (Norde et Haynes, 1995).

Pour mettre en évidence ou non la réversibilité d'un processus d'adsorption, on suit généralement comment le système adsorbant/adsorbat évolue en le soumettant à une dilution contrôlée de la solution, tout en restant en équilibre avec la surface du solide (Shrotri *et al.*, 1998). Cet équilibre est obtenu pour une période de temps équivalente à celle nécessaire à l'équilibre de la réaction d'adsorption (Errassifi *et al.*, 2010; Hiller *et al.*, 2009), parfois en divisant ce délai par deux (Saeki *et al.*, 2011).

Certains auteurs explorent le phénomène de désorption par lavage après adsorption (Cai *et al.*, 2006; Knuutila et Paunio, 1978), ou par rinçage du solide au moyen de solutions de différentes compositions. Selon la nature de la solution et son effet sur la désorption, cela pourrait renseigner sur le type de liaisons mises en jeu lors de l'adsorption (ex. solution saline/interaction électrostatique, détergent/interaction hydrophobe) (Knuutila et Paunio, 1978; Saeki *et al.*, 2011).

Dans le cas de systèmes qui impliquent l'adsorption/désorption d'ADN sur un substrat, ou l'adsorption de molécules diverses sur des adsorbants de nature apatitique, l'effet sur la désorption de l'ajout d'ions phosphate lors de la dilution a été étudié et commenté à la lumière des possibilités d'échange ionique (Cai *et al.*, 2006; Errassifi *et al.*, 2010; Lorenz et Wackernagel, 1987; Saeki *et al.*, 2011). Cependant, la vérification expérimentale de la présence d'un échange ionique de manière simultanée à l'adsorption/désorption doit s'appuyer sur le dosage et l'étude comparative des différentes espèces ioniques libérées au cours du processus d'adsorption (Errassifi *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 1991a).

## 2 Adsorption et désorption impliquant des matériaux apatitiques

En règle générale, pour des surfaces hétérogènes, le phénomène d'adsorption peut être la manifestation de différents mécanismes, qui vont d'une adsorption de surface « simple » en

monocouche à des phénomènes plus complexes impliquant dissolution/précipitation, précipitation de surface ou échange/libération d'ions (Duc, 2002). La détermination classique du pouvoir adsorbant, qui se fonde sur la différence de concentration à l'équilibre, avant et après introduction de l'adsorbat, permet difficilement de distinguer ces différentes réactions (Li et Stanforth, 2000).

La complexité du système adsorbant-adsorbat augmente donc en présence d'un solide ionique qui se solubilise en solution selon un produit de solubilité fixe, à température donnée, quand il s'agit d'une phase stable (voir produits de solubilité de l'hydroxyapatite et de l'émail dentaire dans le chapitre I, section 3.3). Dans le cas de nos apatites nanocristallines biomimétiques, cette valeur n'est pas fixe : l'existence d'un « état d'équilibre métastable » a été démontrée lors de l'étude des propriétés de solubilité de tels composés nanocristallins (Chhetry, 2000; Ducheyne, 2011). Cette propriété est attribuée entre autre aux variations internes de composition des nanocristaux d'apatite entre le cœur apatitique et la couche périphérique non-apatitique, ainsi qu'aux micro-contraintes liées à la non-stœchiométrie de ces apatites.

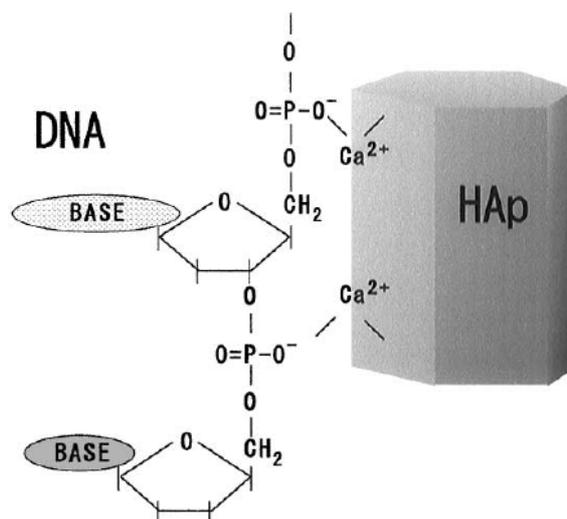
Dans le cas de l'adsorption de certaines molécules anioniques sur les apatites, les interactions de type électrostatique entre les ions  $\text{Ca}^{2+}$  de surface et le(s) groupement(s) anionique(s) ne peuvent donc pas à elles-seules expliquer certaines données d'adsorption, notamment celle où l'irréversibilité du processus d'adsorption est observée. Parfois la relation complexe qui existe entre des paramètres tels que pH ou force ionique et la quantité adsorbée complique également l'identification des mécanismes impliqués. L'incorporation d'ions étrangers ou les modifications du pH ne permettent pas non plus de toujours faciliter la désorption des molécules à partir de l'apatite (Errassifi *et al.*, 2010; Moreno *et al.*, 1984; Pearce, 1981). De plus, il existe une possibilité d'adsorption forte de polymère non chargé sur l'apatite (Pearce, 1981).

Ces constats ont amené à considérer des variations possibles des mécanismes ou des sites d'adsorption impliqués.

## 2.1 Sites d'adsorption

Les sites d'adsorption pour des ions, ou des groupements, de charge négative sur l'apatite sont classiquement représentés par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  exhibés en surface d'une apatite. Ce mécanisme est évoqué dans la mise en œuvre des propriétés d'adsorption de particules d'hydroxyapatite stœchiométrique bien cristallisée pour la séparation chromatographique de

protéines ou d'acides nucléiques (Bernardi, 1965; Watanabe *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2008). En effet, les acides nucléiques sont des molécules polyphosphatées, dont les groupements  $\text{PO}_2^-$  peuvent interagir avec l'apatite au niveau de ses sites  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette même propriété a aussi été invoquée (mais non démontrée) pour expliquer l'affinité de l'ADN pour les cristaux d'apatite, comme ceci est illustré sur la Figure III-4 (Okazaki *et al.*, 2001).



**Figure III-4** Modélisation simplifiée de l'hypothèse d'Okazaki *et al.* qui explique l'affinité des acides nucléiques (DNA) pour les cristaux d'apatite (HAp) (Okazaki *et al.*, 2001)

L'interaction  $\text{Ca}^{2+}\text{-PO}_2^-$  expliquerait les propriétés minéralisantes de l'ADN, qui permettent la formation spontanée de cristaux d'apatite dans le SBF (*Simulated Body Fluid*) (Takeshita *et al.*, 2013). Dans ce dernier cas, ce sont les ions  $\text{Ca}^{2+}$  qui s'adsorbent à l'ADN au niveau du squelette externe sucre-phosphate, puis qui interagissent avec les ions  $\text{PO}_4^{3-}$  ou  $\text{HPO}_4^{2-}$  en solution. Cette étude, sur la biominéralisation de cristaux d'apatite sur des molécules d'ADN (~2000 pb) en milieu SBF, propose en revanche l'existence de plusieurs sites en surface des cristaux ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{CaOH}^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{CaH}_2\text{PO}_4^+$ ). Néanmoins, il est généralement admis que les espèces ioniques potentiellement impliquées dans les processus d'adsorption soient aussi celles qui participent à la formation du réseau apatitique, c'est-à-dire les ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$  (Cazalbou *et al.*, 2005; Duc, 2002; Eichert, 2001; Pascaud *et al.*, 2013). Une spéciation surfacique de l'apatite en fonction du pH, ainsi que des mesures du potentiel zêta de ces composés nanocristallins doivent être cependant menées pour disposer de données complémentaires à ce sujet.

Götherstrom *et al.* (2002) se sont eux-mêmes inspirés du modèle d'Okazaki *et al.* de l'affinité des groupements  $\text{PO}_2^-$  de l'ADN pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  de l'apatite, (Figure III-4), pour

expliquer en théorie la bonne conservation de l'ADN dans les restes squelettiques anciens. Leurs travaux se fondent notamment sur la corrélation entre la possibilité d'amplification de l'ADN et la cristallinité des échantillons ou la préservation du collagène.

Cependant, cette représentation suppose une organisation précise des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , telle qu'elle est rencontrée à l'intérieur du cristal. La surface du cristal serait en théorie considérée comme une rupture simple dans le réseau cristallin. Or, la surface des apatites biologiques, dans l'os et dans la dentine, présente des caractéristiques toutes particulières du fait de la présence d'ions labiles, en surface des nanocristaux. Les espèces ioniques potentiellement échangeables pourraient représenter une proportion importante (ex. 20%) des ions de la couche hydratée (Ducheyne, 2011), en fonction de l'état de maturation du cristal. Les rapports de ces environnements non apatitiques avec le milieu environnant sont illustrés en Figure III-5. La capacité d'échange d'ions et l'évolution de la couche hydratée au cours du vieillissement des cristaux seront détaillées dans le paragraphe suivant.

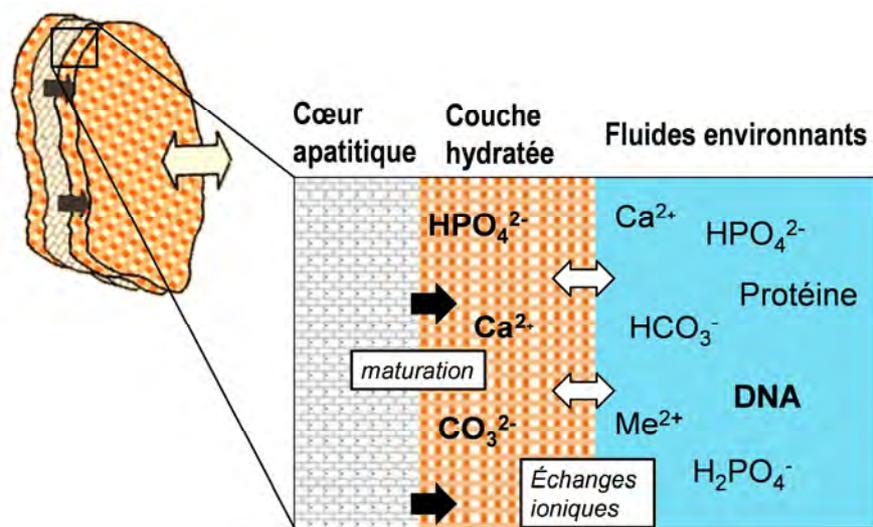


Figure III-5 Représentation schématique de la couche hydratée et de son implication dans les phénomènes d'échanges ioniques et de maturation (Eichert *et al.*, 2007; Rey *et al.*, 2007)

## 2.2 Mécanismes d'adsorption

Une des particularités des apatites lors des processus d'adsorption est la possibilité d'échange anionique ou cationique avec des ions du milieu environnant, comme illustré notamment par Drouet *et al.* (2008) pour le strontium et le magnésium. Par extension, le terme d'échange ionique s'applique également quand il s'agit d'un groupement anionique ou cationique d'une molécule plus ou moins complexe, qui vient déplacer des ions de la surface

du solide. Etant donné le caractère anionique de la molécule d'ADN, nous n'évoquerons pas les éléments cationiques, qui peuvent aussi être impliqués lors d'échanges (Ducheyne, 2011). Bien qu'il existe des fonctions amines appartenant aux bases de l'ADN qui sont susceptibles d'être exposées (fragments d'ADN aux extrémités non franches), ces fonctions sont moins susceptibles d'interagir avec l'apatite que les groupements phosphate<sup>21</sup>.

Suite à la mise en évidence de la présence d'ions  $\text{HPO}_4^{2-}$  dans les apatites, et notamment en grande quantité au sein de la couche hydratée non apatitique en surface des cristaux, ces ions sont considérés comme les principaux acteurs de tels échanges anioniques avec des molécules qui possèdent des groupements anioniques (voir Figure III-5) (Pascaud *et al.*, 2013; Rawls et Cabasso, 1984). Ces ions  $\text{HPO}_4^{2-}$ , du fait de leur charge inférieure à celle des ions  $\text{PO}_4^{3-}$ , sont moins stabilisés par des attractions électrostatiques avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$  environnants, ce qui leur confère une mobilité accrue. Les ions  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$  seront regroupés par la suite sous le terme d'« ions phosphate ».

### 2.2.1 Hydroxyapatite

La capacité d'échange d'ions de l'apatite bien cristallisée a été prouvée expérimentalement, entre ions phosphate de la surface de l'apatite et groupements anioniques de la molécule adsorbée. Dans le cas de petites molécules phosphatées (phosphosérine, phosphocitrate, biphosphonates), l'adsorption est accompagnée par la libération d'ions phosphate (Errassifi *et al.*, 2010; Johnsson *et al.*, 1991; López-Macipe *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1991b). D'autres groupements négatifs peuvent être impliqués, comme les groupements carboxylate dans le cas du citrate, en raison de l'affinité également reconnue de ce groupement pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  (López-Macipe *et al.*, 1998). Dans le cas de polymères, l'adsorption de certains polyanions (polyacrylamide, mucine) sur l'apatite implique également une libération d'ions phosphate proportionnelle à la quantité adsorbée (Pearce, 1981).

### 2.2.2 Apatite nanocristalline

Dans le cas d'apatites nanocristallines, les propriétés de la couche hydratée impactent fortement sur l'étude de la réactivité de ces composés en solution. La présence d'espèces

---

<sup>21</sup> Les travaux de thèse d'A. Al-Kattan (2010, Université Paul Sabatier), supervisé par C. Drouet, ont notamment montré l'interaction préférentielle des phosphates de l'acide 2-aminoethylphosphorique par rapport aux amines à la surface d'apatite nanocristalline.

ioniques labiles, en surface des nanocristaux d'apatite biomimétique, augmente la capacité d'échange ionique en surface de ce matériau, en comparaison avec l'hydroxyapatite stœchiométrique (Benaziz *et al.*, 2001; Errassifi *et al.*, 2010; Ouizat *et al.*, 1999; Pascaud *et al.*, 2013). Dans le cas des bisphosphonates, la quantité de molécules adsorbées par unité de surface spécifique est nettement plus grande dans le cas des apatites nanocristallines, par rapport à l'hydroxyapatite stœchiométrique (Errassifi, 2011).

A l'inverse, l'étude du phénomène de maturation, qui se déroule spontanément en solution, a mis en évidence l'incorporation de certaines espèces ioniques au cœur de la structure apatitique, aux dépens de la couche hydratée, ce qui a pour conséquence une diminution de la quantité d'éléments adsorbés (Ouizat *et al.*, 1999). Ces ions peuvent être d'origine exogène, en équilibre avec la composition du milieu environnant (ex.  $Pb^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $CO_3^{2-}$ ) (Cazalbou, 2000; Drouet *et al.*, 2008; Eichert, 2001).

La disparition progressive des environnements non apatitiques lors de la maturation diminue le nombre de sites potentiellement actifs lors de l'adsorption. Par conséquent, une diminution de la quantité maximale adsorbée est observée au fur et à mesure de la maturation des cristaux (Errassifi *et al.*, 2010; Ouizat *et al.*, 1999; Pascaud *et al.*, 2013). La tendance inverse est observée pour l'affinité de l'adsorbat (albumine bovine) vis-à-vis de la surface apatitique, ce qui peut être estimée grâce à la pente à l'origine de l'isotherme d'adsorption : cette valeur décroît avec le temps de maturation (Ouizat *et al.*, 1999).

Le potentiel d'adsorption des apatites faiblement cristallisées (comme c'est le cas dans l'os ou la dentine) est aussi déterminé par les dimensions nanométriques des cristaux, ce qui augmente considérablement le rapport surface/volume en comparaison avec les microcristaux d'hydroxyapatite stœchiométrique. La morphologie, le plus souvent en plaquettes, de ces nanocristaux, jouerait également un rôle important (les cristaux d'hydroxyapatite, quant à eux, sont classiquement des particules aciculaires de section hexagonale, allongées selon l'axe c).

Malgré sa complexité, l'adsorption de nombreuses molécules (colorants, acides aminés, facteurs de croissance, protéines...) sur des apatites a souvent pu être modélisée par un isotherme de type Langmuirien (Autefage *et al.*, 2009; Errassifi, 2011; Iafisco *et al.*, 2010; Mahmud *et al.*, 2012).

De façon intéressante, l'étude expérimentale de l'adsorption de collagénases (d'origine bactérienne) sur substrats apatitiques (hydroxyapatite synthétique, émail et dentine réduits en poudre) a mis en évidence une affinité de cette enzyme pour le minéral (isotherme de type Langmuir) (Knuutila et Paunio, 1978). La diminution d'une telle affinité, d'un facteur ~10,

par un prétraitement de l'apatite a été démontrée, dans le cas d'une adsorption préalable d'ADN (2 mL de solution d'ADN concentrée à 2,5 mg/mL pour 50 mg d'apatite).

### 2.3 Cinétiques d'adsorption

Une revue bibliographique du phénomène d'adsorption sur cristaux d'apatite par B. Sallek (Sallek et Lebugle, 1993) décrit une grande variabilité des cinétiques d'adsorption en fonction de l'adsorbat. L'équilibre cinétique peut être atteint très rapidement, en moins de deux heures, pour le phénol (Bahdod *et al.*, 2009), des acides aminés (Benaziz *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 1984) ou des protéines (albumine, protéines salivaires) (Ouizat *et al.*, 1999), mais aussi pour des phosphonates (Pascaud *et al.*, 2013) et polyphosphonates (M=30kDa), pour lesquels, à pH7, 95% des groupements phosphoniques acides sont ionisés (Rawls et Cabasso, 1984). Pourtant, les processus d'adsorption qui impliquent des espèces chargées sont généralement associés à des cinétiques lentes : c'est notamment le cas pour l'acide polyacrylique (Misra, 1993).

Par ailleurs, le processus d'adsorption dépend intimement des conditions expérimentales, en particulier en présence d'un adsorbat ionisé. Ces conditions peuvent influencer sur la surface de l'adsorbant, l'ionisation des particules, leur conformation, le régime de répulsion électrostatique, la compétition pour les sites d'adsorption. Par conséquent, les paramètres de pH et de force ionique, ainsi que la nature des ions minéraux en présence lors de l'adsorption, doivent être pris en compte avant toute comparaison (Sallek et Lebugle, 1993).

### 2.4 Réversibilité du processus

Dans le cas d'adsorbants apatitiques, en général, une irréversibilité totale ou partielle du processus d'adsorption est observée suite à des échanges/libérations d'ions, contrairement au cas théorique du modèle de Langmuir. En cas d'irréversibilité, l'isotherme de désorption ne suit *pas* l'isotherme d'adsorption. Pour les polymères, ce processus peut être mis sur le compte de la difficulté de rompre simultanément l'ensemble des liaisons impliquées dans l'adsorption de type multidentate (Errassifi *et al.*, 2010). Néanmoins, l'irréversibilité du processus est également observée pour des molécules simples (ex. citrate, phosphocitrate, phosphosérine, phosphonate) : dans ces cas, un échange ionique est impliqué (Errassifi, 2011; López-Macipe *et al.*, 1998; Pascaud *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 1991b).

Dans le cas d'adsorption de molécules anioniques, l'ajout d'ions phosphate dans le milieu permet alors souvent de provoquer une désorption, au moins partielle, de l'adsorbat (Knuutila and Paunio, 1978; Rölla and Melsen, 1975). Ceci s'explique par un déplacement « inverse » des ions et des molécules adsorbées. Errassifi *et al.* ont proposé l'introduction d'un terme relatif à la concentration de phosphate en solution ( $P_{sol}$ ) dans l'équation de Langmuir (Équation III-12) pour rendre compte de ce type d'adsorption :

$$N_{ads} = N_{max} \frac{K(C_{eq}/P_{sol})}{1 + K \left( \frac{C_{eq}}{P_{sol}} \right)} \quad \text{Équation III-12}$$

## B ADN MODELE UTILISE POUR L'ADSORPTION

### 1 Comportement de l'ADN lors de l'adsorption

#### 1.1 Généralités

Dans le chapitre II (section A.3), les molécules d'ADN ont été décrites comme des macromolécules anioniques. Comme les polymères, elles sont caractérisées par une longueur de persistance qui détermine leur rigidité. Pour les polyélectrolytes, ce qui est le cas de l'ADN étant donnée la quantité de charges négatives phosphatées qu'il porte dans une très large gamme de pH, cette longueur de persistance est sous la dépendance d'un régime de répulsion électrostatique entre les charges d'une même chaîne. Ce régime peut être modulé de façon importante par la présence de contre-ions, en fonction de leur nature et de leur concentration. La force ionique permet de compenser l'étirement de la molécule chargée (Andelman et Joanny, 2000). Un contre-ion cationique aura d'autant plus tendance à se positionner à proximité des fragments d'ADN que sa valence est élevée : c'est pourquoi les ions plurivalents peuvent réduire intensément le volume occupé par l'ADN.

Etant donnée la longueur de persistance de l'ADN (évaluée entre 50 et 100 nm, en fonction de la concentration en ions monovalents), l'ADN ancien, dont les fragments excèdent rarement 300 pb (soit ~100 nm), pourra être modélisé par une tige flexible. En revanche, la solution d'ADN commerciale, utilisée dans la partie expérimentale décrite dans la section C.2, est composée de fragments de tailles comprises dans une gamme de 300 à 1000 pb. Ces molécules pourront *a priori* adopter des conformations tridimensionnelles en pelote de dimensions variables en fonction de la composition et de la nature du solvant.

Suite à leur adsorption sur une surface, la conformation des molécules adsorbées peut varier en raison notamment de la limitation du degré de liberté des segments moléculaires de 3 à 2 dimensions (Wiggins *et al.*, 2006), avec la recherche d'un compromis thermodynamiquement stable d'interaction entre les sites de l'adsorbant et les groupements de l'adsorbat (Johnson et Arnold, 1995). Ce phénomène a été mis en évidence pour deux types d'albumine adsorbées sur des composés apatitiques (Iafisco *et al.*, 2010).

## 1.2 Revue bibliographique des phénomènes d'adsorption d'ADN

De nombreuses études d'adsorption impliquent l'ADN et des surfaces inorganiques (voire organiques) d'origine synthétique ou naturelle.

L'adsorption d'ADN bactérien sur les sédiments du sol a été étudiée pour évaluer le potentiel protecteur de ce mécanisme vis-à-vis de la dégradation de l'ADN d'origine géochimique. Ce phénomène est également susceptible d'être à l'origine de la synthèse prébiotique des premières séquences d'ADN, suite à l'adsorption des nucléotides sur des surfaces minérales dans la « soupe primitive » (Feuillie, 2012; Sciascia *et al.*, 2011).

Les phyllosilicates (montmorillonite, kaolinite, illite) sont majoritairement représentés dans ces études, soit purs, soit au sein d'argiles ou de sols plus complexes. Ces surfaces exposent donc des atomes de silice, dont certains peuvent être représentés par des groupements de type silanol  $\equiv\text{Si-OH}$ . Les points-clé de certains de ces travaux sont résumés dans le Tableau III-3.

**Tableau III-3 Synthèse de quelques études d'adsorption impliquant l'ADN et des matériaux inorganiques naturels (sols)**

Ref.	Type d'ADN	Adsorbant	Remarques
Lorenz et Wackernagel, 1987	ADN de thymus de veau	Sable (quartz)	Cinétique rapide (2 heures) Effet des cations (monovalent < divalent) Désorption partielle ( $\text{NaCl} < \text{NaPO}_4$ )
Romanowski <i>et al.</i> , 1991	ADN plasmidique linéaire (2,4 kb)	Sable (quartz)	Mêmes conclusions pour l'adsorption que précédemment
Ogram <i>et al.</i> , 1994	Calf thymus DNA trois ADN marqués de longueur 2,7 à 23 kbp	Argiles  Sable	Isotherme de Freundlich (tous les matériaux) Adsorption préférentielle des fragments courts (pénétration dans les pores) Adsorption préférentielle des fragments longs (non porosité du matériau)
Franchi <i>et al.</i> , 2003	ADN simple et double brin	Phyllosilicate	Cations nécessaires à l'adsorption Hypothèse : pont cationique entre charges négatives de l'ADN et de la surface
Cai <i>et al.</i> , 2006	ADN double brin	Argiles Inorganique (entre autres)	Isotherme de Langmuir Diminution importante de la quantité adsorbée avec $\text{pH} > 5$ Désorption en présence de phosphates (mécanisme d'échange de « ligand » au lieu de d'interaction électrostatique)
Beall <i>et al.</i> , 2009	Oligonucléotide (25-mer)	Montmorillonite (Na-MMT, Ca-MMT)	Peu d'effet des cations monovalents sur la quantité adsorbée, contrairement aux cations divalents

L'affinité de l'ADN pour l'acide humique, seul ou en combinaison avec des minéraux, a également été mise en évidence (Crecchio et Stotzky, 1998; Saeki *et al.*, 2011). Si la présence de matière organique associée aux sols tend à diminuer le pouvoir adsorbant de ce matériau vis-à-vis de l'ADN (Cai *et al.*, 2006), l'affinité de l'ADN pour l'acide humique est telle que 70 à 80% de l'ADN restent liés après lavage simple par différentes solutions (eau désionisée, NaCl 0,1M, tampon Tris EDTA-NaCl) (Saeki *et al.*, 2011). Un des mécanismes possibles d'inhibition de l'amplification de l'ADN ancien par PCR provient de toute évidence de cette interaction.

Dans l'ensemble de ces études de systèmes d'adsorption ADN-sédiment, une adsorption de type Langmuir ou Freundlich est observée, ce qui est en faveur d'une chimisorption qui impliquerait vraisemblablement les groupements phosphate de l'ADN. La synthèse des études bibliographiques fait également apparaître le rôle primordial des cations en solutions qui, selon les auteurs, pourraient participer à la formation d'un pont entre les charges négatives de l'ADN et de la surface. Une relation positive entre la concentration en sels et la quantité d'ADN maximale adsorbée irait dans le sens de l'hypothèse d'un pont cationique, mais cela n'a pas été observé pour l'instant.

L'effet de la valence de l'ion en solution sur la quantité d'ADN adsorbée semble toutefois plutôt lié à l'impact de la force ionique sur la conformation de l'ADN, à la lumière des données bibliographiques du chapitre II, section A.3.

Une évolution de l'adsorption en fonction du pH, avec une augmentation de la quantité d'ADN adsorbée pour des pH faibles ( $\text{pH} < 5$ ), serait également la conséquence d'un mécanisme d'adsorption de type électrostatique, si d'autres modifications de surface ne sont pas mises en évidence (ex. dissolution/précipitation). Une des explications avancées est que la diminution du pH favoriserait la protonation du squelette sucre-phosphate ( $\text{PO}_4^- \rightarrow \text{HPO}_4$ ) et la diminution de la densité de charges négatives de la molécule, et par conséquent, le phénomène de répulsion électrostatique entre l'ADN et les groupements anioniques de la surface (Cai *et al.*, 2008). Cependant, dans le cas des matériaux silicatés, cette diminution de la répulsion électrostatique par la diminution du pH semble plutôt être attribuée à la protonation de la silice, comme ceci est décrit dans le chapitre I (section C3.2), pour l'adsorption de molécules d'ADN sur des particules de silice en vue de sa purification (Vandeventer *et al.*, 2012). Pour autant, pour des valeurs très faibles de pH, une précipitation des molécules d'ADN, à l'origine d'une augmentation de l'adsorption, n'est pas exclue (Li *et al.*, 2014).

La promotion de la désorption par l'ajout d'ions phosphate, dans les solutions de lavage du solide après adsorption, confirme le rôle des groupements phosphate de l'ADN, en tant que sites d'accroche à la surface. Cette observation peut être une fois de plus expliquée par l'existence d'un mécanisme d'échange ionique qui implique les ions phosphate en solution.

Un effet similaire du pH et de la force ionique ont été observés pour d'autres types d'adsorbants. L'effet de la force ionique jouerait surtout sur la conformation des chaînes d'ADN, dans le cas d'une adsorption sur le polypyrrole (polymère organique conducteur). En revanche, la diminution du pH entraîne ici l'augmentation du nombre de charges positives exposées en surface par la protonation des groupements pyrrole (Saoudi *et al.*, 1997), ce qui favorise les interactions électrostatiques avec les groupements anioniques de l'ADN.

Pourtant, dans l'étude de l'adsorption d'oligonucléotides simple- et double-brin sur particules d'hydroxyapatite, dans un tampon de phosphate de sodium SPB ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), les effets observés ne sont pas les mêmes. Pour un oligonucléotide simple-brin (60-mer), l'affinité et la quantité adsorbée augmentent à pH8 par rapport à une adsorption à pH6 (Chen *et al.*, 2007). L'effet est moins net pour des oligonucléotides simple-brin susceptibles de s'agencer en structures secondaires, ce qui serait mis sur le compte d'une déstabilisation de la structure nucléique. L'importance de la stabilité structurale dans le phénomène d'adsorption expliquerait la plus grande quantité d'ADN double-brin adsorbé, par rapport à l'ADN simple-brin. L'effet de la déprotonation, à pH basique, de l'ADN est dans ce cas favorable à l'interaction des groupements phosphates négatifs de l'ADN avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$  de l'hydroxyapatite.

L'augmentation de la force ionique (de 0,03 à 0,12M), dans le cas de l'ADN double-brin, diminue l'affinité ADN-hydroxyapatite (et la quantité d'ADN adsorbée), en raison d'un phénomène d'écran des charges qui contribuent aux interactions électrostatiques entre l'ADN et l'hydroxyapatite, par l'ajout de contre-ions,. Dans l'étude de Chen *et al.*, l'effet de la force ionique dans la conformation de l'ADN peut néanmoins être négligé en raison de la taille très petite des oligonucléotides utilisés (15-mer et 60-mer).

## **2 Caractérisation et quantification de l'ADN**

Le choix de l'ADN que nous avons utilisé dans ce travail, comme modèle pour l'étude de l'adsorption sur apatite biomimétique, s'est heurté à plusieurs limitations. Dans l'idéal, il s'agissait de disposer d'une solution d'ADN qui soit :

- concentrée, afin de pouvoir la diluer de façon séquentielle pour la construction des isothermes d'adsorption,
- en grande quantité (au moins 200 mg), pour tester l'adsorption et sa reproductibilité en faisant varier plusieurs paramètres,
- composée de fragments n'excédant pas les 100 pb, avec des extrémités non franches, pour mimer au plus près l'ADN ancien,
- homogène, pour s'affranchir de la variabilité liée à une solution polydisperse (Porsch *et al.*, 2009)
- pure, afin d'éviter l'interférence avec les additifs potentiels lors de l'adsorption (ex. EDTA, Tris...)

Ceci a exclu d'emblée la possibilité de pouvoir travailler à partir de molécules extraites à partir de restes anciens, ni même à partir de tissus biologiques, étant donné le coût des réactifs utilisés lors de cette extraction, en regard des quantités nécessaires.

Parmi les solutions d'ADN pures commercialisées, trois types sont classiquement retrouvés : l'ADN issu de gonades de saumon (*salmon testes*), de hareng (*herring sperm*) et l'ADN de thymus de veau (*calf thymus DNA*). Parmi les références proposées pour ce dernier, deux ont retenu successivement notre attention. Les indications du fabricant sont résumées dans le Tableau III-4.

**Tableau III-4 Descriptif technique des solutions d'ADN commerciales citées, selon les fabricants**

	<b>Invitrogen®</b>	<b>Trevigen® (R&amp;D Systems)</b>
<b>Intitulé</b>	UltraPure™ Calf Thymus DNA Solution	Calf Thymus DNA
<b>Taille fragments</b>	au moins 75% < ou égal à 2000 pb	200 - 500 pb
<b>Adjuvants</b>	aucun	10 mM Tris, 1mM EDTA, pH8
<b>Concentration</b>	9,5 à 11 mg/mL	10 mg/mL (précise)

## 2.1 Concentration de la solution commerciale d'ADN

Au début de cette étude, nous avons déterminé quelques points de l'isotherme d'adsorption de l'ADN Invitrogen® sur hap S0 (non carbonatée), avec un rapport solide-solution de 5 mg pour 5 mL (voir Figure III-6). Le calcul de propagation des erreurs a montré que la grande dispersion des points est surtout le fait de l'incertitude quant à la concentration de la solution d'ADN commerciale qui, selon le fabricant est de l'ordre de 9,5 à 11 mg/mL.

C'est pourquoi la suite des expériences d'adsorption a été effectuée avec une solution commerciale mieux caractérisée (ADN Trevigen®).

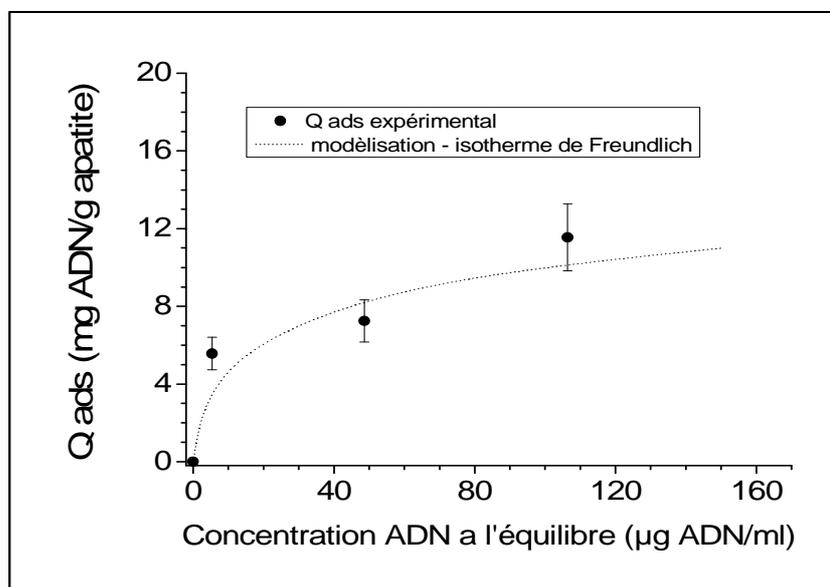


Figure III-6 Exploration de l'isotherme d'adsorption de l'ADN de thymus de veau Invitrogen® sur l'apatite non carbonatée maturée 1 semaine hapS0, et modélisation selon l'équation de Freundlich

Notons que l'ADN de la solution Trevigen® est solubilisé dans du TE (Tris, EDTA). Cependant, compte tenu des concentrations très faibles de ces composés (respectivement 10 mM et 1 mM), l'effet du Tris, et surtout de l'EDTA, a été considéré comme négligeable, après dilution lors de la préparation des solutions mères, comprises entre 0 et 600 µg/mL.

## 2.2 Quantification

La quantification de la concentration en ADN des solutions a été effectuée dans ce travail par la mesure de la densité optique (D.O) de la solution à 260 nm, à l'aide du spectrophotomètre UV NanoDrop 2000c. L'étalonnage de l'appareil à l'aide de standards préparés à partir de la solution commerciale Trevigen® a permis d'établir graphiquement (Figure III-7) la relation suivante : 1 unité D.O = 46,3 µg/mL ADN Trevigen®.

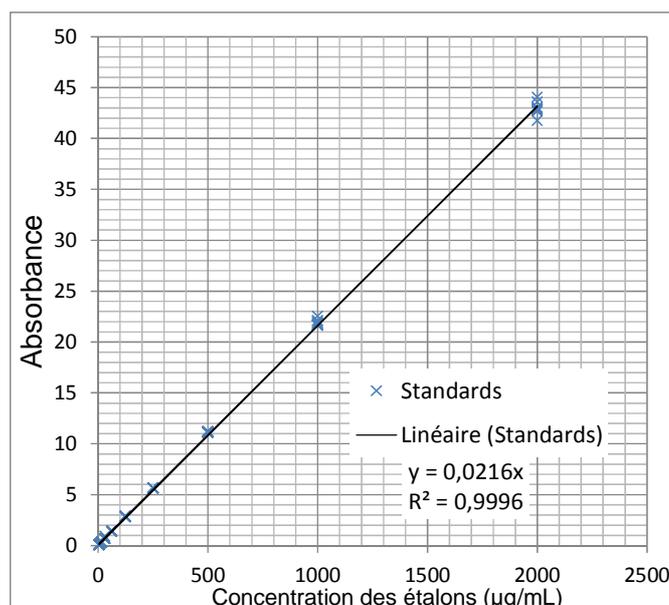


Figure III-7 Courbe d'étalonnage du NanoDrop™ 2000c à partir de solutions standards d'ADN Trevigen®

### 2.3 Taille des fragments

La taille des fragments d'ADN des deux solutions d'ADN commerciales a été contrôlée sur gel d'agarose à 1%. Ceci a permis de révéler (Figure III-8) que, contrairement aux indications du fabricant, la majorité des fragments se trouvait dans une gamme de taille comprise entre 300 et 1000 pb pour l'ADN Trevigen®.

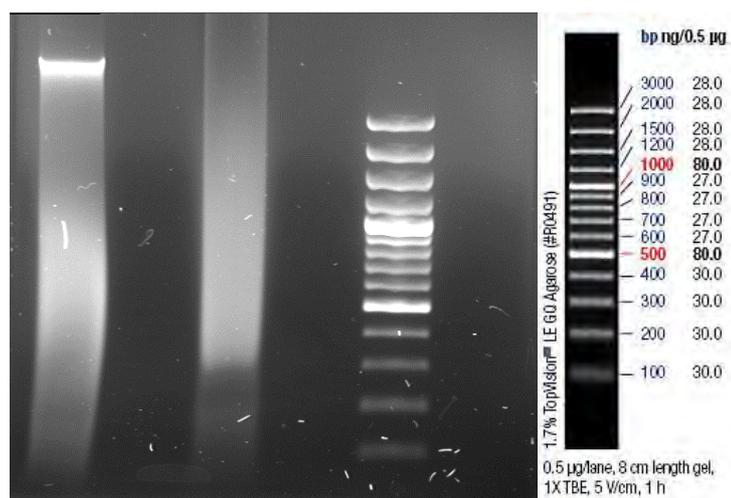


Figure III-8 Répartition de la taille des fragments d'ADN sur gel agarose 1%. A gauche, ADN Invitrogen®. Au milieu, ADN Trevigen®. A droite, 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas®)

L'ADN Invitrogen® contient encore une fraction d'ADN génomique non négligeable. Sa répartition globale est plus étendue et centrée sur 700 pb.

### **3 Protocoles de dégradation de l'ADN**

Dans l'objectif de réduire la taille des fragments et pouvoir ainsi suivre l'influence de la taille des fragments sur le comportement de l'ADN lors de l'adsorption, divers protocoles ont été envisagés en termes de faisabilité (moyens techniques à disposition, temps consacré, rendement) et de prix. Suite à cela, l'élaboration d'un protocole de dégradation simple et peu coûteux de l'ADN a été initié.

#### **3.1 Approches « *bottom-up* »**

Il s'agit ici d'évaluer la possibilité de synthétiser en grande quantité des fragments de la taille désirée.

##### **3.1.1 Synthèse de fragments par PCR**

Cette technique permet d'amplifier, de manière exponentielle, un fragment d'ADN, à l'aide d'amorces oligonucléotidiques bordant la séquence à amplifier, une ADN polymérase, et des désoxynucléotides triphosphates. Le rendement théorique est de  $2^n$ , avec  $n$ , nombre de cycle de PCR. Un même milieu réactionnel peut être utilisé pour 30 cycles (effectués en 2 heures), soit  $2^{30}$  ( $\sim 10^9$ ) molécules synthétisées en théorie par PCR. En raison de son rendement faible Compte tenu des quantités désirées dans notre cas, cette technique est inapplicable.

*Remarque* : Une quantité de 200 mg de fragments de 200 pb pourrait être synthétisée à l'aide de  $10^9$  PCR. En effet, un fragment d'ADN de 200 pb pèse environ  $2 \cdot 10^{-16}$  mg, soit  $10^{18}$  molécules pour 200 mg.

##### **3.1.2 Clonage d'ADN recombinant**

Dans cette technique, le fragment d'ADN est mis en présence d'un ADN bactérien plasmidique et d'une ligase qui, en présence d'ATP, va reconstituer les liaisons covalentes phosphodiester. Ce fragment porte également un gène de résistance à un antibiotique. L'ensemble des ADN recombinants est mélangé à des bactéries en excès numérique. Seules

les bactéries transformées (c'est-à-dire portant l'ADN recombinant) exprimeront le gène de résistance à l'antibiotique et pourront croître sur le milieu qui contient cet antibiotique. Le rendement et la qualité de l'ADN plasmidique préparé dépendent d'un certain nombre de facteurs : nombre de copies initiales du plasmide, taille de l'insert, nature de la souche hôte, volume de la culture et milieu de culture.

Le rendement théorique de cette technique, en cas de sous-traitance pour une synthèse à haut débit par le fabricant *Qiagen*®, est de 100 mg pour un plasmide (soit environ 4 mg pour un fragment de 200 pb). Là encore, le rendement est trop faible et la technique trop coûteuse (50 préparations seraient nécessaires, pour un coût minimum de 20 000 euros, sans compter les étapes annexes de synthèse et de purification).

### 3.2 Approche « top-down »

Pour dégrader des molécules d'ADN génomique hautement polymérisées en fragments courts, il existe des procédés enzymatiques et mécaniques. La taille des fragments se distribuera autour d'une valeur moyenne que l'on souhaite la plus proche possible de 100 pb.

#### 3.2.1 Techniques enzymatiques

D'après les calculs précédents, il apparaît que l'utilisation de réactifs enzymatiques engendre un coût très élevé. Les étapes de purification nécessaires impactent aussi sur le coût, et sur le temps de mise en œuvre. Le cas échéant, un des facteurs limitant sera la capacité de liaison des colonnes d'exclusion, limitée à un certain volume. Un protocole de dégradation par des enzymes de restriction (endonucléases spécifiques) peut être écarté pour ces raisons.

Cependant, un protocole implique la digestion d'ADN de thymus de veau, au niveau des sites internucléosomiques de la chromatine, par nucléase micrococcique (Wang *et al.*, 1990). L'ADN est extrait à partir du tissu entier. D'après les auteurs, ce protocole permettrait de générer 3,2 g de fragments d'ADN de  $160 \pm 5$  pb, pour des applications notamment en biophysique. Il pourrait être de surcroît intéressant de garder une partie des protéines associées à l'ADN au sein du nucléosome pour déterminer l'influence des histones dans l'interaction ADN – apatite. La faisabilité d'un tel protocole dépend en premier lieu d'une infrastructure, qui puisse disposer de l'ensemble des équipements nécessaires. Une estimation du coût n'est pas indiquée et devra être réalisée le cas échéant.

### 3.2.2 Techniques mécaniques

La fragmentation mécanique de l'ADN (« *shearing* ») peut être réalisée par nébulisation (passage de la solution d'ADN à travers un capillaire), et surtout par sonification. D'après la littérature, c'est cette dernière technique qui est le plus souvent utilisée, pour mimer une dégradation de l'ADN *post mortem*, dans un contexte médico-légal (Bender, 2004), ou pour fragmenter l'ADN en vue de la construction de bibliothèques avant séquençage de deuxième génération (Butcher et Beck, 2010). Les ultrasons peuvent être appliqués au moyen d'une sonde (ex. Branson® *Sonifier*, Fisher® *Bioblock* avec microtip) ou d'un bain (ex. Diagenode® *Bioruptor*). Le mode d'action des ultrasons semble s'appuyer sur la création d'un stress mécanique sur le matériel, relayé au niveau local par l'implosion des bulles créées par l'« expansion » du liquide. Elles absorbent l'énergie propagée par les ondes au sein du liquide jusqu'à la rupture.

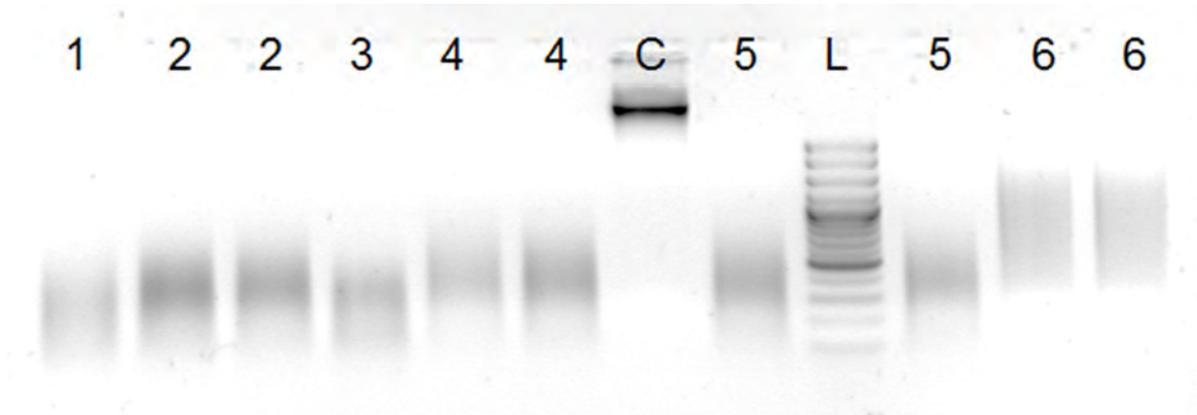
Nos premiers essais de sonification sur ADN génomique (Worthington®, *Highly polymerized calf thymus DNA*) avec le *Bioruptor* de Diagenode® ont été réalisés au Laboratoire de Génétique Cellulaire (INRA, Castanet-Tolosan, Haute-Garonne) et au Laboratoire de Microbiologie et Génétiques Moléculaires (CNRS, Toulouse). Ils ont permis à terme la dégradation d'ADN génomique, de façon reproductible, en fragments de taille inférieure à 800 pb, répartis autour de 400 pb (le gel d'électrophorèse est représenté sur la Figure III-9). Les paramètres de sonification principaux ont été ajustés tels que :

- **pour l'ADN** : solution concentrée à 50 ng/μL, volume de 3 mL (eau désionisée ou TE), dans des tubes de type Falcon 15 mL, en TPX (l'échantillon 6 a été placé dans un type PP classique, ce qui diminue l'efficacité de la sonification, cf. Figure III-9)
- **pour le *Bioruptor*** : réglage sur intensité *Low*, avec inserts métalliques dans les tubes. La sonification s'effectue sur bain d'eau glacée, pendant 30 minutes (cycle 30'' ON/30'' OFF). Eventuellement, pour plus d'efficacité, le niveau d'eau peut augmenter de 3-4 mm par rapport au niveau indiqué par le fabricant.

Cette technique est très simple à mettre en œuvre et peu coûteuse. Le seul facteur limitant réside dans les possibilités de concentration des solutions après sonification. Deux possibilités semblent se dégager :

- la lyophilisation partielle (la lyophilisation complète n'a pas permis de récupérer la totalité des fragments (rendement estimé entre 5 et 10 % de la quantité d'ADN initiale), suite à des difficultés de récupération du composé,

- l'utilisation de colonnes d'exclusion de grands volumes : un test préliminaire à l'aide d'une colonne Amicon Ultra-15 (seuil de 100 kDa) a permis de concentrer un volume compris entre 10 et 15 mL de solution soniquée concentrée à 50 ng/μL. Après centrifugation, environ 400 μL de solution concentrée à 1475 μg/mL sont récupérés.



**Figure III-9** Electrophorèse sur gel d'agarose 1,2% de 6 solutions d'ADN Worthington® concentrées à 50 ng/μL après fragmentation de l'ADN par sonification (Diagenode® Bioruptor). Les échantillons 2, 4, 5 et 6 ont été déposés 2 fois (20 puis 15 μL) ; C, contrôle (non soniqué) ; L, 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas®)

Compte tenu du coût d'une telle colonne (~10 euros), cette option est difficilement envisageable, en gardant le même protocole d'adsorption que celui décrit ici. En effet, pour atteindre la saturation, la solution d'ADN utilisée est concentrée à ~500 μg/mL (pour un ADN moins fragmenté). Etant donné que chaque point est réalisé en triple, cela consommerait ~20 colonnes. Cependant, la régénération des colonnes pourrait être envisagée avec succès (Tuross, 1994), puisque l'impact sur l'étude de l'adsorption d'une contamination demeurerait faible.

## **C PROTOCOLES D'ADSORPTION ENTRE ADN ET APATITE BIOMIMETIQUE**

### **1 Historique du protocole**

Etant donnée l'absence de données antérieures sur l'adsorption de molécules d'ADN sur apatite nanocristalline, le protocole d'adsorption a été développé progressivement en vue d'obtenir des données fiables et reproductibles. Nous décrivons ici les principales étapes du développement du protocole d'adsorption, réalisé à température ambiante ( $T_{amb}$ ) (sauf exceptions mentionnées), à partir de solutions d'ADN commerciales.

#### **1.1 Influence de l'agitation**

##### ***Essais préliminaires***

Une étude préliminaire de la faisabilité d'une telle étude a été réalisée à partir de la solution d'ADN commercialisée par Invitrogen® et d'une apatite nanocristalline non carbonatée maturée pendant 1 semaine (hap S0). La mauvaise reproductibilité des premiers résultats a tout d'abord été mise sur le compte d'une absence d'agitation du système au cours de l'adsorption. Cependant ces données ne sont pas le reflet de la situation à l'équilibre. Fixée arbitrairement à 2,5 heures à ce stade, la durée de temps de contact nécessaire à l'équilibre a par la suite été ajustée à 3 jours. L'influence majeure d'une agitation magnétique constante sur la quantité d'ADN adsorbée ( $Q_{ads}$ ) peut néanmoins être visualisée sur la Figure III-10.

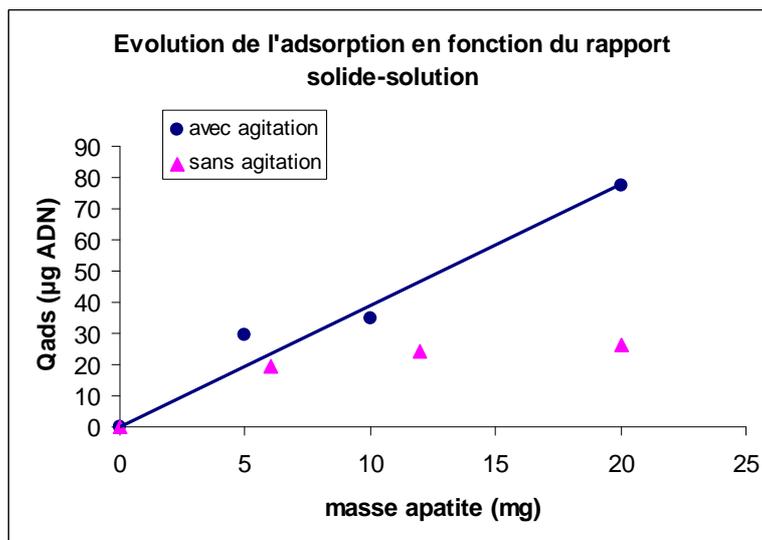


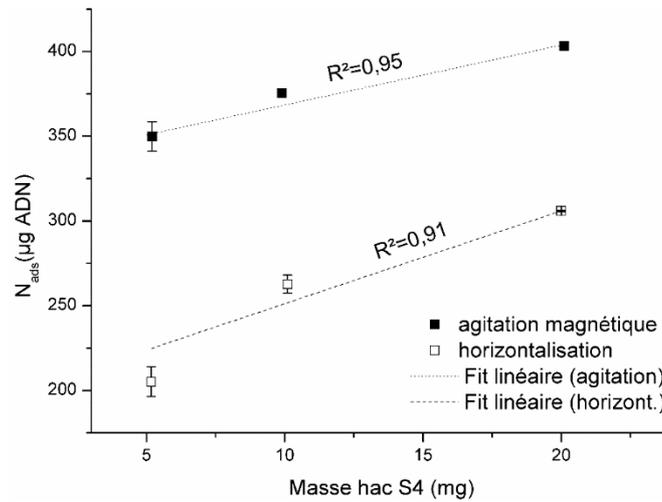
Figure III-10 Influence de l'agitation magnétique à  $T_{amb}$  sur l'adsorption d'ADN en présence de 5, 10 ou 20 mg d'apatite nanocristalline non carbonatée (hapS0) maturée 1 semaine, dans un volume 5 mL de solution d'ADN (Invitrogen®) concentrée  $\sim 90$  mg/mL

### Développement du protocole final

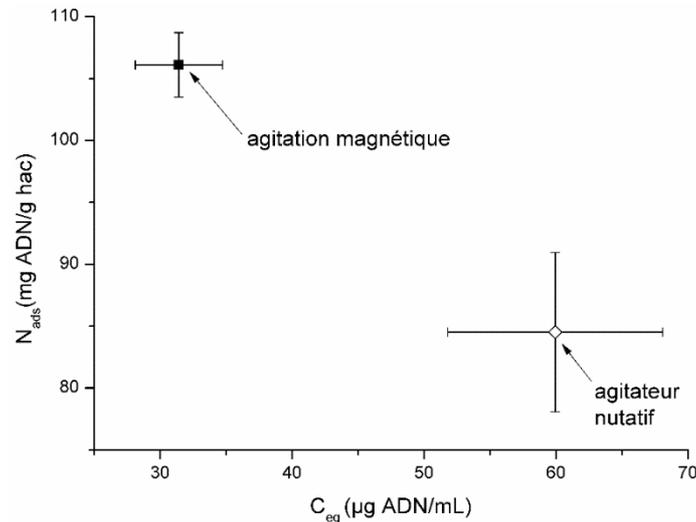
L'influence du rapport solide/solution (hac S4-ADN Trevigen®) a été à nouveau testée en absence d'agitation magnétique, en plaçant les tubes à l'horizontale après 5 minutes de sonification (bain à ultrasons), d'après le protocole décrit par Pascaud *et al* (2013) pour tester l'adsorption de biphosphonate sur apatite nanocristalline. Dans notre cas, étant donnée la nature macromoléculaire de notre adsorbat, l'effet de l'agitation est prépondérant sur le processus d'adsorption, comme illustré en Figure III-11.

Le type d'agitation a également une influence sur la quantité d'ADN adsorbé : un test préliminaire, qui se base sur la seule variation du type d'agitateur, a été mené à l'aide d'un agitateur tridimensionnel nutatif (*nutating shaker*) en comparaison au protocole d'agitation magnétique précédent. Les résultats sont représentés graphiquement en Figure III-12. L'utilisation d'un barreau aimanté favorise l'adsorption d'ADN en permettant aux molécules d'entrer en contact d'une plus grande quantité de poudre d'apatite. On peut alors considérer que l'état d'équilibre d'adsorption pour l'ensemble du composé est atteint dans le cas d'agitation magnétique : notre choix s'est donc porté sur ce type d'agitation.

D'autres paramètres mineurs ont aussi été testés, comme la taille du barreau aimanté et le type d'agitateur magnétique multiposte. Dans les deux cas, aucune différence significative n'a été observée.



**Figure III-11 Influence du rapport solide/solution à  $T_{amb}$  avec agitation magnétique constante ou horizontalisation des tubes pour 5, 10 ou 20 mg d'apatite carbonatée maturée 1 semaine (hacS4) et une solution d'ADN commercial Trevigen® concentrée à  $\sim 80 \mu\text{g/mL}$  (temps de mise en contact = 3 jours)**



**Figure III-12 Influence du type d'agitation sur la quantité d'ADN adsorbé à  $T_{amb}$  sur 10 mg d'apatite carbonatée hac S4 ( $[\text{ADN}]_{initiale} \sim 170 \mu\text{g/mL}$ ,  $V_{solution} = 7,5 \text{ mL}$ ) (temps de mise en contact = 3 jours)**

## 1.2 Influence du rapport solide/liquide

L'apatite carbonatée hac S4, plus proche du minéral osseux et dentaire, a une surface spécifique 1,5 fois plus importante que l'apatite non carbonatée hap S0, à temps de maturation égal ( $S(\text{hac S4}) = 178,7 \pm 0,2 \text{ m}^2/\text{g}$ ;  $S(\text{hap S0}) = 119,7 \pm 1,9 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Cette variation du paramètre de surface spécifique a engendré la nécessité d'optimisation par étape du protocole précédent, à la recherche d'un rapport solide/liquide adéquat, pour notamment permettre, dans des conditions optimales :

- l'évaluation de la quantité d'ADN maximale adsorbée à la surface des nanocristaux,

- une concentration d'ADN correspondant à des solutions de viscosité modérée et pour lesquelles la réponse UV (NanoDrop) est reproductible,
- une économie de réactifs (notamment ADN),
- la pesée d'une masse de poudre d'apatite nanocristalline compatible à une bonne reproductibilité (au moins 10 mg),
- un rapport solide/liquide qui permet une relation linéaire entre la quantité d'ADN adsorbé à l'équilibre et la masse d'apatite.

Pour toutes ces raisons, les conditions standards ont été fixées telles que, pour la solution d'ADN, la concentration soit comprise entre 0 et 600  $\mu\text{g/mL}$  pour un volume de 7,5 mL, et pour l'apatite, une masse de 10 mg (10 – 10,5 mg).

C'est ce protocole qui a été retenu pour, en premier lieu, le suivi de la cinétique d'adsorption de l'ADN Trevigen® sur l'apatite hac S4, puis pour la construction des isothermes d'adsorption et de désorption de l'ADN sur/à partir des nanocristaux d'apatite. L'influence de paramètres, que nous appellerons « environnementaux » (force ionique, pH, température), pouvant influencer sur des aspects quantitatifs ou qualitatifs de cette réaction d'adsorption seront également étudiés à l'aide de ce protocole.

L'ensemble de ces résultats a donné lieu à publication dans le journal *Applied Surface Science*.

## **2 Etude expérimentale de l'adsorption d'ADN de thymus de veau partiellement fragmenté sur des nanocristaux d'apatite nanocristalline, utilisée comme modèle du minéral osseux et dentinaire**

Résumé de l'article “*Adsorption of DNA on biomimetic apatites: Toward the understanding of the role of bone and tooth mineral on the preservation of ancient DNA*”, publié dans la revue *Applied Surface Science* (accepté décembre 2013, publié février 2014):

L'adsorption et la désorption d'ADN (thymus de veau Trevigen®, partiellement fragmenté, cf. section B2.3) sur l'apatite biomimétique hac S4, synthétisée et caractérisée dans le chapitre I, section B2, ont été étudiées dans le but d'apporter des éléments concrets, sur une base physico-chimique, en lien avec la préservation de l'ADN ancien dans les restes squelettiques. Pour ce travail, différentes expériences ont été réalisées en « batch » (par opposition aux expériences qui utilisent des colonnes). Dans un premier temps, la cinétique

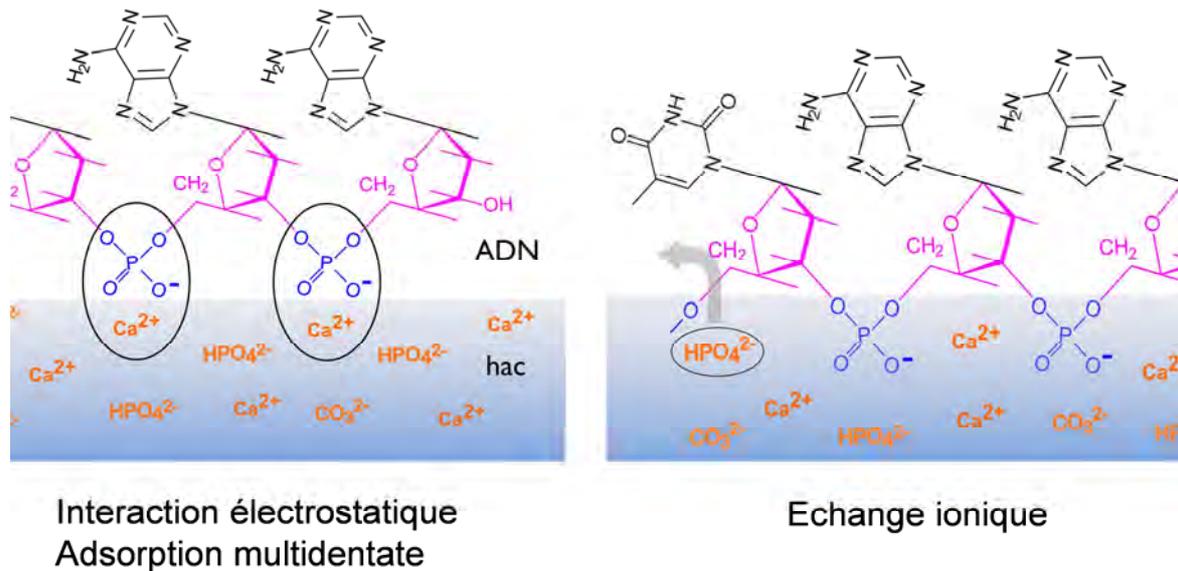
d'adsorption a été explorée, afin de déterminer l'effet du temps de contact ADN/apatite et d'établir des conditions permettant d'atteindre l'équilibre d'adsorption. Forts de ces données, nous avons alors, dans un second temps, construit des isothermes d'adsorption d'ADN, par le suivi des quantités adsorbées en fonction de la concentration en solution à l'équilibre. L'effet de facteurs environnementaux pertinents (tels que la température, la force ionique et le pH), sur le comportement d'adsorption a également été exploré.

Comme dans le chapitre I, la première partie de l'article se consacre à démontrer l'analogie entre l'apatite nanocristalline carbonatée maturée 1 semaine, utilisée dans ce travail, et les apatites biologiques (dentine, os compact).

Ensuite, plusieurs modèles cinétiques, décrits précédemment, ont été testés sur les données issues de la cinétique d'adsorption de l'ADN (pseudo-premier ordre, pseudo-second ordre, Elovich, Ritchie et modèle double-exponentiel). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le modèle cinétique d'Elovich, ceci sera détaillé dans cette publication.

Le tracé d'isothermes d'adsorption de l'ADN de thymus de veau partiellement fragmenté sur l'apatite a démontré que ces isothermes suivaient relativement bien une modélisation de type Temkin, qui est par ailleurs utilisée pour décrire le comportement d'adsorption de polyélectrolytes sur des surfaces hétérogènes.

La désorption potentielle de l'ADN, suite à une dilution du système, a ensuite été réalisée, en présence ou en absence d'ions phosphates. Pour la première fois, le caractère irréversible de l'adsorption de l'ADN suite à la dilution et la promotion de la désorption de l'ADN par l'ajout d'ions phosphate dans le milieu ont été mis en évidence, et ce de façon significative, ce qui suggère fortement un processus d'échange ionique concomitant entre les groupements phosphate anioniques de l'ADN et des ions phosphate de l'apatite (selon toutes vraisemblances, il s'agirait surtout des ions hydrogénophosphate non apatitiques labiles de la couche hydratée en surface des nanocristaux). Cependant la désorption peut également être limitée en cas d'adsorption multidentate impliquant plusieurs groupements phosphate de l'ADN. Ces deux scénarios sont représentés schématiquement dans la Figure III-13.



**Figure III-13 Scénarios possibles d'adsorption entre l'ADN et la surface de l'apatite (se référer au texte pour les détails)**

Ces conclusions, obtenues pour la première fois à notre connaissance, démontrent la forte interaction qui peut exister entre fragments d'ADN et surfaces d'apatites nanocristallines comme celles présentes au niveau des os et de la dentine. Elles viennent confirmer les observations plus empiriques, souvent évoquées par la communauté des paléogénéticiens et anthropologues, relatives à une protection de l'ADN via un phénomène d'adsorption à l'apatite présente au niveau des tissus durs. Ce travail pourrait aussi se révéler utile pour une meilleure compréhension des processus diagenétiques liés à la préservation de l'ADN dans les tissus minéralisés.





# Adsorption of DNA on biomimetic apatites: Toward the understanding of the role of bone and tooth mineral on the preservation of ancient DNA

A. Grunenwald<sup>a,b</sup>, C. Keyser<sup>b</sup>, A.M. Sautereau<sup>a</sup>, E. Crubézy<sup>c</sup>, B. Ludes<sup>b</sup>, C. Drouet<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> CIRIMAT Carnot Institute – Phosphates, Pharmacotechnics, Biomaterials, University of Toulouse, CNRS/INPT/UPS, ENSIACET, 4 allée Emile Monso, 31030 Toulouse Cedex 4, France

<sup>b</sup> Institute of Legal Medicine, AMIS Laboratory, CNRS UMR 5288, University of Strasbourg, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France

<sup>c</sup> Molecular Anthropology and Image Synthesis Laboratory (AMIS), CNRS UMR 5288, University of Toulouse, 37 allée Jules Guesde, 31000 Toulouse, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 11 October 2013

Received in revised form

10 December 2013

Accepted 11 December 2013

Available online 19 December 2013

### Keywords:

Nanocrystalline apatite

Hydroxyapatite

Ancient DNA

Polyelectrolyte adsorption

Temkin isotherm

Elovich

## ABSTRACT

In order to shed some light on DNA preservation over time in skeletal remains from a physicochemical viewpoint, adsorption and desorption of DNA on a well characterized synthetic apatite mimicking bone and dentin biominerals were studied. Batch adsorption experiments have been carried out to determine the effect of contact time (kinetics), DNA concentration (isotherms) and environmentally relevant factors such as temperature, ionic strength and pH on the adsorption behavior. The analogy of the nanocrystalline carbonated apatite used in this work with biological apatite was first demonstrated by XRD, FTIR, and chemical analyses. Then, DNA adsorption kinetics was fitted with the pseudo-first order, pseudo-second order, Elovich, Ritchie and double exponential models. The best results were achieved with the Elovich kinetic model. The adsorption isotherms of partially sheared calf thymus DNA conformed satisfactorily to Temkin's equation which is often used to describe heterogeneous adsorption behavior involving polyelectrolytes. For the first time, the irreversibility of DNA adsorption toward dilution and significant phosphate-promoted DNA desorption were evidenced, suggesting that a concomitant ion exchange process between phosphate anionic groups of DNA backbone and labile non-apatitic hydrogenphosphate ions potentially released from the hydrated layer of apatite crystals. This work should prove helpful for a better understanding of diagenetic processes related to DNA preservation in calcified tissues.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Bone and tooth remains often represent the only – but also the best – biological materials available for deoxyribonucleic acids (DNA) typing in anthropology and may additionally be exploited in forensic sciences [1,2]. In ancient samples, DNA arising from degraded cells is generally strongly fragmented, with a mean size around 200 base pairs, and its amplification may be limited by the presence of substances persisting after purification, and inhibiting PCR [3]. Although hard tissue samples are commonly used as a source of ancient DNA sequences, the processes of ancient DNA preservation in these mineralized tissues have received little systematic attention, both regarding qualitative and quantitative aspects.

Calcium phosphate apatites are the main components of human bone and teeth. The physico-chemical features of enamel highly resemble those of stoichiometric hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , both in terms of crystallographic structure and composition. In contrast, bone and dentin minerals are composed of non-stoichiometric apatite nanocrystals. Several studies have shown the possibility to prepare, under close-to-physiological conditions (temperature, pH), synthetic analogs to biological apatites that mimic their physico-chemical characteristics [4–6]. For both biological specimens and biomimetic analogs, the surface of the nanocrystals was found to exhibit a structured but metastable non-apatitic hydrated layer [7–9], containing labile ions (e.g.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ...) leading to an exceptional surface reactivity, either in terms of ionic exchanges or of molecular adsorption [10–13]. Furthermore, the possibility to control, for synthetic biomimetic apatites, the maturation state of the nanocrystals was evidenced by modifying experimental conditions such as temperature, pH or maturation time in solution [7,14,15]. These findings then enable the preparation of samples mimicking either newly formed or mature bone mineral.

\* Corresponding author at: CIRIMAT Carnot Institute, ENSIACET, 4 allée Emile Monso, 31432 Toulouse Cedex 4, France. Tel.: +33 034 32 34 11; fax: +33 034 32 34 99.

E-mail address: [christophe.drouet@ensiacet.fr](mailto:christophe.drouet@ensiacet.fr) (C. Drouet).

The role of the mineral apatitic matrix, potentially acting as a physical and a chemical barrier against DNA deterioration (through microbiological activity and environmental factors) has been widely mentioned in the literature to explain the exceptional preservation of DNA in hard tissues [16–18]. In fact, even in the absence of bacterial attack, the decay of free DNA molecules in aqueous solutions is completely achieved over few thousand years, based on spontaneous hydrolysis [17]. The presence of ancient DNA in samples aged over 600 000 years appears then consistent with the hypothesis of an adsorption of DNA fragments on bone and tooth apatitic matrix, thus limiting the possibility of chemical degradation and the accessibility of bacteria and their enzymes [19].

In another context, the ability of hydroxyapatite to adsorb DNA has been shown since 1957 for chromatographic purposes, using phosphate solutions with a concentration gradient as mobile phase [20–22]. More recently, apatites and other calcium phosphates nanoparticles have been investigated as drug carriers to deliver genetic materials to eukaryotic cells [23,24]. Okasaki et al. [25] have also examined the crystal growth of hydroxyapatite in the presence of DNA and suggested an affinity binding phenomenon based upon electrostatic interaction between negatively charged phosphate groups of the backbone of DNA and calcium ions from the apatite surface.

However, in spite of these various applications, the chemical interaction between apatites and DNA is generally assumed a priori, without an in-depth understanding of the nature of the binding mechanism involved; moreover very few quantitative data were reported to-date on apatite/DNA interactions.

The adsorption of several biological (macro)molecules other than nucleic acids (e.g. bovine serum albumin and other proteins, antibiotics, amino acids...) on synthetic biomimetic apatites has on the contrary already been the object of various works [11,12,26–28]. Interestingly, adsorption processes on biomimetic apatites was found to involve in some cases more complex mechanisms than solely based on the deposition of the molecule on the surface of the solid phase: in some instances indeed, the release of surface ions was found to occur simultaneously to the adsorption process [11,29,30]. Moreover, considerable variations of adsorption parameters are bound to be observed depending on the physico-chemical characteristics of the apatite crystals.

Based on these considerations, we report in this contribution a first physico-chemical insight on the interaction between DNA and a biomimetic apatite mimicking bone and dentin biominerals, with the goal to explain the diagenetic persistence of DNA extracted from skeletal remains. This experimental model was aimed at determining adsorption and desorption features (using calf thymus DNA as model DNA), and at comparing the obtained data with reports dealing with other biological molecules.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Synthesis of apatite analogous to dentin and bone mineral

A biomimetic carbonated apatite sample, referred to as hac-1w, was synthesized by double decomposition according to the procedure described by Rey et al. [8]. Briefly, a calcium nitrate  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  solution (52.2 g in 750 ml of deionized water) was poured at room temperature (20 °C) into a solution of ammonium hydrogenophosphate  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  and sodium bicarbonate  $\text{NaHCO}_3$  (90 g of each in 1500 ml of deionized water). The excess of phosphate in the second solution was used to buffer the pH of the solution at a close-to-physiological value, namely 7.2. Maturation in solution has then been carried out for 7 days (1 week). The pH of the medium was found to remain constant during the whole

maturation process. The suspension was then filtered on a Büchner funnel, thoroughly washed with deionized water, freeze-dried and stored in a freezer (–18 °C) so as to avoid any alteration of the apatite nanocrystals.

The apatite powder was then sieved, and the size fraction in the range of 100–200  $\mu\text{m}$  was used for all further experiments (adsorption/desorption).

### 2.2. DNA

Adsorption and desorption experiments were performed with DNA solutions prepared from sheared calf thymus DNA solutions (Trevigen). According to the manufacturer, the concentration of the mother calf thymus DNA solution is provided at 10 mg/ml in TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) with a fragment size range of 500–1000 bp.

### 2.3. Physico-chemical characterization

The chemical composition of the apatite compound synthesized was determined from titrations carried out by complexometry for the determination of the calcium content, by spectrophotometry for the total phosphate content (determination of the sum of  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{HPO}_4^{2-}$  ions, using the phospho-vanado-molybdenic method [31]) and by coulometric method (UIC, Inc. CM 5014 coulometer with CM 5130 acidification unit) for the carbonate content.

The crystal structure of the samples was checked by powder X-ray diffraction using an Inel diffractometer CPS 120 and the monochromatic  $\text{Co K}\alpha$  radiation ( $\lambda_{\text{Co}} = 1.78892 \text{ \AA}$ ).

The specific surface area,  $S_w$ , was determined using a five points BET method (nitrogen adsorption) on a Tristar II Micromeritics apparatus.

Fourier transform infrared (FTIR) analyses were performed on a Perkin Elmer 1700 spectrometer with a resolution of  $4 \text{ cm}^{-1}$ , using the KBr pellet method.

The amount of adsorbed DNA, at equilibrium, after adsorption experiments was drawn by comparison of the concentrations in DNA before and after adsorption, using the UV absorption of the band at ca. 260 nm followed by spectrophotometry (Thermo Scientific NanoDrop 2000c spectrophotometer).

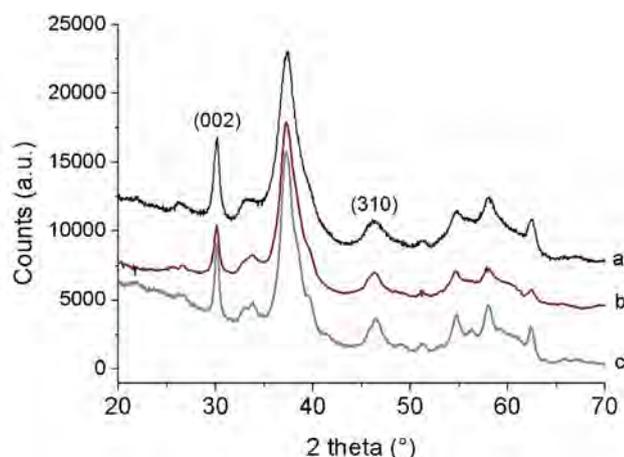
The amounts of calcium and (inorganic) phosphate ions present in the supernatants after adsorption or desorption were titrated respectively by atomic absorption (ContraAA 300, Analytik Jena) and by spectrophotometry using the phospho-vanado-molybdenic method as mentioned above. Prior to these analyses, the residual DNA molecules present in the supernatants were removed by pretreatment in acidic medium and centrifugation.

### 2.4. Adsorption and desorption experiments

For all experiments, the amount of apatite powder and volume of DNA solution (in glass flasks) were kept constant at respectively 10 mg and 7.5 ml. DNA solutions were prepared at increasing concentrations ranging from 0 to 500  $\mu\text{g}$  DNA/ml, in deionized water. This concentration range has been chosen to remain in the linear zone of Beer Lambert Law and avoid high solution viscosity, which could interfere with adsorption processes.

Adsorption kinetics was followed, at room temperature and pH 7, over a period of 4 weeks with a DNA solution of intermediate concentration (160–195  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

For the establishment of adsorption isotherms, experiments were carried out with various pH values (by adding either HCl 0.1 M or NaOH 0.1 M), ionic strengths (by adding KCl) and temperatures, under constant mild stirring. Then the mixture was centrifuged (20 min at 1850 g and the supernatant was retrieved by filtration with Acrodisc® syringe filters with nylon membrane



**Fig. 1.** XRD patterns ( $2\theta$  between  $20^\circ$  and  $70^\circ$ ) of (a) biomimetic carbonated apatite sample, hac-1w (maturation of 1 week), as compared to bone specimens: (b) rat (12 months), (c) human (man 57 y.o.).

( $0.45 \mu\text{m}$ ,  $25 \text{ nm}$ ). Each point was done in triplicate to check the reproducibility of our experimental model.

When mentioned in the text, the eventual desorption of pre-adsorbed DNA molecules was examined – in the same conditions of temperature and contact time as for the adsorption experiments – by investigating the effect of dilution by a factor 5, where 80 vol.% of the supernatant were replaced by deionized water, with or without addition of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  at a final concentration of 18 mM.

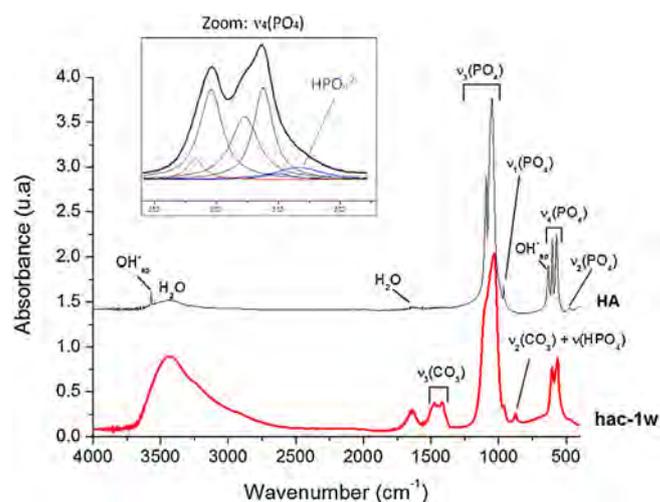
### 3. Results and discussion

#### 3.1. Physico-chemical characterization of apatite sample

The apatite sample hac-1w synthesized in this work was characterized by way of X-ray diffraction (XRD) analysis and Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy.

The XRD pattern obtained (Fig. 1) was found to be characteristic of single-phased apatite, as no secondary crystallized phase was detected. A comparison with the patterns obtained on bone specimens, namely human femur (man, 57 y.o.) and rat bone (12 months old), as illustrated in Fig. 1, confirmed the biomimetic character of the hac-1w sample. As can be noted in all cases, the patterns exhibit the features of apatite with a rather low crystallinity state characteristic of biological apatites (except for tooth enamel). The application of Scherrer's formula to diffraction lines (002) and (3 1 0), leading respectively to an estimate of the mean length and width of the apatite crystals, gave mean crystallite dimensions of 15.7 nm length and 4.9 nm width. These values are clearly in the nanometer scale thus conferring an additional element in favor of the bone- or dentin-like character of this apatite compound.

The apatite nature of the sample was also confirmed by FTIR analysis (Fig. 2). Several differences could however, as expected, be evidenced by comparison to stoichiometric hydroxyapatite (HA). In particular, the presence of carbonate absorption bands was pointed out in the case of the sample hac-1w in the ranges  $1350\text{--}1550 \text{ cm}^{-1}$  (assignable to the  $\nu_3(\text{CO}_3)$  vibration mode) and  $840\text{--}910 \text{ cm}^{-1}$  (attributable to  $\nu_2(\text{CO}_3)$ ). In contrast, absorption bands at  $3572$  and  $632 \text{ cm}^{-1}$  typical of apatitic  $\text{OH}^-$  ions are not clearly detectable on the spectrum of hac-1w (see for example inset of Fig. 2). This observation indicates that this apatite sample is largely depleted in  $\text{OH}^-$  ions. This type of nonstoichiometry is common for biological apatites (e.g. [32]), and is typically accompanied by cationic vacancies (lack of calcium ions) and the substitution of  $\text{PO}_4^{3-}$  ions by divalent  $\text{HPO}_4^{2-}$  or  $\text{CO}_3^{2-}$ . Beside the already assessed presence of carbonate species in the apatite lattice, the existence of



**Fig. 2.** FTIR spectra for biomimetic apatite (hac-1w) and for reference stoichiometric hydroxyapatite (HA) showing localization of apatitic hydroxyl ions, phosphates ions ( $\nu_1\text{--}\nu_3$ ) and carbonates ions ( $\nu_2, \nu_3$ , hac-1w only). Inset: spectral decomposition of the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  vibration domain for hac-1w in the range  $400\text{--}800 \text{ cm}^{-1}$ , revealing in particular the vibration of non-apatitic hydrogenphosphate labile ions.

$\text{HPO}_4^{2-}$  ions can indeed be established here on the basis of IR absorption appearing as a shoulder to the  $\nu_4(\text{PO}_4)$  bands, around  $535\text{--}550 \text{ cm}^{-1}$  (see inset, Fig. 2).

The chemical composition of this apatite sample was then investigated. In particular, the  $\text{Ca}/(\text{P}+\text{C})$  molar ratio of the solid was determined from the chemical titration of calcium, carbonate and orthophosphate ions, leading to the value 1.36. This  $\text{Ca}/(\text{P}+\text{C})$  ratio is noticeably lower than 1.67, which is characteristic of stoichiometric HA, and this finding confirms the nonstoichiometry of this compound already suggested by FTIR analyses.

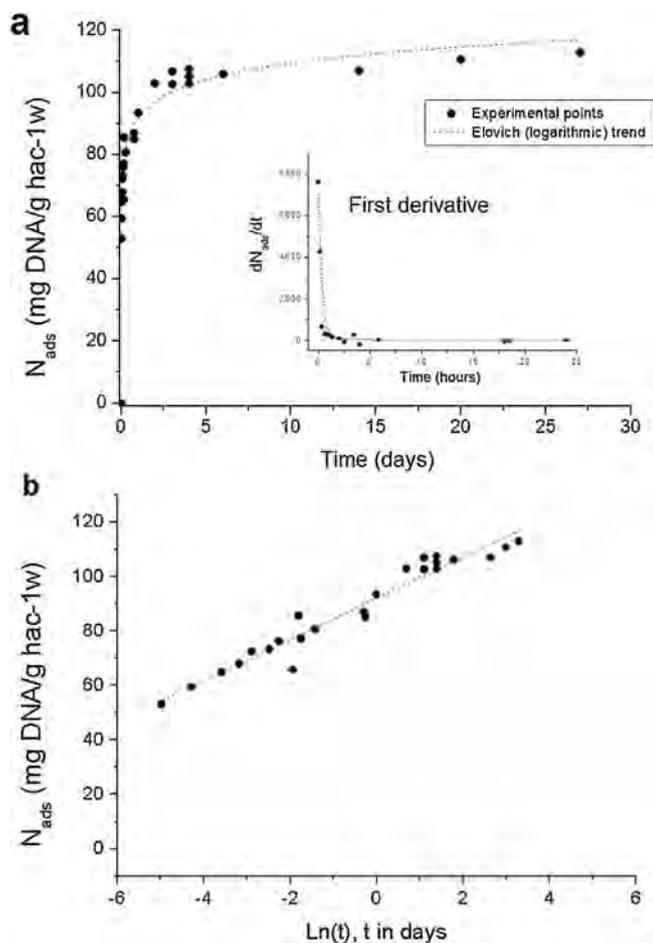
All the results reported above therefore assess the biomimetic character of the apatite sample hac-1w, with bone- or dentin-like characteristics, thus making of it an adequate substrate for DNA adsorption analyses in our context.

Taking into account the importance of the surface of apatite exposed to the DNA solution in adsorption experiments, the sample was sieved (between  $100$  and  $200 \mu\text{m}$ ) and the specific surface area of the resulting powder fraction was found to be of  $S_w = 180 \text{ m}^2/\text{g}$  as determined by nitrogen adsorption (BET measurement).

#### 3.2. Adsorption kinetics

The kinetics of adsorption of calf thymus DNA on the hac-1w biomimetic apatite sample prepared above was first followed, with the objective to determine experimental conditions allowing us to reach the thermodynamic equilibrium. To this aim, adsorption experiments were carried out (at room temperature and  $\text{pH } 7\text{--}7.5$ ) starting from DNA solutions with a concentration in the range  $160\text{--}195 \mu\text{g}/\text{ml}$ .

Fig. 3a reports the experimental data points by plotting the amount of DNA adsorbed, denoted  $N_{\text{ads}}$  (given in  $\text{mg DNA}/\text{g}$  of apatite), as a function of contact time and over a period of 4 weeks. This kinetic curve shows a steep increase of  $N_{\text{ads}}$  during the first day of contact between DNA molecules and the apatite substrate, followed by a progressive stabilization (up to about  $110\text{--}120 \text{ mg DNA}/\text{g}$  apatite for this DNA concentration range). The analysis of the first derivative (see inset on Fig. 3a) allows one to examine in more details the variation of  $N_{\text{ads}}$  during the first 24 h of apatite/DNA contact. As can be seen, the vast majority of DNA molecules appear to be adsorbed within the first 2–3 h of contact – reaching coverage of the order of 70–80% (relatively to the maximum equilibrated adsorbed amount). These findings suggest that the adsorption process is not



**Fig. 3.** Kinetics of DNA adsorption followed over 3 weeks at room temperature, neutral pH, on biomimetic apatite hac-1w. Adsorption is complete within 3 days, with a trend following Elovich's equation (dotted line): (a)  $N_{\text{ads}} = f(t)$ , inset: first derivative of first day data points showing that the adsorption process is almost complete within 3 h, (b) linear regression using Elovich's equation,  $N_{\text{ads}} = f(\ln(t))$ .

particularly hindered, during this first stage of adsorption, by steric hindrance of the DNA macromolecules at the surface of apatite nanocrystals. However, beyond this stage, such phenomena can probably contribute to the modification of slope observed (up to reaching thermodynamic equilibrium) and the rather slow evolution before final stabilization.

The shape of the adsorption kinetic curve  $N_{\text{ads}} = f(t)$  appears roughly with a logarithmic shape, and this type of variation was indeed confirmed by the rather good linearity ( $R^2 = 0.9463$ ) of the  $N_{\text{ads}} = f(\ln(t))$  plot as shown in Fig. 3b. Such a behavior is in particular representative of kinetic processes following Elovich's mathematical model [33]:

$$N_{\text{ads}} = \frac{1}{b} \ln(t + t_0) + \frac{1}{b} \ln(ab) \quad (1)$$

where " $t_0$ " (pre-Elovich period) is often found to be close to zero (which may reasonably be considered here taking into account the linearity found in Fig. 3b). This equation derives in fact from the description of the adsorption rate  $r_a = dN_{\text{ads}}/dt$ :

$$r_a = \frac{dN_{\text{ads}}}{dt} = a \cdot \exp(-b \cdot N_{\text{ads}}(t)) \quad (2)$$

Interestingly, the Elovich model was frequently considered to describe the kinetics of adsorption of (bio)molecules on heterogeneous surfaces [34,35], especially when the final stabilization is rather slow to occur (such as for example the case of the adsorption of hydrogen on mixed oxides [36]). Based on our findings, this

model thus appears to simulate rather well the adsorption of DNA on biomimetic apatite. A rather slow stabilization is indeed likely to happen here taking into account the length of the macromolecules of DNA and potential modifications of conformation upon adsorption.

Other kinetic models have however also been tested in this work in view of evaluating their potential pertinence. The general model proposed by Ritchie [37,38] was in particular tested, being based on an equation of the type:

$$\frac{d\theta}{dt} = k_n(1 - \theta)^n \quad (3)$$

where " $\theta$ " represents the coverage of the surface at time " $t$ ", and " $n$ " is the order of the reaction. Out of this general equation, two models are indeed often encountered in literature studies related to kinetics of adsorption, namely the pseudo-first order and pseudo-second order kinetic models:

$$N_{\text{ads}} = N_e \cdot [1 - \exp(-k_1 \cdot t)] \quad (\text{pseudo-first order}) \quad (4)$$

$$N_{\text{ads}} = N_e \cdot \left[ 1 - \left( \frac{1}{1 + k_2 \cdot t} \right) \right] \quad (\text{pseudo-second order}) \quad (5)$$

The application of these two types of equation to our experimental data however did not allow us to reach a satisfactory fit over the whole time range. In all cases, the fits obtained predicted a stabilization at significantly shorter contact times as compared to the experimental data. The use of a double-exponential model (DEM):

$$N_{\text{ads}} = N_e - a_1 \cdot \exp(-k_1 \cdot t) - a_2 \cdot \exp(-k_2 \cdot t) \quad (6)$$

proposed in the literature [39] for describing the rate of adsorption of two variants of nucleotides on montmorillonite also failed to simultaneously describe adequately the different stages of the kinetic adsorption curve observed in the present case (both for short and longer contact times).

The above findings thus suggest that the Elovich model remains the best model tested here, for describing satisfactorily the kinetics of adsorption of DNA macromolecules on biomimetic apatite.

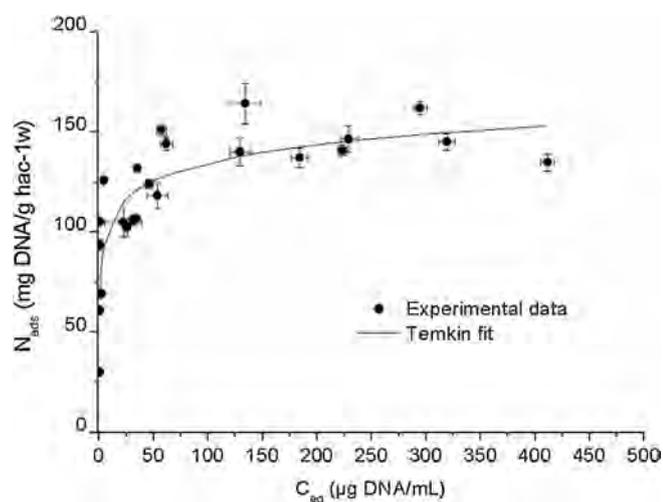
### 3.3. Adsorption isotherm and desorption study

Taking into account the preceding kinetic data, the following sub-sections will aim at establishing DNA adsorption isotherms. On the basis of the above kinetics study, an apatite/DNA contact time of 3 days has been selected for all experiments. In a first stage, the isotherm relative to so-called "reference" conditions – namely room temperature, neutral pH and deionized water medium – was determined. In subsequent steps, the potential effects of pH, ionic strength and temperature were examined for deriving general tendencies on the adsorption process.

#### 3.3.1. Reference adsorption isotherm (room temperature, neutral pH, deionized water medium)

A reference adsorption isotherm was built by measuring the amount  $N_{\text{ads}}$  of DNA adsorbed (either given in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  or in  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ) on the hac-1w carbonated nanocrystalline apatite sample (Fig. 4) as a function of the equilibrium concentration of DNA in the supernatant  $C_{\text{eq}}$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). These experiments were carried out at room temperature ( $\sim 22^\circ\text{C}$ ), neutral pH (initial value close to 7.4) and in deionized water.

The profile of this  $N_{\text{ads}} = f(C_{\text{eq}})$  curve is typical of an adsorption isotherm plot tending toward a monolayer-like coverage, with a steep increase of the adsorbed amount over a narrow range in  $C_{\text{eq}}$  followed by the obtainment of a plateau (around  $N_m \approx 160 \text{ mg}/\text{g}$ ). It may be noted however that experimental datapoints show a



**Fig. 4.** The reference adsorption isotherm of calf thymus DNA (0.75–4.5 mg, initial concentration range 40–600  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) on biomimetic carbonated apatite hac-1w (10 mg) in standard conditions (room temperature, 3 days of incubation, neutral pH) fits with Temkin logarithmic curve (straight line)

rather high dispersion, which can be related to relative heterogeneity in DNA fragment lengths and apatite particle size (despite preliminary sieving). A dispersion of physico-chemical characteristics among biological apatites is however also naturally observed in vivo due to varying status in mineral remodeling/aging states. In addition, some variability in DNA fragment length also presumably occurs in *post mortem* events. Therefore, such experimental adsorption isotherms are expected to approximate reasonably well the variability of actual diagenetic phenomena.

In order to shed some more light on the type of adsorption behavior observed here between DNA molecules and biomimetic apatite crystals, several adsorption models were tested on the basis of mathematical linearization of the data. The Langmuir model as well as two derivatives, namely Freundlich and Temkin, were successively tested by plotting  $1/N_{\text{ads}} = f(1/C_{\text{eq}})$  for Langmuir (Eq. (7)),  $\ln(N_{\text{ads}}) = f(\ln(C_{\text{eq}}))$  for Freundlich (Eq. (8)) and  $N_{\text{ads}} = f(\ln(C_{\text{eq}}))$  for Temkin (Eq. (9)), referring to the isotherm equations:

$$N_{\text{ads}} = N_m \left( \frac{K_L \cdot C_{\text{eq}}}{1 + K_L \cdot C_{\text{eq}}} \right) \quad (7)$$

$$N_{\text{ads}} = K_F \cdot C_{\text{eq}}^{1/n} \quad (8)$$

$$N_{\text{ads}} = B \cdot \ln(A) + B \cdot \ln(C_{\text{eq}}) \quad (9)$$

where  $K_L$ ,  $N_m$ ,  $K_F$ ,  $n$ ,  $A$  and  $B$  are the corresponding constants (at fixed temperature).

After fitting our data to each of these three equations (see Table 1), only a poor fit was found with the Langmuir equation (correlation  $R^2$  coefficient  $\sim 0.20$ ), thus strongly suggesting that the associated hypotheses of this model (unique heat of adsorption for all adsorption sites, no interaction between adsorbate molecules) do not strictly apply here. In contrast, a significantly better fit ( $R^2 > 0.5$ ) was found for the other two models, i.e. Freundlich and

**Table 1**  
Adsorption parameters and correlation coefficients calculated according to the theoretical models tested in this work.

Adsorption model	Fitted adsorption parameters	Correlation coeff.
Langmuir	$N_m = 114.9 \text{ mg/g}$	$R^2 = 0.201$
Freundlich	$K_F = 74.66 \text{ mg/g}(\text{ml}/\mu\text{g})^n$	$R^2 = 0.561$
Temkin	$A = 450.078 \text{ ml}/\mu\text{g}$	$R^2 = 0.671$

Temkin, which take into account heterogeneous heats of adsorption (the latter being related to the local affinity of surface sites for specific molecular functional group). In particular, the best agreement was found with the Temkin model ( $R^2$  coefficient close to 0.67), which theoretically supposes a proportional variation of adsorption enthalpies as a function of the coverage. These results can be paralleled to literature results dealing with the adsorption of ionic adsorbents on heterogeneous surfaces [40–43], where Temkin isotherm was also often linked to an Elovich-type kinetic model.

Fig. 4 points out a situation where the maximal DNA coverage reached on our apatitic substrate hac-1w is close to 160 mg/g. Although it appears appealing to compare this adsorption parameter with reported values measured on apatites for other molecules, it should be reminded here that care should be taken for such comparisons since such substrates probably do not exhibit the same surface features, due to different synthesis histories. Indeed, it was previously suggested that the apatite maturation stage (leading to modified surface and bulk characteristics [15]) may have a direct significant influence on adsorption processes [11,12,26,29]. Also, when DNA macromolecules are involved, it appears difficult to express the adsorbed amounts in terms of moles (rather than grams) due to the polydispersity of the molecular weight of DNA fragments (typically in the range 10–1000 bp in our case). In the hypothesis of a sample made of an average of 500 bp, an approximated value for DNA molecular weight would be 330 kDa; therefore the measured  $N_m$  value of 160 mg/g would be equivalent to about 0.49  $\mu\text{mol}/\text{g}$ . For information only, the maximum adsorbed amount of another macromolecule – bovine serum albumin – on a nanocrystalline apatite substrate (non-carbonated but with a rather similar maturation state) reached 11.4  $\mu\text{mol}/\text{g}$  (764 mg/g) [12].

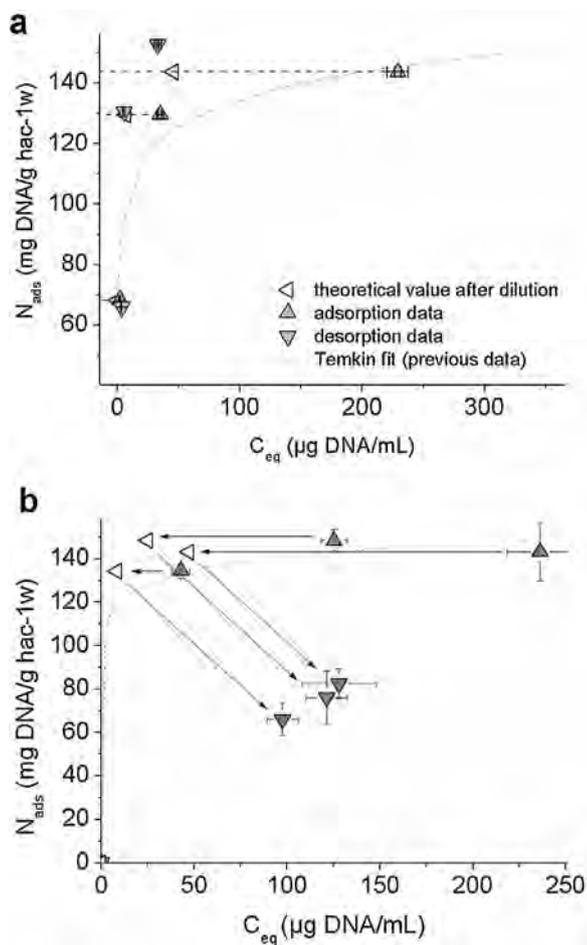
Based on a Temkin-like behavior, the logarithmic fit of experimental datapoints was added in Fig. 4. Although care should be taken at this stage for drawing conclusive statements on the distribution of surface sites for DNA adsorption, these findings suggest an evolution of the anchoring behavior of DNA macromolecules along the adsorption process (i.e. upon coverage increase), which may in turn be related to their 3D conformation(s).

### 3.3.2. Desorption study

In order to shed some more light on the adsorption mechanism for such DNA/apatite systems, the potential displacement of DNA macromolecules out of the apatitic surface (desorption) was investigated by following the effect of dilution on the residual adsorbed amount.

A first set of experiments was carried out by performing a dilution by a factor 5 in deionized water, and the results are reported on Fig. 5a. Interestingly, as is shown in this figure, the data essentially indicate the absence of desorption in such conditions. These findings may probably be paralleled with previous works on the adsorption of bisphosphonate on apatites [11,29] where the absence of desorption upon dilution was also evidenced (pointing out a non-reversible adsorption process associated to a genuine “anchoring” of the molecules on the surface of the substrate). In the case of bisphosphonates, this non-reversibility was related by the authors to the release of phosphate ions from the solid surface simultaneously to the molecular grafting process via a phosphate end-group.

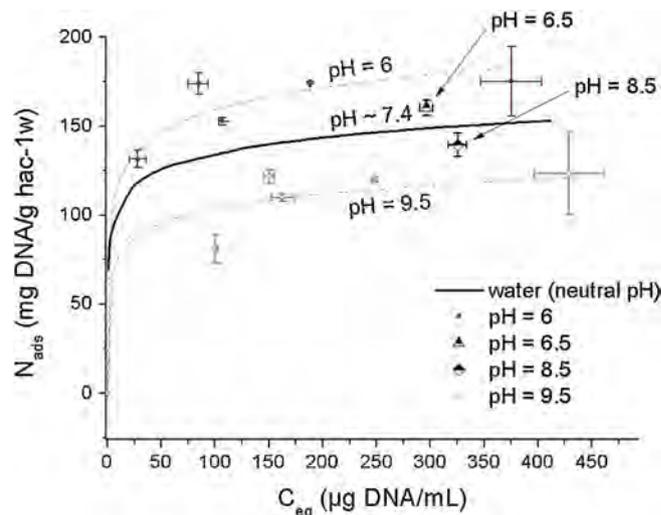
In the present case, the lack of significant desorption upon dilution could possibly be related to a rather similar scenario, where anionic phosphate groups from the DNA backbone may interact with phosphate ions from the surface of the nanocrystals. Calcium and phosphate ions were titrated from adsorption supernatants (retrieved after adsorption experiments for various increasing values of  $C_{\text{eq}}$ ) as well as in a “blank” experiment carried out in similar conditions but in the absence of DNA. In all



**Fig. 5.** Effect of dilution in (a) deionized water or (b) in the presence of phosphate ions ( $[P] = 18 \text{ mM}$ , pH 7, on the adsorption of DNA on biomimetic apatite. (a) After 3 d of adsorption, 80% of the solution was replaced with deionized water (dilution step) for 3 more days: the “desorption” data points do not follow the isotherm despite the dilution of the medium,  $N_{\text{ads}}$  remaining essentially unchanged for each point, indicating the quasi-absence of DNA desorption. (b) Same experiment with dilution by neutral phosphate solution. Partial desorption of ca. 30–50% of DNA is observed after 3 days.

cases, our results indicated the presence of both types of ions in solution, and in increasing amounts as a function of the adsorbed amount, with a concentration range of phosphorus and calcium in the supernatants, respectively between ca. 0.3–0.8 mmol/l and 0.4–1.3 mmol/l (data not shown). These findings could hypothetically be attributed to the (partial) dissolution of the apatitic substrate and/or to the release of ions from the surface due to the adsorption process itself. The concomitant presence of both calcium cations and phosphate anions, however, strongly supports at least some extent of apatite dissolution. At this point, it is difficult to differentiate between the two types of contributions (dissolution-related or adsorption-related); especially taking into account the non-congruence of dissolution processes for nonstoichiometric apatites [29,30].

Additional “desorption” tests were nonetheless run in the presence of phosphate ions in the medium (by addition of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , see Section 2), while keeping the pH value neutral. Remarkably, in this case, the residual adsorbed amounts were systematically found to sharply decrease (Fig. 5b). This type of behavior was previously observed for example for bisphosphonates [44] where the adsorption process was accompanied by a release of phosphate ions. Taking all these statements in consideration, and although additional investigation dedicated to these aspects (e.g. to the



**Fig. 6.** Effect of pH on the adsorption process in standard conditions of DNA onto biomimetic nanocrystalline carbonated apatite ( $6 < \text{pH} < 9.5$ ).

incongruence of apatite dissolution) will be needed, our data suggest in the present case that phosphate ions compete with DNA molecules for surface sites of apatite crystals.

### 3.3.3. Effect of pH on DNA adsorption

The maximum adsorption amount  $N_m$  of DNA onto the poorly crystalline biomimetic apatite sample hac-1w was then followed (still at  $22^\circ\text{C}$ ) as a function of the initial pH of the medium (in the range 6–9.5). Indeed, pH may presumably play a non-negligible role in adsorption processes involving ionic crystals such as apatites. Also, pH may also vary upon *post mortem* conditions.

As shown in Fig. 6, the value of  $N_m$  was found to increase upon acidification (ca. +13% at pH 6) of the medium, and conversely to decrease upon alkalization (ca. –23% at pH 9.5). Several factors may potentially come into play for explaining this behavior. In particular, partial apatite (surface) dissolution is expected to increase upon acidification [45], thus modifying exposed surface characteristics. To a lesser extent, acidification could be seen as a means to facilitate the release of  $\text{HPO}_4^{2-}$  ions from the surface of apatite nanocrystals, as these ions are known to be the predominant form of phosphate ions on such surfaces [46,47]. In turn, such an increased mobility of  $\text{HPO}_4^{2-}$  ions could then facilitate the anchoring of DNA phosphate groups onto the surface of the crystals (see discussion in Section 3.3.2). Another potential explanation for this pH effect on  $N_m$  could be related to a change in DNA conformation upon acidification/alkalinization, thus modifying the profile of the grafted molecules. In contrast it appears that these pH effects may not be related to the speciation of the phosphate groups (main ionization site of double-stranded DNA) from the DNA backbone. Indeed, their  $\text{pK}_a$  value of ca. 1.5 [48] points to a situation where these phosphate groups are ionized for any  $\text{pH} > 1.5$ .

It is interesting to remark however that the experimental pH values of the media after adsorption (data not shown) showed the general tendency to evolve toward neutrality, independently of the initial pH value (whether acidic or alkaline). This effect may be both due (1) to a surface equilibration phenomenon of the apatite crystal surface and (2) to the adsorption process itself leading to phosphate ion release, as indicated in the previous sub-section. Indeed, the release of phosphate ions (which are mostly protonated on the surface of biomimetic apatites, namely either  $\text{HPO}_4^{2-}$  or  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) in a medium exhibiting a pH value between ca. 5 and 10 is expected to evolve toward neutralization due to the buffering effect of the  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  acido-basic couple ( $\text{pK}_a = 7.2$ ) [49].

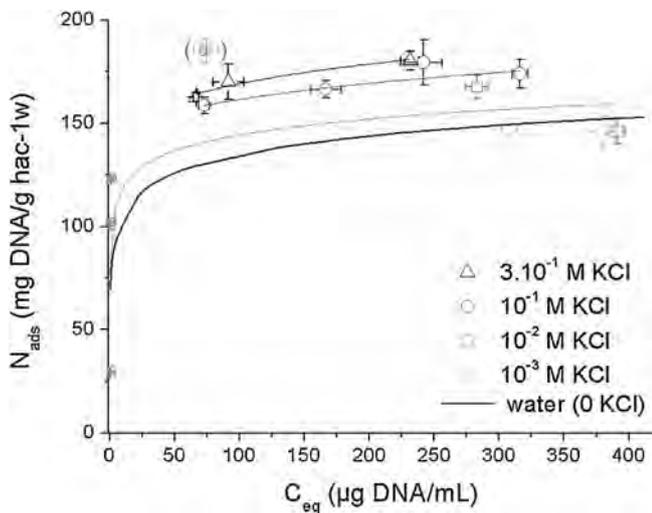


Fig. 7. Effect of ionic strength on DNA adsorption with increasing amount of KCl (0–300 mM) in standard conditions.

In the diagenetic context, our observations of the role of pH on the adsorbed DNA amounts on biomimetic apatite may incite one to hastily conclude on a “positive” effect of acidic environments on DNA preservation; however it should be kept in mind that apatitic substrates are bound to degrade faster in such conditions, thus not favoring long-term DNA preservation [17,50].

### 3.3.4. Role of ionic strength

The influence of the overall salinity of the solution (varied here by incorporation of various amounts of KCl in the adsorption medium, with  $[KCl] = 1\text{--}300\text{ mM}$ ) was also checked at  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Indeed, ionic strength is another parameter likely to influence adsorption processes [51], as well as DNA decay [52]. The obtained data (see main trends on Fig. 7) indicate a clear tendency toward increasing DNA adsorbed amounts when increasing the ionic strength of the medium.

These findings could be linked to a decrease in inter-molecular interaction, thus facilitating the adsorption process onto apatite crystals surfaces. Again, a variation in DNA conformation may play a role in these observations. The impact of the concentration in DNA of a given solution on its conformation and on molecular inter-penetration was addressed in past studies [53,54]. In the present case – as well as in usual diagenetic processes – the density of DNA molecules is however expected to be rather limited, thus corresponding to “dilute” systems rather than highly concentrated ones: in these conditions, each molecule may thus have a tendency to act as a separate entity, as suggested by Tomic et al. [54]. It should also be added that the “critical role of counterion valence in modulating inter-polyion forces” has been recently underlined, especially in the case of DNA macromolecules [54–56]. This may thus complicate further the understanding and modeling of DNA molecular dynamics under modified salinity conditions; and additional data are probably needed on this field prior to draw mechanistic conclusions on the effect of ionic strength on DNA conformation and consequently on adsorption. Nevertheless, our experimental data, obtained in the presence of KCl, point out a measurable impact on adsorption capabilities of DNA on biomimetic apatite, thus suggesting that salinity should be considered as a non-negligible influential parameter in such adsorption processes.

### 3.3.5. Role of temperature

The effect of temperature on DNA adsorption on the hac-1w sample was then examined. In view of shedding some light on

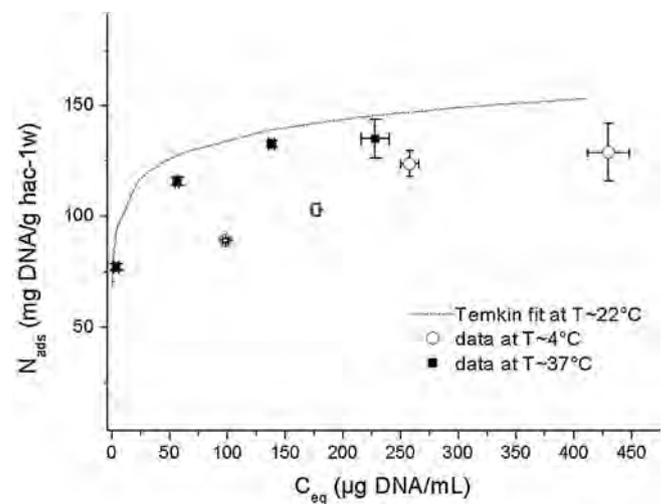


Fig. 8. Effect of temperature on DNA equilibrium adsorption of at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (5 d incubation) and at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (3 d incubation). For comparison, the Temkin fit at room temperature is also shown

the effect of temperature on DNA adsorption on apatite, datapoints were obtained at three temperatures covering a wide range between body temperature and near-permafrost temperature, namely  $37$ ,  $22$  and  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and the results are reported in Fig. 8. As may be noticed, the values of  $N_{\text{ads}}$  obtained at  $22$  or  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  do not differ drastically, in contrast to data corresponding to  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Such “cold” conditions (during the adsorption process) indeed lead to noticeably lower amounts of adsorbed DNA, for a given DNA concentration at equilibrium. The isotherm obtained at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  also appears to display a different profile compared to “warmer” conditions, and linearization tests corresponding to the Temkin, Freundlich or Langmuir models indicated in this case a better correlation with the latter model (correlation coefficient  $R^2 = 0.8515$  for Langmuir as opposed to  $0.7832$  and  $0.7583$  respectively for Freundlich and Temkin). This observation then points out some modifications in the type of molecule/molecule and/or of molecule/substrate interactions in such a colder situation. It is however difficult, at this stage, to propose a more advanced modeling for this phenomenon as additional information would be needed for instance on the evolution of the surface reactivity (e.g. exchangeability of  $\text{HPO}_4^{2-}$  surface ions) of apatitic substrates versus temperature.

## 4. Concluding remarks

The present contribution aimed at shedding some light, for the first time on a physico-chemical point of view, on the type of interaction existing between biomimetic apatites and DNA macromolecules, or relevance both in forensic and anthropologic contexts.

Our experimental findings strongly support the general empirical hypothesis, often emitted in the ancient DNA community, after which DNA strands could interact with apatite found in hard tissues thus considerably limiting its degradation with time. The study of the kinetics of DNA adsorption on a synthetic biomimetic apatite sample showed that the data could be adequately fitted to an Elovichian equation, often found for rather slow adsorption processes. The shape of the adsorption isotherms obtained in various conditions was found to be satisfactorily described by the Temkin model (except at low temperature). The effect of pH, ionic strength and temperature on the adsorbed amounts has been explored, suggesting the non-negligible role of environmental parameters

(at least during the adsorption stage). Although a “simple” dilution of the medium did not provoke the desorption of DNA, thus suggesting a strong binding affinity of DNA for apatitic surfaces, the addition of phosphate ions was found to promote the release of the macromolecules (pointing out a competition for surface sites between DNA phosphate groups and inorganic phosphate ions).

This study is intended to help understanding diagenetic processes undergone by DNA in skeletal remains, and also to better apprehend the interactions that DNA may undertake with apatitic substrates from which it is retrieved. More advanced knowledge on such interactions may also allow one to optimize, in turn, DNA extraction procedures.

The dedicated analysis of the solids after DNA adsorption and the exploration of the interaction of shorter DNA fragments with apatitic substrates represent upcoming perspectives for this work, and will be the object of future complementary studies.

## Acknowledgements

This research was supported by the Institute of Ecology and Environment (INEE) and the Institute of Chemistry (INC) of the French National Centre for Scientific Research (CNRS).

## References

- [1] T. Delabarde, C. Keyser, A. Tracqui, D. Charabidze, B. Ludes, The potential of forensic analysis on human bones found in riverine environment, *Forensic Sci. Int.* 228 (2013) e1–e5.
- [2] C. Keyser, C. Bouakaze, E. Crubézy, V.G. Nikolaev, D. Montagnon, T. Reis, et al., Ancient DNA provides new insights into the history of south Siberian Kurgan people, *Hum. Genet.* 126 (2009) 395–410.
- [3] C. Keyser-Tracqui, B. Ludes, Methods for the study of ancient DNA, *Methods Mol. Biol.* 297 (2005) 253–264.
- [4] N. Nassif, F. Martineau, O. Syzgantseva, F. Gobeaux, M. Willinger, T. Coradin, et al., In vivo inspired conditions to synthesize biomimetic hydroxyapatite, *Chem. Mater.* 22 (2010) 3653–3663.
- [5] A.S. Posner, F. Betts, Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure, *Acc. Chem. Res.* 8 (1975) 273–281.
- [6] C. Rey, Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties, *Biomaterials* 11 (1990) 13–15.
- [7] E.D. Eanes, J.L. Meyer, The maturation of crystalline calcium phosphates in aqueous suspensions at physiologic pH, *Calcif. Tissue Res.* 23 (1977) 259–269.
- [8] C. Rey, A. Hina, A. Tofghi, M.J. Glimcher, Maturation of poorly crystalline apatites: chemical and structural aspects in vivo and in vitro, *Cells Mater.* 5 (1995) 345–356.
- [9] C. Rey, J. Lian, M. Grynaps, F. Shapiro, L. Zylberberg, M.J. Glimcher, Non-apatitic environments in bone mineral: FT-IR detection, biological properties and changes in several disease states, *Connect. Tissue Res.* 21 (1989) 267–273.
- [10] S. Cazalbou, D. Eichert, X. Ranz, C. Drouet, C. Combes, M.F. Harmand, et al., Ion exchanges in apatites for biomedical application, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 16 (2005) 405–409.
- [11] F. Errassifi, A. Menbaoui, H. Autefage, L. Benaziz, S. Ouizat, V. Santran, et al., Adsorption on apatitic calcium phosphates: applications to drug delivery, in: R. Narayan, J. McKittrick (Eds.), *Advances in Bioceramics and Biotechnologies*, American Ceramic Society, Westerville, 2010, pp. 159–174.
- [12] S. Ouizat, A. Barroug, A. Legroui, C. Rey, Adsorption of bovine serum albumin on poorly crystalline apatite: influence of maturation, *Mater. Res. Bull.* 34 (1999) 2279–2289.
- [13] A.S. Posner, The structure of bone apatite surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* 19 (1985) 241–250.
- [14] S. Cazalbou, C. Combes, D. Eichert, C. Rey, M.J. Glimcher, Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo, *J. Bone Miner. Metab.* 22 (2004) 310–317.
- [15] N. Vandecandelaere, C. Rey, C. Drouet, Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (2012) 2593–2606.
- [16] M.J. Collins, C.M. Nielsen-Marsh, J. Hiller, C.I. Smith, J.P. Roberts, R.V. Prigodich, et al., The survival of organic matter in bone: a review, *Archaeometry* 44 (2002) 383–394.
- [17] T. Lindahl, Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature* 362 (1993) 709–715.
- [18] N. Tuross, The biochemistry of ancient DNA in bone, *Experientia* 50 (1994) 530–535.
- [19] L. Orlando, A. Ginolhac, G. Zhang, D. Froese, A. Albrechtsen, M. Stiller, et al., Recalibrating *Equus* evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse, *Nature* 499 (2013) 74–78.
- [20] G. Bernardi, Chromatography of nucleic acids on hydroxyapatite, *Nature* 206 (1965) 779–783.
- [21] R.K. Main, M.J. Wilkins, L.J. Cole, Partial chromatographic separation of pentose- and deoxypentose nucleic acids, *Science* 129 (1959) 331–332.
- [22] T. Watanabe, K. Makitsuru, H. Nakazawa, S. Hara, T. Suehiro, A. Yamamoto, et al., Separation of double-strand DNA fragments by high-performance liquid chromatography using a ceramic hydroxyapatite column, *Anal. Chim. Acta* 386 (1999) 69–75.
- [23] F.L. Graham, A.J. van der Eb, A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA, *Virology* 52 (1973) 456–467.
- [24] M. Jordan, A. Schallhorn, F.M. Wurm, Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation, *Nucleic Acids Res.* 24 (1996) 596–601.
- [25] M. Okazaki, Y. Yoshida, S. Yamaguchi, M. Kaneno, J.C. Elliott, Affinity binding phenomena of DNA onto apatite crystals, *Biomaterials* 22 (2001) 2459–2464.
- [26] H. Autefage, F. Briand-Mésange, S. Cazalbou, C. Drouet, D. Fourmy, S. Gonçalves, et al., Adsorption and release of BMP-2 on nanocrystalline apatite-coated and uncoated hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate porous ceramics, *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* 91B (2009) 706–715.
- [27] L. Benaziz, A. Barroug, A. Legroui, C. Rey, A. Lebugle, Adsorption of O-phospho-L-serine and L-serine onto poorly crystalline apatite, *J. Colloid Interface Sci.* 238 (2001) 48–53.
- [28] D.N. Misra, Adsorption and orientation of tetracycline on hydroxyapatite, *Calcif. Tissue Int.* 48 (1991) 362–367.
- [29] P. Pascaud, P. Gras, Y. Coppel, C. Rey, S. Sarda, Interaction between a bisphosphonate, tiludronate, and biomimetic nanocrystalline apatites, *Langmuir* 29 (2013) 2224–2232.
- [30] H. Tanaka, K. Miyajima, M. Nakagaki, S. Shimabayashi, Incongruent dissolution of hydroxyapatite in the presence of phosphoserine, *Colloid Polym. Sci.* 269 (1991) 161–165.
- [31] A. Gee, V.R. Deitz, Determination of phosphate by differential spectrophotometry, *Anal. Chem.* 25 (1953) 1320–1324.
- [32] R. Legros, Apport de la physico-chimie à l'étude de la phase minérale des tissus calcifiés (Thèse d'État), Institut national polytechnique, 1984.
- [33] M.J.D. Low, Kinetics of chemisorption of gases on solids, *Chem. Rev.* 60 (1960) 267–312.
- [34] C. Aharoni, F.C. Tompkins, Kinetics of adsorption and desorption and the Elovich equation, in: H. Pines, P.B. Weisz, D.D. Eley (Eds.), *Advances in Catalysis*, Academic Press, 1970, pp. 1–49.
- [35] F.-C. Wu, R.-L. Tseng, R.-S. Juang, Characteristics of Elovich equation used for the analysis of adsorption kinetics in dye-chitosan systems, *Chem. Eng. J.* 150 (2009) 366–373.
- [36] J.M. Thomas, W.J. Thomas, *Principles and Practice of Heterogeneous Catalysis*, VCH, New York, USA, 1996.
- [37] C. Cheung, J. Porter, G. McKay, Sorption kinetic analysis for the removal of cadmium ions from effluents using bone char, *Water Res.* 35 (2001) 605–612.
- [38] A.G. Ritchie, Alternative to the Elovich equation for kinetics of adsorption of gases on solids, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 73 (1977) 1650–1653.
- [39] L. Sciascia, M.L. Turco Liveri, M. Merli, Kinetic and equilibrium studies for the adsorption of acid nucleic bases onto K10 montmorillonite, *Appl. Clay Sci.* 53 (2011) 657–668.
- [40] J.O. Bockris, K.T. Jeng, In-situ studies of adsorption of organic compounds on platinum electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 330 (1992) 541–581.
- [41] G. Skodras, I. Diamantopoulou, G. Pantoleonos, G.P. Sakellariopoulos, Kinetic studies of elemental mercury adsorption in activated carbon fixed bed reactor, *J. Hazard. Mater.* 158 (2008) 1–13.
- [42] S. Trasatti, L. Formaro, Kinetics and mechanism of the adsorption of glycolaldehyde on a smooth platinum electrode, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 17 (1968) 343–364.
- [43] M.A. Vannice, *Kinetics of Catalytic Reactions*, Springer, New York, 2005.
- [44] F. Errassifi, Mécanismes d'adsorption du risédronate par des phosphates de calcium biologiques: applications aux biomatériaux, *Faculté des Sciences Sémala-Marrakech*, 2011.
- [45] J.C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier Science & Technology, Amsterdam, 1994.
- [46] C. Rey, M. Shimizu, B. Collins, M.J. Glimcher, Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age: 2. Investigations in the  $\nu_3$  PO<sub>4</sub> domain, *Calcif. Tissue Int.* 49 (1991) 383–388.
- [47] C. Rey, M. Shimizu, B. Collins, M.J. Glimcher, Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium-phosphate in bone and enamel, and their evolution with age: 1. Investigations in the  $\nu_4$  PO<sub>4</sub> domain, *Calcif. Tissue Int.* 46 (1990) 384–394.
- [48] J.A.V. Butler, *Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry*, Pergamon Press, London, 1951.
- [49] G. Charlot, *L'analyse qualitative et les réactions en solution*, Masson, Paris, France, 1963.
- [50] R. Bollongino, A. Tresset, J.-D. Vigne, Environment and excavation. Pre-lab impacts on ancient DNA analyses, *C. R. Palevol.* 7 (2008) 91–98.
- [51] D.N. Misra, *Adsorption on and Surface Chemistry of Hydroxyapatite*, Springer, New York, 1984.
- [52] T. Lindahl, B. Nyberg, Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid, *Biochemistry (Mosc.)* 11 (1972) 3610–3618.

- [53] A.V. Dobrynin, M. Rubinstein, Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces, *Prog. Polym. Sci.* 30 (2005) 1049–1118.
- [54] S. Tomić, D. Grgičin, T. Ivek, T. Vuletić, S. Dolanski Babić, R. Podgornik, Dynamics and structure of biopolyelectrolytes in repulsion regime characterized by dielectric spectroscopy, *Phys. B: Condens. Matter* 407 (2012) 1958–1963.
- [55] A. Naji, M. Kanduc, R.R. Netz, R. Podgornik, Exotic electrostatics: unusual features of electrostatic interactions between macroions, *ArXiv Prepr*, 2010 arXiv:1008.0357.
- [56] R.W. Wilson, V.A. Bloomfield, Counterion-induced condensation of deoxyribonucleic acid. A light-scattering study, *Biochemistry (Mosc.)* 18 (1979) 2192–2196.



### 3 Expériences additionnelles

#### 3.1 Essai de désorption en milieu acide

Dans la publication, nous évoquons l'étude de la désorption par simple dilution, éventuellement avec ajout d'ions phosphates (sous forme de sel  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  solubilisé) dans le milieu de désorption. Dans ce cas, le pH du milieu avait été systématiquement ramené à la neutralité. Il apparaissait également intéressant de suivre le phénomène de désorption en présence d'ions phosphates mais sans rectification de pH, et donc dans un milieu demeurant acide (pH~5,5). Pour cela, une étude additionnelle de la désorption de l'ADN à partir des nanocristaux d'apatite hac S4 a donc été menée ici en remplaçant, pour les trois points étudiés, 80% du surnageant issu de l'expérience d'adsorption, par une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ([P] = 20mM, pH 5,5). Les temps de contact pour atteindre l'équilibre en adsorption et en désorption sont équivalents. Sur la Figure III-14, les notations SF1, 2 et 3 représentent trois concentrations d'ADN initiales décroissantes (solutions filles), qui ont mené :

- lors de la réaction initiale d'adsorption, à des quantités d'ADN adsorbé de 141,9 ; 140,1 et 124,2 mg ADN/g hac,
- après dilution, à des quantités d'ADN adsorbé de 168,7 ; 158,3 et 130,6 mg ADN/g hac respectivement.

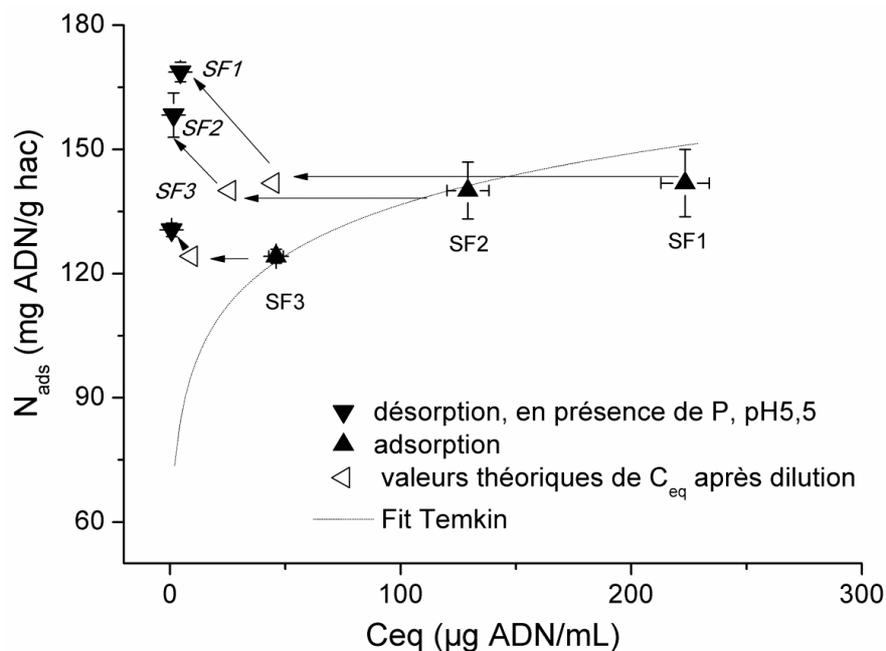


Figure III-14 Isothermes d'adsorption et de « désorption » à  $T_{\text{amb}}$  (ADN Trevigen®, hac S4), par dilution par 5 en présence d'une solution de phosphate ([P]=20 mM, pH5,5) pour trois points de l'isotherme SF1, SF2 et SF3 (normal : adsorption ; *italique*, désorption)

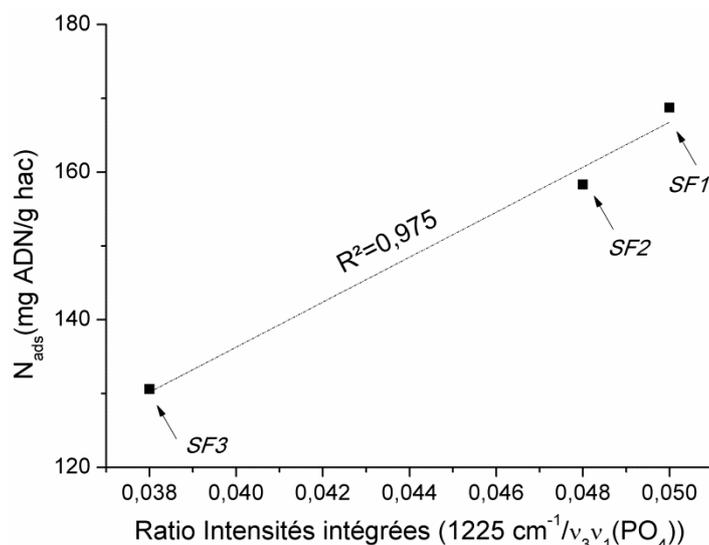
Malgré la dilution d'un facteur 5 du milieu réactionnel, l'acidification a déplacé l'équilibre d'adsorption en faveur d'une augmentation de la quantité d'ADN adsorbé (Figure III-14), ce qui traduit alors, dans ces conditions de pH, une redistribution de l'ADN entre le solide et la solution (les données vérifient, comme attendu, le respect du bilan de matière global).

De façon intéressante, les données d'adsorption d'ADN sur hac S4 à pH6 (cf. publication) concordent bien avec ces données issues de l'isotherme de « désorption » à pH5,5, en présence de phosphate. Dans les conditions de l'isotherme menée à pH6, une augmentation de la quantité maximale d'ADN adsorbé (de 150 à ~180 mg ADN/g hac) a également été observée et expliquée par la modification de la surface des nanocristaux à un tel pH. Les mêmes raisons pourraient être invoquées ici. Ces modifications n'ont cependant pas été détectées sur les spectres FTIR des poudres d'apatite après adsorption.

## **1.1 Eléments de caractérisation du solide**

### **3.1.1 Réponse infrarouge de l'ADN**

L'analyse FTIR des poudres d'apatite ayant subi le traitement précédent (adsorption d'ADN et dilution à pH acide en présence de phosphate) a néanmoins permis d'établir une bonne corrélation ( $R^2=0,975$ ) entre la réponse infrarouge des groupements phosphate de l'ADN, qui sont visibles entre 1220 et 1225  $\text{cm}^{-1}$  (Mello et Vidal, 2012), et la quantité d'ADN adsorbé estimée à partir de la concentration résiduelle en solution (voir Figure III-15). La détermination par FTIR de la quantité d'ADN adsorbée utilise la vibration d'étirement antisymétrique ( $\nu_{\text{as}}$ ) des groupements  $\text{PO}_2^-$  impliqués dans les liaisons phosphodiester.



**Figure III-15** Corrélation entre la quantité d'ADN adsorbé  $N_{ads}$  et le ratio des aires sous la courbe de la bande à  $1225\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{as}(\text{PO}_2)$  de l'ADN) et de la  $\nu_3\nu_1(\text{PO}_4)$  pour les trois points de l'isotherme de désorption SF1, SF2 et SF3 (cf. Figure III-14)

D'après la littérature, des changements de la conformation de l'ADN ont pu être mis en évidence par FTIR, dans le domaine  $1550\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ , suite à son adsorption à des particules de montmorillonite (Cai *et al.*, 2008). Dans notre cas, ces modifications éventuelles ne peuvent pas être estimées en raison de la carbonatation de notre composé apatitique, qui s'exprime notamment par les vibrations de la  $\nu_3(\text{CO}_3)$  dans ce même domaine.

### 3.1.2 Maturation différentielle en présence d'ADN

D'autres variations dans les spectres infrarouges des échantillons analysés précédemment (adsorption d'ADN et dilution à pH acide en présence de phosphate) ont attiré notre attention. Il s'agit en particulier de l'apparition, de façon plus ou moins marquée, des bandes de vibration liées aux ions  $\text{OH}^-$  apatitiques sur les échantillons de contrôle (« blanc », sans ADN), qui n'apparaissent pas sur les spectres des apatites qui n'ont pas été en contact avec l'ADN lors de l'adsorption et de la désorption. L'hydroxylation de l'apatite peut être mise en évidence par l'apparition de vibrations attribuables aux ions  $\text{OH}^-$  apatitiques, à  $3572\text{ cm}^{-1}$  et à  $631\text{ cm}^{-1}$ , visibles respectivement sur la Figure III-16 et la Figure III-17. Le même phénomène est observé, dans une moindre mesure, à pH neutre. Ces motifs d'hydroxylation ne sont en revanche *jamais* observés pour les solides après adsorption de fragments d'ADN. Par ailleurs, la seconde figure montre également une diminution de la teneur en  $\text{HPO}_4^{2-}$  pour les blancs, contrairement aux composés sur lesquels de l'ADN est adsorbé, ce qui peut être noté par la

décroissance de l'épaulement sur la vibration  $\nu_4\text{PO}_4$  localisé vers  $530\text{ cm}^{-1}$ . Comme pour l'hydroxylation, ceci suggère également une moindre évolution des substrats apatitiques revêtus d'ADN par rapport au composé de référence sans ADN.

Bien que des données complémentaires soient nécessaires pour mieux comprendre ce phénomène, ces éléments pourraient indiquer un rôle « protecteur » réciproque joué par l'ADN adsorbé envers son substrat apatitique, qui ralentirait son évolution vers un système plus proche de la stœchiométrie.

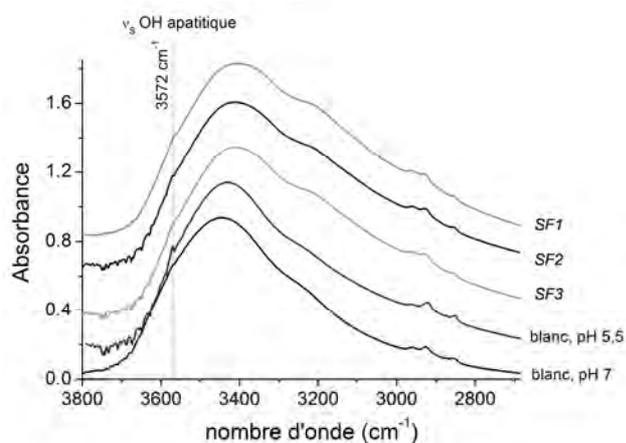


Figure III-16 Données FTIR dans le domaine  $3800 - 2800\text{ cm}^{-1}$  mettant en évidence la vibration symétrique des ions  $\text{OH}^-$  apatitique ( $3572\text{ cm}^{-1}$ )

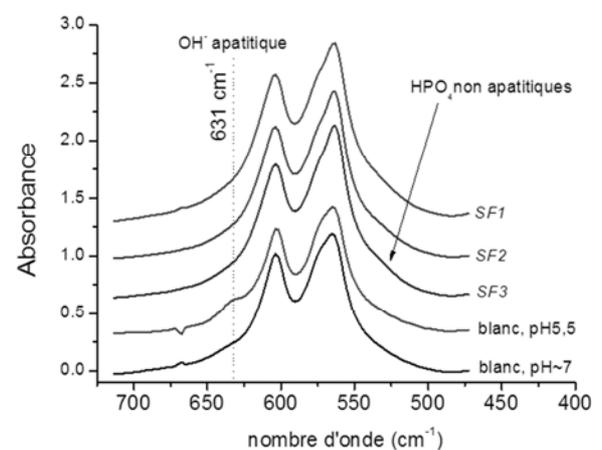
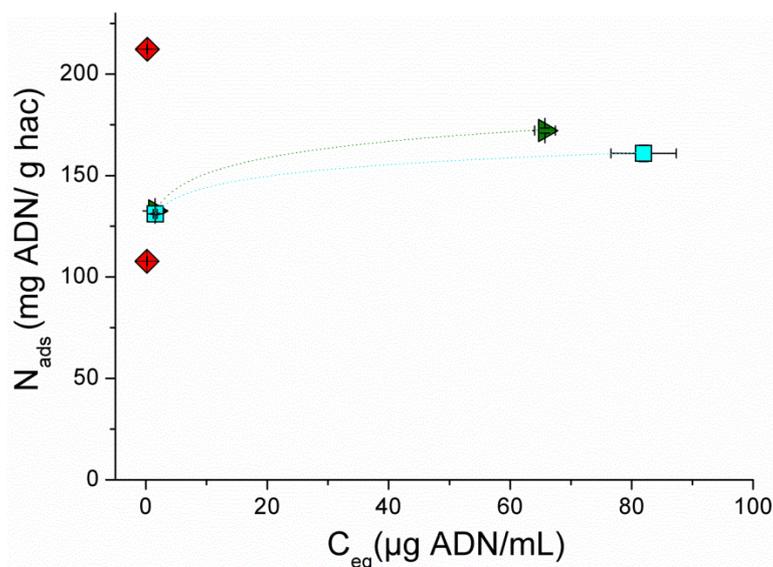


Figure III-17 Données FTIR dans le domaine  $800-400\text{ cm}^{-1}$  avec indication de la vibration de libration des ions  $\text{OH}^-$  apatitique à  $631\text{ cm}^{-1}$

### 3.2 Données complémentaires relatives à l'effet de cations divalents sur l'adsorption

A la lumière des données bibliographiques sur l'effet des cations jouant le rôle de contre-ions dans la conformation de l'ADN, effet d'autant plus important que la valence de ces ions est grande, une étude comparative de l'adsorption et de la désorption de l'ADN en présence de cations mono- et divalents a été initiée. Pour cela, l'évaluation de la quantité d'ADN adsorbé sur une quantité fixe d'apatite a été réalisée pour deux concentrations initiales d'ADN, en présence de  $0,1\text{M NaCl}$ ,  $0,1\text{M KCl}$  ou  $0,1\text{M BaCl}_2$ .

La différence significative du comportement des molécules de cet ADN partiellement fragmenté (taille des fragments  $300-1000\text{ pb}$ ) en présence d'ions mono- ou divalents peut être observée sur la Figure III-18.



**Figure III-18 Adsorption à  $T_{amb}$  d'ADN sur hacS4 en présence de KCl 0,1M (carrés cyans), NaCl 0,1M (triangles verts) et BaCl<sub>2</sub> 0,1M (losanges rouges)**

La Figure III-18 indique que la quantité d'ADN adsorbé en présence de BaCl<sub>2</sub> 0,1M, par unité de masse de solide, est bien supérieure par rapport aux solutions de NaCl et KCl de la même concentration.

Compte tenu des données relatives à l'effet de la force ionique sur l'adsorption d'ADN sur apatite, que nous avons intégrées dans la publication, ce phénomène ne peut pas s'expliquer uniquement par l'augmentation de la force ionique du milieu qui passe de 0,1M pour NaCl et KCl à 0,3M pour BaCl<sub>2</sub>. Il ne semble au contraire pouvoir être relié qu'au caractère bivalent des cations Ba<sup>2+</sup> présents dans le milieu et susceptibles de modifier les caractéristiques de l'ADN. La plus forte charge positive de ces cations est en effet susceptible de provoquer une plus grande compaction des molécules d'ADN, et donc d'en modifier la conformation jouant un rôle important sur les phénomènes d'adsorption.

Notons qu'un artefact initial lié à la lecture de l'absorbance à 260 nm a été corrigé suite à un nouvel étalonnage du spectrophotomètre, à partir de standards d'ADN Trevigen® préparés à partir d'une solution de BaCl<sub>2</sub> 0,1M. En effet, une plus grande compaction des molécules d'ADN suite à l'ajout de contre-ions divalents a pour double conséquence :

- un effet hypochrome par la diminution de l'absorbance à 260 nm des nucléotides quand ils forment des amas (le phénomène inverse est observé lors de la dénaturation de l'ADN double-brin, qui sépare les deux brins par rupture des liaisons hydrogène entre les bases)

- une augmentation de la quantité maximale d'ADN adsorbé (valeur à déterminer, étant donnée l'absence de palier de saturation pour les points à 0,1M BaCl<sub>2</sub>)

L'investigation de la désorption par dilution des molécules d'ADN (avec le solvant de même force ionique) à partir des nanocristaux d'apatite n'a en revanche pas montré de différences significatives. Les concentrations d'ADN à l'équilibre après désorption sont restées globalement très proches de celles calculées théoriquement après dilution du système (voir Tableau III-5).

**Tableau III-5 Effet de la nature des cations mono- ou divalents sur la quantité d'ADN adsorbée par unité de masse d'apatite (exprimée en mg ADN/ g hac ) après désorption, par comparaison avec les valeurs théoriques d'ADN après dilution par 5 de la concentration à l'équilibre (avant désorption potentielle)**

Point isotherme	KCl 0,1M		NaCl 0,1M		BaCl <sub>2</sub> 0,1M	
	Dilution	Désorption	Dilution	Désorption	Dilution	Désorption
n°1	0,3 ± 0,06	0,7 ± 0,2	0,31 ± 0,02	0,69 ± 0,06	0,042 ± 0,015	0,09 ± 0,2
n°2	16,4 ± 1,1	11,3 ± 0,7	13,15 ± 0,34	11,6 ± 1,3	0,053 ± 0,015	0,25 ± 0,2

## D DISCUSSION

Contrairement aux travaux de Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2012), l'effet de la force ionique sur la désorption de l'ADN n'a pas été observé ici. Dans leur étude, ils ont mis en évidence l'effet favorable de la force ionique (NaCl) sur l'adsorption et la désorption d'oligonucléotides simple-brin, pour des particules d'or revêtues d'ions citrate. Etant donnée la longueur et la conformation de nos molécules d'ADN double-brin (<1000 pb), en comparaison à celles utilisées par Zhang *et al.* (12 à 70-mer), l'impact de la conformation des molécules d'ADN semble être, dans notre cas, un phénomène prépondérant. Il est envisageable que les longues chaînes d'ADN, même sous une forme plus compacte en solution, puissent adopter une conformation plus étendue à la surface des nanocristaux d'apatite, notamment en raison de l'affinité des groupements  $\text{PO}_2^-$  du squelette sucre-phosphate de l'ADN pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  de l'apatite nanocristalline, à la recherche de l'état de stabilité thermodynamique optimal.

En ce sens, l'étude de l'adsorption de fragments courts est indiquée pour mieux rendre compte expérimentalement d'un aspect de la réalité d'une adsorption d'ADN fragmenté *post mortem* sur la phase minéral des tissus durs. Si des fragments d'ADN de haut poids moléculaire peuvent être extraits de certains tissus quelques jours à quelques semaines *post mortem*, les analyses génétiques réalisées dans des cadres médico-légaux ou anthropologiques sont le plus souvent réalisées sur des marqueurs de moins de 300 pb, et les études les plus récentes reportent une taille moyenne de fragments de 80 pb en moyenne.

La possible inhibition de la maturation cristalline par l'adsorption d'ADN à la surface des nanocristaux pourrait être un autre élément en faveur d'une interaction ADN-apatite favorable à la conservation de ce complexe organo-minéral. La nature exacte des espèces ioniques de la couche hydratée qui interagissent avec les groupements phosphate anioniques de l'ADN doit encore être élucidée. A l'heure actuelle, les données concernant le dosage des espèces libérées en solution ne permettent pas de le dire, en raison de la libération concomitante d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  et d'ions phosphate lors du processus d'adsorption. L'identification des sites d'adsorption spécifiques à l'ADN au niveau de la surface apatitique se révélera utile dans l'optimisation des protocoles d'extraction de l'ADN, qui se fondent à l'heure actuelle sur la modulation de l'affinité de l'ADN pour une silice *a priori* non fonctionnalisée, par la mise en jeu de plusieurs paramètres physico-chimiques (pH, force ionique, voire température).

Quoiqu'il en soit, l'existence d'une interaction chimique entre ADN et apatite biomimétique, non réversible par simple dilution mais sous la dépendance de facteurs environnementaux (notamment ceux influant sur l'ionisation des composés), est attestée par cette étude.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'originalité de ce travail réside dans l'apport de la physico-chimie, et plus particulièrement de la Science des Matériaux, à l'étude de l'ADN d'origine squelettique par l'étude de son interaction avec son substrat minéral. Contrairement aux avancées biotechnologiques majeures, qui sont à l'origine de l'essor de la paléogénomique depuis ces vingt dernières années, l'analyse fine du substrat minéral apatitique de l'ADN ancien n'a pas reçu l'attention systématique qu'elle mérite. Pourtant, l'ensemble de la communauté des paléogénétiens s'accordent à reconnaître l'hypothèse d'une interaction des fragments d'ADN avec l'apatite des tissus squelettiques, en tant que mécanisme-clé de la préservation de l'ADN ancien.

Nous avons tenté de dégager ici les axes de recherche les plus pertinents de cette problématique et d'y apporter des réponses concrètes, en nous appuyant sur des bases bibliographiques et des techniques complémentaires.

D'un point de vue plutôt fondamental, nous avons élaboré un modèle expérimental qui permet d'obtenir des données physico-chimiques reproductibles qui décrivent l'affinité de l'ADN pour une apatite phosphocalcique de synthèse, analogue au minéral osseux et dentinaire (apatite nanocristalline carbonatée non stœchiométrique). La réactivité de telles apatites nanocristallines, qu'elles soient d'origine biologique ou de nature synthétique mais biomimétique, dépend d'une couche phosphocalcique hydratée en surface des nanocristaux, qui contient notamment des ions  $\text{HPO}_4^{2-}$  aisément échangeables et dont nous avons montré l'implication dans le processus d'adsorption d'ADN. De telles apatites nanocristallines non stœchiométriques sont cependant connues pour être métastables ; leur couche non apatitique de surface disparaît progressivement en solution, en faveur du cœur apatitique des nanocristaux, plus stable mais moins réactif (processus de maturation). L'analyse qualitative et quantitative d'interactions ADN/apatite nanocristalline a réussi, par ce travail, à faire évoluer la représentation classique d'une interaction  $\text{Ca}^{2+} - \text{PO}_2^-$  entre l'apatite et l'ADN, par la mise en évidence du rôle des ions hydrogénophosphate faiblement liés de la couche hydratée, dont la mobilité favorise les réactions d'échange ionique avec les fluides environnants. Cette étude doit se poursuivre pour explorer plus avant ce phénomène

d'échange ionique entre les groupements  $\text{PO}_2^-$  de l'ADN et les ions hydrogénophosphate de l'apatite. Les phénomènes physico-chimiques de surface des apatites nanocristallines, et plus particulièrement leurs propriétés de solubilité particulières, compliquent l'étude des échanges ioniques dans notre cas. Pourtant, toutes ces propriétés sont susceptibles d'expliquer l'évolution diagénétique des apatites nanocristallines non stœchiométriques. Dans ce but, une étude plus approfondie de l'apatite après adsorption doit encore être menée, non seulement pour continuer à caractériser l'interaction ADN/apatite, mais aussi pour évaluer les conséquences de cette interaction sur la maturation de l'apatite en solution. Les résonances magnétiques nucléaires du  $^{31}\text{P}$  ou du  $^{13}\text{C}$  semblent notamment prometteuses dans la discrimination des différents environnements phosphate, entre ceux de l'ADN et ceux de l'apatite, et pour l'étude de l'interface ADN/apatite.

Par ailleurs, le rôle des ions carbonate apatitiques n'a pas été spécifiquement exploré. La libération d'ions carbonate au cours de l'adsorption d'ADN pourrait également intervenir, de la même manière que celle des ions hydrogénophosphate. Une étude des enthalpies d'adsorption pourrait également permettre d'étudier plus avant le type d'interaction de l'ADN avec les ions labiles de la couche hydratée, sur des bases thermodynamiques.

Pour le moment, notre contribution à la diagénèse, à partir de spécimens anciens d'origine biologique, a débuté par la proposition et le développement de méthodes analytiques, qui permettent d'étudier les modifications du substrat apatitique. Que certaines d'entre elles soient corrélées avec la perte, ou la conservation de l'ADN ancien est vraisemblable, mais les variabilités des facteurs environnementaux, et des motifs de modifications diagénétiques, limitent à ce stade les conclusions possibles au sujet de la préservation de l'ADN ancien. De plus, l'utilisation de techniques d'imagerie (micro CT, MET...) et de techniques spectroscopiques couplées à une microsonde fait partie des perspectives à envisager en premier lieu pour mettre en évidence les hétérogénéités au niveau local. Jusque ici, seule une réponse globale a été enregistrée pour chaque spécimen étudié. La technique SAXS apparaît également prometteuse pour une étude à l'interface organo-minérale. L'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons serait dans tous les cas nécessaire afin d'établir d'éventuelles lois de comportement en fonction des facteurs environnementaux, voire de l'ancienneté des spécimens.

Du côté de l'ADN, nous avons principalement évoqué les propriétés de l'ADN en tant que polymère anionique. Les paramètres de viscosité, de conformation et de taille des fragments devront être investigués de manière plus spécifique, notamment dans le but

d'optimiser les protocoles d'extraction de l'ADN ancien, ce qui est, à terme, l'un des objectifs d'une telle étude. Par ailleurs, il sera nécessaire de prendre en compte les autres molécules organiques éventuellement liés à l'ADN (histones, autre nucléoprotéine), tout comme les composés éventuellement liés à la surface des nanocristaux d'apatite (ions citrate, acides aminés, collagène).

D'un point de vue plus appliqué, l'analyse du fonctionnement d'un kit d'extraction nous a permis d'identifier certaines particularités intéressantes des supports siliciques et des solutions à utiliser pour moduler l'interaction de l'ADN sur ce support. Ceci nous a permis de mieux comprendre l'importance de la formulation du matériau dans ses propriétés adsorbantes (peu de données concernant notre poudre d'apatite ont été recueillies à ce sujet, ex. porosité, granulométrie). Forte de tout cela, nous souhaiterions proposer des améliorations dans les protocoles d'extraction, notamment pour parvenir à cibler les zones d'échantillonnage, et recueillir les fragments les mieux conservés, qui seraient piégés au sein d'amas cristallins. Une augmentation du rendement d'extraction serait également intéressante à viser.

L'ensemble des résultats recueillis dans ce travail confirme que l'étude de la conservation de l'ADN ancien dans les restes osseux et dentaires, dans ses aspects fondamentaux et appliqués, ne peut s'affranchir ni de la caractérisation physico-chimique des tissus squelettiques anciens, matériaux complexes en raison de leur nature composite et chimiquement modifiée, ni du type d'interaction que l'ADN peut former avec son substrat minéral apatitique.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

A

- Acharaya, S., 2006. Some aspects of physicochemical properties of DNA and RNA. Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala.
- Adler, C.J., Haak, W., Donlon, D., Cooper, A., 2011. Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *J. Archaeol. Sci.* 38, 956–964.
- Aharoni, C., Tompkins, F.C., 1970. Kinetics of Adsorption and Desorption and the Elovich Equation, in: D.D. Eley, H.P. and P.B.W. (Ed.), *Advances in Catalysis*. Academic Press, pp. 1–49.
- Alaeddini, R., Walsh, S.J., Abbas, A., 2010. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—A review. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4, 148–157.
- Alexander, B., Daulton, T.L., Genin, G.M., Lipner, J., Pasteris, J.D., Wopenka, B., Thomopoulos, S., 2012. The nanometre-scale physiology of bone: steric modelling and scanning transmission electron microscopy of collagen-mineral structure. *J. R. Soc. Interface* 9, 1774–1786.
- Amory, S., 2007. La diffusion des gènes de la période protohistorique à l'époque actuelle dans le complexe spatial Altaï-Baïkal. Ecole des Hautes Etudes en Sciences Sociales (EHESS).
- Amory, S., Huel, R., Bilić, A., Loreille, O., Parsons, T.J., 2012. Automatable full demineralization DNA extraction procedure from degraded skeletal remains. *Forensic Sci. Int. Genet.* 6, 398–406.
- Andelman, D., Joanny, J.-F., 2000. Polyelectrolyte adsorption. *ArXiv Prepr. Cond-Mat*0011072.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–465.
- Anderung, C., Persson, P., Bouwman, A., Elburg, R., Götherström, A., 2008. Fishing for ancient DNA. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2, 104–107.
- Aureau, D., Varin, Y., Roodenko, K., Seitz, O., Pluchery, O., Chabal, Y.J., 2010. Controlled Deposition of Gold Nanoparticles on Well-Defined Organic Monolayer Grafted on Silicon Surfaces. *J. Phys. Chem. C* 114, 14180–14186.
- Autefage, H., Briand-Mésange, F., Cazalbou, S., Drouet, C., Fourmy, D., Gonçalves, S., Salles, J.-P., Combes, C., Swider, P., Rey, C., 2009. Adsorption and release of BMP-2 on nanocrystalline apatite-coated and uncoated hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate porous ceramics. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 91B, 706–715.

**B**

- Bahdod, A., El Asri, S., Saoiabi, A., Coradin, T., Laghzizil, A., 2009. Adsorption of phenol from an aqueous solution by selected apatite adsorbents: Kinetic process and impact of the surface properties. *Water Res.* 43, 313–318.
- Baker, L.E., McCormick, W.F., Matteson, K.J., 2001. A silica-based mitochondrial DNA extraction method applied to forensic hair shafts and teeth. *J. Forensic Sci.* 46, 126–130.
- Balter, V., 2004. Allometric constraints on Sr/Ca and Ba/Ca partitioning in terrestrial mammalian trophic chains. *Oecologia* 139, 83–88.
- Balter, V., Braga, J., Télouk, P., Thackeray, J.F., 2012. Evidence for dietary change but not landscape use in South African early hominins. *Nature* 489, 558–560.
- Bär, W., Kratzer, A., Mächler, M., Schmid, W., 1988. Postmortem stability of DNA. *Forensic Sci. Int.* 39, 59–70.
- Barnett, R., Larson, G., 2012. A Phenol–Chloroform Protocol for Extracting DNA from Ancient Samples, in: Shapiro, B., Hofreiter, M. (Eds.), *Ancient DNA, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, pp. 13–19.
- Basset, H., 1917. The phosphates of calcium. Part IV. The basic phosphates. *J. Chem. Soc. Trans.* 111, 620–647.
- Beall, G.W., Sowersby, D.S., Roberts, R.D., Robson, M.H., Lewis, L.K., 2009. Analysis of Oligonucleotide DNA Binding and Sedimentation Properties of Montmorillonite Clay Using Ultraviolet Light Spectroscopy. *Biomacromolecules* 10, 105–112.
- Behrensmeyer, A.K., Kidwell, S.M., 1985. Taphonomy's Contributions to Paleobiology. *Paleobiology* 11, 105–119.
- Benaziz, L., Barroug, A., Legrouri, A., Rey, C., Lebugle, A., 2001. Adsorption of O-Phospho-L-Serine and L-Serine onto Poorly Crystalline Apatite. *J. Colloid Interface Sci.* 238, 48–53.
- Benazzi, S., Douka, K., Fornai, C., Bauer, C.C., Kullmer, O., Svoboda, J., Pap, I., Mallegni, F., Bayle, P., Coquerelle, M., Condemi, S., Ronchitelli, A., Harvati, K., Weber, G.W., 2011. Early dispersal of modern humans in Europe and implications for Neanderthal behaviour. *Nature* 479, 525–528.
- Bender, K., 2004. Preparation of degraded human DNA under controlled conditions. *Forensic Sci. Int.* 139, 135–140.
- Berna, F., Matthews, A., Weiner, S., 2004. Solubilities of bone mineral from archaeological sites: the recrystallization window. *J. Archaeol. Sci.* 31, 867–882.
- Bernardi, G., 1965. Chromatography of Nucleic Acids on Hydroxyapatite. *Nature* 206, 779–783.
- Bloomfield, V.A., Crothers, D.M., (jun.), I.T., 2000. *Nucleic Acids: Structures, Properties, and Functions*. University Science Books.

- Bockris, J.O., Jeng, K.T., 1992. In-situ studies of adsorption of organic compounds on platinum electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 330, 541–581.
- Bohr, V.A., Stevnsner, T., de Souza-Pinto, N.C., 2002. Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene* 286, 127–134.
- Bohrer, D., Cícero do Nascimento, P., Mendonça, J.K., 2001. On-line deproteinization by adsorption of proteins on a polyethylene powder pre-column for the determination of Na, K, Mg and Ca in human serum by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 750, 61–69.
- Bollongino, R., Tresset, A., Vigne, J.-D., 2008. Environment and excavation: Pre-lab impacts on ancient DNA analyses. *Comptes Rendus Palevol* 7, 91–98.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503.
- Boreham, S., Conneller, C., Milner, N., Taylor, B., Needham, A., Boreham, J., Rolfe, C.J., 2011. Geochemical indicators of preservation status and site deterioration at Star Carr. *J. Archaeol. Sci.* 38, 2833–2857.
- Borodina, T.A., Lehrach, H., Soldatov, A.V., 2003. DNA purification on homemade silica spin-columns. *Anal. Biochem.* 321, 135–137.
- Bortner, C.D., Oldenburg, N.B.E., Cidlowski, J.A., 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 5, 21–26.
- Boskey, A.L., 2007. Mineralization of bones and teeth. *Elements* 3, 385–391.
- Boskey, A.L., Mendelsohn, R., 2005. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. *Vib. Spectrosc.* 38, 107–114.
- Bowes, J.H., Murray, M.M., 1935. The chemical composition of teeth: The composition of human enamel and dentine. *Biochem. J.* 29, 2721.
- Boy, S.C., Bernitz, H., Van Heerden, W.F.P., 2003. Flow cytometric evaluation of postmortem pulp DNA degradation. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 24, 123–127.
- Reiche, I., Chadeaux, C., Müller, K., Gourrier, A., 2012. Towards a Better Understanding of Alteration Phenomena of Archaeological Bone by a Closer Look at the Organic/Mineral Association at Micro- and Nanoscale. Preliminary Results on Neolithic Samples from Chalain Lake Site 19, Jura, France. *ArchéoSciences* n° 35, 143–158.
- Brinkers, S., Dietrich, H.R.C., de Groote, F.H., Young, I.T., Rieger, B., 2009. The persistence length of double stranded DNA determined using dark field tethered particle motion. *J. Chem. Phys.* 130, 215105.
- Brundin, M., Figdor, D., Sundqvist, G., Sjögren, U., 2013. DNA Binding to Hydroxyapatite: A Potential Mechanism for Preservation of Microbial DNA. *J. Endod.* 39, 211–216.

- Buckley, M., Anderung, C., Penkman, K., Raney, B.J., Götherström, A., Thomas-Oates, J., Collins, M.J., 2008. Comparing the survival of osteocalcin and mtDNA in archaeological bone from four European sites. *J. Archaeol. Sci.* 35, 1756–1764.
- Buckley, M., Collins, M., Thomas-Oates, J., Wilson, J.C., 2009. Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 3843–3854.
- Burger, J., Hummel, S., Herrmann, B., Henke, W., 1999. DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis* 20, 1722–1728.
- Butcher, L.M., Beck, S., 2010. AutoMeDIP-seq: A high-throughput, whole genome, DNA methylation assay. *Methods* 52, 223–231.

## C

- Cai, P., Huang, Q., Li, M., Liang, W., 2008. Binding and degradation of DNA on montmorillonite coated by hydroxyl aluminum species. *Colloids Surf. B-Biointerfaces* 62, 299–306.
- Cai, P., Huang, Q., Zhang, X., Chen, H., 2006. Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an Alfisol. *Soil Biol. Biochem.* 38, 471–476.
- Calvo, L., Ricaut, F., Keyser, C., Grimoud, A.M., Ludes, B., Crubézy, E., Lesca, C., Lodter, J.P.H., 2001. Etude d'ADN ancien au niveau de la pulpe dentaire de la série ostéologique de Saint Côme et Damien. *Anthropo* 1, 21–9.
- Campos, P.F., Craig, O.E., Turner-Walker, G., Peacock, E., Willerslev, E., Gilbert, M.T.P., 2012. DNA in ancient bone - Where is it located and how should we extract it? *Ann. Anat.-Anat. Anz.* 194, 7–16.
- Cau, P., Seïté, R., 1999. Cours de biologie cellulaire. Ellipses Marketing.
- Caviedes-Bucheli, J., Avendaño, N., Gutierrez, R., Hernández, S., Moreno, G.C., Romero, M.C., Muñoz, H.R., 2006. Quantification of Lactate-Dehydrogenase and Cell Viability in Postmortem Human Dental Pulp. *J. Endod.* 32, 183–185.
- Cazalbou, S., 2000. Échanges cationiques impliquant des apatites nanocristallines analogues au minéral osseux (Thèse de doctorat). Institut national polytechnique, Toulouse, France.
- Cazalbou, S., Eichert, D., Drouet, C., Combes, C., Rey, C., 2004. Minéralisations biologiques à base de phosphate de calcium. *Comptes Rendus Palevol* 3, 563–572.
- Cazalbou, S., Eichert, D., Ranz, X., Drouet, C., Combes, C., Harmand, M.F., Rey, C., 2005. Ion exchanges in apatites for biomedical application. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 16, 405–409.
- Chadefaux, C., Le Hô, A.-S., Bellot-Gurlet, L., Reiche, I., 2009. Curve-fitting Micro-ATR-FTIR studies of the amide I and II bands of type I collagen in archaeological bone materials. *E-Preserv. Sci.* 6, 129–137.

- Chaïrat, C., Schott, J., Oelkers, E.H., Lartigue, J.-E., Harouiya, N., 2007. Kinetics and mechanism of natural fluorapatite dissolution at 25°C and pH from 3 to 12. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71, 5901–5912.
- Charlot, G., 1963. *L'analyse qualitative et les réactions en solution*. Masson, 1963, Paris, France.
- Chen, W.-Y., Lin, M.-S., Lin, P.-H., Tasi, P.-S., Chang, Y., Yamamoto, S., 2007. Studies of the interaction mechanism between single strand and double-strand DNA with hydroxyapatite by microcalorimetry and isotherm measurements. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 295, 274–283.
- Chenorkian, R., Brugal, J.-P., 2010. Réseau Thématique Pluridisciplinaire “Taphonomie” - Bilan d'activités, Etat des lieux et Propositions.
- Cheung, C., Porter, J., McKay, G., 2001. Sorption kinetic analysis for the removal of cadmium ions from effluents using bone char. *Water Res.* 35, 605–612.
- Chhetry, A., 2000. *Metastable equilibrium solubility distribution behavior of carbonated apatites*. The University of Utah.
- Chien, S.H., Clayton, W.R., 1980. Application of Elovich Equation to the Kinetics of Phosphate Release and Sorption in Soils<sup>1</sup>. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44, 265.
- Child, A.M., 1995. Towards and Understanding of the Microbial Decomposition of Archaeological Bone in the Burial Environment. *J. Archaeol. Sci.* 22, 165–174.
- Chiron, N., Guilet, R., Deydier, E., 2003. Adsorption of Cu(II) and Pb(II) onto a grafted silica: isotherms and kinetic models. *Water Res.* 37, 3079–3086.
- Cipollaro, M., Di Bernardo, G., Forte, A., Galano, G., De Masi, L., Galderisi, U., Guarino, F.M., Angelini, F., Cascino, A., 1999. Histological analysis and ancient DNA amplification of human bone remains found in Caius Iulius Polybius house in Pompeii. *Croat. Med. J.* 40, 392–397.
- Coble, M.D., Loreille, O.M., Wadhams, M.J., Edson, S.M., Maynard, K., Meyer, C.E., Niederstätter, H., Berger, C., Berger, B., Falsetti, A.B., Gill, P., Parson, W., Finelli, L.N., 2009. Mystery Solved: The Identification of the Two Missing Romanov Children Using DNA Analysis. *PLoS ONE* 4, e4838.
- Cole, A.S., Eastoe, J.E., 1988. *Biochemistry and oral biology*. Wright.
- Collins, M.J., Gernaey, A.M., Nielsen-Marsh, C.M., Vermeer, C., Westbroek, P., 2000. Slow rates of degradation of osteocalcin: Green light for fossil bone protein? *Geology* 28, 1139–1142.
- Collins, M.J., Nielsen-Marsh, C.M., Hiller, J., Smith, C.I., Roberts, J.P., Prigodich, R.V., Weiss, T.J., Csapo, J., Millard, A.R., Turner-Walker, G., 2002. The survival of organic matter in bone: A review. *Archaeometry* 44, 383–394.

- Collins, M.J., Riley, M.S., Child, A.M., Turner-Walker, G., 1995. A basic mathematical simulation of the chemical degradation of ancient collagen. *J. Archaeol. Sci.* 22, 175–183.
- Collins, M.J., Waite, E.R., van Duin, A.C., 1999. Predicting protein decomposition: the case of aspartic-acid racemization kinetics. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 354, 51–64.
- Cooper, A., Poinar, H.N., 2000. Ancient DNA: Do It Right or Not at All. *Science* 289, 1139–1139.
- Coujard, R., Poirier, J., 1980. Précis d'histologie humaine. Presses Université Laval.
- Crecchio, C., Stotzky, G., 1998. Binding of DNA on humic acids: Effect on transformation of *Bacillus subtilis* and resistance to DNase. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1061–1067.
- Crubézy, E., Braga, J., Larrouy, G., 2008. Anthropobiologie: évolution humaine. Elsevier Masson, Issy-Les-Moulineaux.

## D

- Reiche, I., Chadefaux, C., Müller, K., Gourrier, A., 2012. Towards a Better Understanding of Alteration Phenomena of Archaeological Bone by a Closer Look at the Organic/Mineral Association at Micro- and Nanoscale. Preliminary Results on Neolithic Samples from Chalain Lake Site 19, Jura, France. *ArchéoSciences* n° 35, 143–158.
- Daculsi, G., Bouler, J.M., LeGeros, R.Z., 1997. Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials. *Int. Rev. Cytol.* 172, 129–191.
- Dauphin, Y., Williams, C.T., 2004. Diagenetic trends of dental tissues. *Comptes Rendus Palevol* 3, 583–590.
- Davoren, J., Vanek, D., Konjhozic, R., Crews, J., Huffine, E., Parsons, T.J., 2007. Highly Effective DNA Extraction Method for Nuclear Short Tandem Repeat Testing of Skeletal Remains from Mass Graves. *Croat. Med. J.* 48, 478–485.
- De Ricqlès, A., Livage, J., 2004. Une introduction à la biominéralisation : diversité et unité. *Comptes Rendus Palevol* 3, 435–441.
- Destriau, M., Dorthe, G., Ben-Aïm, R., 1981. Cinétique et dynamique chimiques. Editions TECHNIP.
- Diallo-Garcia, S., 2012. Hydroxyapatites, un système basique atypique modulable par la synthèse: vers l'identification des sites actifs.
- Didier de Saint-Amand, J., Zuckerman, L., 1968. Méthodes de fractionnement des constituants phosphorés végétaux appliquées au Laboratoire d'Analyses végétales de l'O.R.S.T.O.M., in: Méthodes de Fractionnement Des Constituants Phosphorés Végétaux et de Corrections Des Résultats de Dosage, Initiations - Documentations Techniques. O.R.S.T.O.M, Paris, France.

- Dobberstein, R.C., Collins, M.J., Craig, O.E., Taylor, G., Penkman, K.E.H., Ritz-Timme, S., 2009. Archaeological collagen: Why worry about collagen diagenesis? *Archaeol. Anthropol. Sci.* 1, 31–42.
- Dobberstein, R.C., Huppertz, J., von Wurmb-Schwark, N., Ritz-Timme, S., 2008. Degradation of biomolecules in artificially and naturally aged teeth: Implications for age estimation based on aspartic acid racemization and DNA analysis. *Forensic Sci. Int.* 179, 181–191.
- Dobrynin, A.V., Rubinstein, M., 2005. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Prog. Polym. Sci.* 30, 1049–1118.
- Dorozhkin, S.V., 2009. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials* 2, 399–498.
- Douarche, C., 2007. Étude de l'adsorption de l'ADN simple brin et double brin aux interfaces (Thèse de doctorat). Université Lille 1 - Sciences et technologies, France.
- Doubts remain that the Leicester body is Richard III, 2013. . *New Sci.* 217, 6.
- Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P.A., Vaagbø, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Peña-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., Krokan, H.E., 2004. Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair* 3, 1389–1407.
- Drouet, C., 2013. Apatite Formation: Why It May Not Work as Planned, and How to Conclusively Identify Apatite Compounds. *BioMed Res. Int.* 2013.
- Drouet, C., Carayon, M.-T., Combes, C., Rey, C., 2008. Surface enrichment of biomimetic apatites with biologically-active ions Mg<sup>2+</sup> and Sr<sup>2+</sup>: A preamble to the activation of bone repair materials. *Mater. Sci. Eng. C-Biomim. Supramol. Syst.* 28, 1544–1550.
- Duc, M., 2002. Contribution à l'étude des mécanismes de sorption aux interfaces solide-liquide: application aux cas des apatites et des oxy-hydroxydes. Ecole Centrale Paris.
- Ducheyne, P., 2011. 1.101 - Biomaterials, in: Paul Ducheyne (Ed.), *Comprehensive Biomaterials*. Elsevier, Oxford, pp. 1–4.

## E

- Eanes, E.D., Meyer, J.L., 1977. The maturation of crystalline calcium phosphates in aqueous suspensions at physiologic pH. *Calcif. Tissue Res.* 23, 259–269.
- Efremov, I.A., 1940. Taphonomy: new branch of paleontology. *Pan-Am. Geol.* 74, 81–93.
- Eglinton, G., Logan, G.A., Ambler, R.P., Boon, J.J., Perizonius, W.R.K., 1991. Molecular Preservation [and Discussion]. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 333, 315–328.
- Eichert, D., 2001. Étude de la réactivité de surface d'apatites de synthèse nanocristallines (Thèse de doctorat). Institut national polytechnique, Toulouse, France.
- Eichert, D., Drouet, C., Sfihi, H., Rey, C., Combes, C., 2007. Nanocrystalline apatite-based biomaterials: synthesis, processing and characterization, in: *Biomaterials Research Advances*. J.B. Kendall, pp. 93–143.

- Elliott, J.C., 1994. Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates. Elsevier Science & Technology.
- Errassifi, F., 2011. Mécanismes d'adsorption du risédronate par des phosphates de calcium biologiques: applications aux biomatériaux. Faculté des Sciences Semlalia-Marrakech.
- Errassifi, F., Menbaoui, A., Autefage, H., Benaziz, L., Ouizat, S., Santran, V., Sarda, S., Lebugle, A., Combes, C., Barroug, A., Sfihi, H., Rey, C., 2010. Adsorption on Apatitic Calcium Phosphates: Applications to Drug Delivery, in: Narayan, R., McKittrick, J. (Eds.), Advances in Bioceramics and Biotechnologies. Amer Ceramic Soc, Westerville, pp. 159–174.
- Esquenet, C., 2003. Propriétés structurales et dynamiques des solutions de polyélectrolytes rigides et semi-rigides et de polysaccharides associatifs. Université Joseph-Fourier-Grenoble I.

## F

- Fantner, G.E., Hassenkam, T., Kindt, J.H., Weaver, J.C., Birkedal, H., Pechenik, L., Cutroni, J.A., Cidade, G.A.G., Stucky, G.D., Morse, D.E., Hansma, P.K., 2005. Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture. *Nat. Mater.* 4, 612–616.
- Fernandez-Jalvo, Y., Andrews, P., Pesquero, D., Smith, C., Marin-Monfort, D., Sanchez, B., Geigl, E.-M., Alonso, A., 2010. Early bone diagenesis in temperate environments Part I: Surface features and histology. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 288, 62–81.
- Feuillie, C., 2012. Détection d'ADN par spectroscopie SERRS et interactions entre nucléotides et surfaces des minéraux phyllosilicatés ferromagnésiens dans le contexte de l'origine de la Vie. Ecole normale supérieure de Lyon - ENS LYON.
- Flory, P.J., 1953. Principles of Polymer Chemistry. Cornell University Press.
- Foo, K.Y., Hameed, B.H., 2010. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chem. Eng. J.* 156, 2–10.
- Franchi, M., Ferris, J.P., Gallori, E., 2003. Cations as mediators of the adsorption of nucleic acids on clay surfaces in prebiotic environments. *Orig. Life Evol. Biosphere J. Int. Soc. Study Orig. Life* 33, 1–16.
- Frank, R.M., Steuer, P., 1988. Transmission electron microscopy of the human odontoblast process in peripheral root dentine. *Arch. Oral Biol.* 33, 91–98.
- Fratzl, P., Jakob, H. F., Rinnerthaler, S., Roschger, P., Klaushofer, K., 1997. Position-Resolved Small-Angle X-ray Scattering of Complex Biological Materials. *J. Appl. Cryst.* 30, 765–769.
- Fries, N., 1952. Variations in the content of phosphorus, nucleic acids and adenine in the leaves of some deciduous trees during the autumn. *Plant Soil* 4, 29–42.

Fujiwara, M., Yamamoto, F., Okamoto, K., Shiokawa, K., Nomura, R., 2005. Adsorption of duplex DNA on mesoporous silicas: possibility of inclusion of DNA into their mesopores. *Anal. Chem.* 77, 8138–8145.

## G

Reiche, I., Chadeaux, C., Müller, K., Gourrier, A., 2012. Towards a Better Understanding of Alteration Phenomena of Archaeological Bone by a Closer Look at the Organic/Mineral Association at Micro- and Nanoscale. Preliminary Results on Neolithic Samples from Chalain Lake Site 19, Jura, France. *ArchéoSciences* n° 35, 143–158.

Gee, A., Deitz, V.R., 1953. Determination of Phosphate by Differential Spectrophotometry. *Anal. Chem.* 25, 1320–1324.

Geigl, E.-M., 2002. On the circumstances surrounding the preservation and analysis of very old DNA. *Archaeometry* 44, 337–342.

Geigl, E.M., Baumer, U., Koller, J., 2004. New approaches to study the preservation of biopolymers in fossil bones. *Environ. Chem. Lett.* 2.

Gelbart, W.M., Bruinsma, R.F., Pincus, P.A., Parsegian, V.A., 2000. DNA-inspired electrostatics. *Phys. Today* 53, 38.

Gennes, P.-G. de, 1979. *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Cornell University Press.

Gilbert, M.T.P., Menez, L., Janaway, R.C., Tobin, D.J., Cooper, A., Wilson, A.S., 2006. Resistance of degraded hair shafts to contaminant DNA. *Forensic Sci. Int.* 156, 208–212.

Gimat, A., Oblette, C., Perrot, C., 2012. Caractérisation d'un kit d'extraction d'ADN ancien (Projet 3A). INPT-Ensiacet.

Ginolhac, A., Vilstrup, J., Stenderup, J., Rasmussen, M., Stiller, M., Shapiro, B., Zazula, G., Froese, D., Steinmann, K.E., Thompson, J.F., AL-Rasheid, K.A., Gilbert, T.M., Willerslev, E., Orlando, L., 2012. Improving the performance of true single molecule sequencing for ancient DNA. *BMC Genomics* 13, 177.

Glimcher, M.J., 1987. The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instr. Course Lect.* 36, 49–69.

Goldberg, M., 2008. *Histologie du complexe dentinopulpaire*. EMC - Stomatologie 1–34.

Götherström, A., Collins, M.J., Angerbjörn, A., Lidén, K., 2002. Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry* 44, 395–404.

Goulet, J., Cirimele, V., Kintz, P., A. Tracqui, Kaempfer, C., Ludes, B., n.d. Estimation de l'âge au décès par la racémisation de l'acide aspartique contenu dans les dents. Institut de Médecine Légale, Strasbourg.

Green, R.E., Krause, J., Briggs, A.W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., Patterson, N., Li, H., Zhai, W., Fritz, M.H.-Y., Hansen, N.F., Durand, E.Y., Malaspinas, A.-S., Jensen, J.D., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Prüfer, K., Meyer, M., Burbano, H.A., Good, J.M., Schultz, R., Aximu-Petri, A., Butthof, A., Höber, B., Höffner, B., Siegemund, M., Weihmann, A., Nusbaum, C., Lander, E.S., Russ, C., Novod, N., Affourtit, J., Egholm,

- M., Verna, C., Rudan, P., Brajkovic, D., Kucan, Ž., Gušić, I., Doronichev, V.B., Golovanova, L.V., Lalueza-Fox, C., Rasilla, M. de la, Fortea, J., Rosas, A., Schmitz, R.W., Johnson, P.L.F., Eichler, E.E., Falush, D., Birney, E., Mullikin, J.C., Slatkin, M., Nielsen, R., Kelso, J., Lachmann, M., Reich, D., Pääbo, S., 2010. A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science* 328, 710–722.
- Green, R.E., Krause, J., Ptak, S.E., Briggs, A.W., Ronan, M.T., Simons, J.F., Du, L., Egholm, M., Rothberg, J.M., Paunovic, M., Pääbo, S., 2006. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature* 444, 330–336.
- Grimes, V., Pellegrini, M., 2013. A comparison of pretreatment methods for the analysis of phosphate oxygen isotope ratios in bioapatite. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27, 375–390.
- Grimoud, A.M., Boubet-Mauger, M., Lodter, J.-P., 2004. Critères de sélection d'échantillons dentaires pour l'étude de l'ADN ancien. *Antropo* 6, 43–51.
- Grün, R., Aubert, M., Joannes-Boyau, R., Moncel, M.-H., 2008. High resolution analysis of uranium and thorium concentration as well as U-series isotope distributions in a Neanderthal tooth from Payre (Ardèche, France) using laser ablation ICP-MS. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72, 5278–5290.
- Reiche, I., Chadeaux, C., Müller, K., Gourrier, A., 2012. Towards a Better Understanding of Alteration Phenomena of Archaeological Bone by a Closer Look at the Organic/Mineral Association at Micro- and Nanoscale. Preliminary Results on Neolithic Samples from Chalain Lake Site 19, Jura, France. *ArchéoSciences* n° 35, 143–158.
- Gupta, S.S., Bhattacharyya, K.G., 2006. Adsorption of Ni(II) on clays. *J. Colloid Interface Sci.* 295, 21–32.

## H

- Hackett, C.J., 1981. Microscopical focal destruction (tunnels) in exhumed human bones. *Med. Sci. Law* 21, 243–265.
- Hagelberg, E., Bell, L.S., Allen, T., Boyde, A., Jones, S.J., Clegg, J.B., Hummel, S., Brown, T.A., Ambler, R.P., 1991. Analysis of Ancient Bone DNA: Techniques and Applications [and Discussion]. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 333, 399–407.
- Hagelberg, E., Clegg, J.B., 1991. Isolation and Characterization of DNA from Archaeological Bone. *Proc. Biol. Sci.* 244, 45–50.
- Hansen, A.J., 2006. Crosslinks Rather Than Strand Breaks Determine Access to Ancient DNA Sequences From Frozen Sediments. *Genetics* 173, 1175–1179.
- Haynes, S., Searle, J.B., Bretman, A., Dobney, K.M., 2002. Bone Preservation and Ancient DNA: The Application of Screening Methods for Predicting DNA Survival. *J. Archaeol. Sci.* 29, 585–592.

- Herrmann, B., Hummel, S., 1994. *Ancient DNA: Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimens*. Springer.
- Higgins, D., Austin, J.J., 2013. Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: A Review. *Sci. Justice* 53, 433–441.
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O.A., Wilson, A.C., 1984. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312, 282–284.
- Hiller, E., Čerňanský, S., Krascenits, Z., Milička, J., 2009. Effect of soil and sediment composition on acetochlor sorption and desorption. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 546–554.
- Hinz, E.A., Kohn, M.J., 2010. The effect of tissue structure and soil chemistry on trace element uptake in fossils. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74, 3213–3231.
- Ho, S.P., Yu, B., Yun, W., Marshall, G.W., Ryder, M.I., Marshall, S.J., 2009. Structure, chemical composition and mechanical properties of human and rat cementum and its interface with root dentin. *Acta Biomater.* 5, 707–718.
- Ho, Y.-S., McKay, G., 1999. Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochem.* 34, 451–465.
- Hofreiter, M., 2012. Nondestructive DNA Extraction from Museum Specimens, in: Shapiro, B., Hofreiter, M. (Eds.), *Ancient DNA, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, pp. 93–100.
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H.N., Kuch, M., Pääbo, S., 2001. Ancient DNA. *Nat. Rev. Genet.* 2, 353–359.
- Hoke, N., Burger, J., Weber, C., Benecke, N., Grupe, G., Harbeck, M., 2011. Estimating the chance of success of archaeometric analyses of bone: UV-induced bone fluorescence compared to histological screening. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 310, 23–31.
- Höss, M., Jaruga, P., Zastawny, T.H., Dizdaroglu, M., Paabo, S., 1996. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res.* 24, 1304–1307.
- Höss, M., Pääbo, S., 1993. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res.* 21, 3913–3914.
- Hosseinia, S., Drouet, C., Al-Kattan, A., Navrotsky, A., en cours de soumission. *Energetics of Lanthanide-Doped Calcium Phosphate Apatite*, en cours de publication.
- House, W.A., Denison, F.H., Armitage, P.D., 1995. Comparison of the uptake of inorganic phosphorus to a suspended and stream bed-sediment. *Water Res.* 29, 767–779.
- Hu, Y.-Y., Rawal, A., Schmidt-Rohr, K., 2010. Strongly bound citrate stabilizes the apatite nanocrystals in bone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 22425–22429.
- Hubbard, A.T., 2002. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science* -. CRC Press.

## I

- Iafisco, M., Sabatino, P., Lesci, I.G., Prat, M., Rimondini, L., Roveri, N., 2010. Conformational modifications of serum albumins adsorbed on different kinds of biomimetic hydroxyapatite nanocrystals. *Colloids Surf. B-Biointerfaces* 81, 274–284.
- Il, L.K., 1999. Glass microfiber column and method for the preparation and purification of plasmid dna using the same. WO1999051734 A1.
- Inoue, M.H., Oliveira, R.S., Jr, Regitano, J.B., Tormena, C.A., Constantin, J., Tornisielo, V.L., 2004. Sorption kinetics of atrazine and diuron in soils from southern Brazil. *J. Environ. Sci. Health B* 39, 589–601.
- Iyengar, G.V., Tandon, L., 1999. Minor and trace elements in human bones and teeth (No. Nahres-39). International Atomic Energy Agency, Vienna.

## J

- Jacques, L., Ogle, N., Moussa, I., Kalin, R., Vignaud, P., Brunet, M., Bocherens, H., 2008. Implications of diagenesis for the isotopic analysis of Upper Miocene large mammalian herbivore tooth enamel from Chad. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 266, 200–210.
- Jäger, C., Welzel, T., Meyer-Zaika, W., Epple, M., 2006. A solid-state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite. *Magn. Reson. Chem. MRC* 44, 573–580.
- Jeon, J.-H., Sung, W., 2013. An effective mesoscopic model of double-stranded DNA. *J. Biol. Phys.*
- Johnson, R.D., Arnold, F.H., 1995. The Temkin isotherm describes heterogeneous protein adsorption. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1247, 293–297.
- Johnsson, M., Richardson, C.F., Sallis, J.D., Nancollas, G.H., 1991. Adsorption and mineralization effects of citrate and phosphocitrate on hydroxyapatite. *Calcif. Tissue Int.* 49, 134–137.

## K

- Kabir, A., Hossain, M., Kumar, G.S., 2013. Thermodynamics of the DNA binding of biogenic polyamines: Calorimetric and spectroscopic investigations. *J. Chem. Thermodyn.* 57, 445–453.
- Kaiser, C., Bachmeier, B., Conrad, C., Nerlich, A., Bratzke, H., Eisenmenger, W., Peschel, O., 2008. Molecular study of time dependent changes in DNA stability in soil buried skeletal residues. *Forensic Sci. Int.* 177, 32–36.
- Kamoun, P., Lavoigne, A., Verneuil, H.H. de, 2003. *Biochimie et biologie moléculaire. Médecine Sciences Publications.*
- Kemp, B.M., Monroe, C., Judd, K.G., Reams, E., Grier, C., 2014. Evaluation of methods that subdue the effects of polymerase chain reaction inhibitors in the study of ancient and degraded DNA. *J. Archaeol. Sci.* 42, 373–380.

- Kemp, B.M., Smith, D.G., 2005. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci. Int.* 154, 53–61.
- Keyser, C., Bouakaze, C., Crubézy, E., Nikolaev, V.G., Montagnon, D., Reis, T., Ludes, B., 2009. Ancient DNA provides new insights into the history of south Siberian Kurgan people. *Hum. Genet.* 126, 395–410.
- Keyser-Tracqui, C., Crubezy, E., Ludes, B., 2003. Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 247–260.
- Keyser-Tracqui, C., Ludes, B., 2005. Methods for the study of ancient DNA. *Methods Mol Biol* 297, 253–264.
- Khesbak, H., Savchuk, O., Tsushima, S., Fahmy, K., 2011. The Role of Water H-Bond Imbalances in B-DNA Substate Transitions and Peptide Recognition Revealed by Time-Resolved FTIR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 5834–5842.
- Kinney, J.H., Pople, J.A., Marshall, G.W., Marshall, S.J., 2001. Collagen orientation and crystallite size in human dentin: a small angle X-ray scattering study. *Calcif. Tissue Int.* 69, 31–37.
- Kitayama, T., Ogawa, Y., Fujii, K., Nakahara, H., Mizuno, N., Sekiguchi, K., Kasai, K., Yurino, N., Yokoi, T., Fukuma, Y., Yamamoto, K., Oki, T., Asamura, H., Fukushima, H., 2010. Evaluation of a new experimental kit for the extraction of DNA from bones and teeth using a non-powder method. *Leg. Med.* 12, 84–89.
- Knuutila, M.L.E., Paunio, K.U., 1978. The interaction of collagenase with hydroxyapatite and related materials and enzymatic properties of the adsorbed enzyme. *Calcif. Tissue Res.* 25, 127–131.
- Kohn, M.J., Schoeninger, M.J., Barker, W.W., 1999. Altered states: effects of diagenesis on fossil tooth chemistry. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63, 2737–2747.
- Kolman, C.J., Tuross, N., 2000. Ancient DNA analysis of human populations. *Am. J. Phys. Anthropol.* 111, 5–23.
- Kolmas, J., Ślósarczyk, A., Wojtowicz, A., Kolodziejski, W., 2007. Estimation of the specific surface area of apatites in human mineralized tissues using  $^{31}\text{P}$  MAS NMR. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 32, 53–58.
- Kovaios, I.D., Paraskeva, C.A., Koutsoukos, P.G., 2011. Adsorption of atrazine from aqueous electrolyte solutions on humic acid and silica. *J. Colloid Interface Sci.* 356, 277–285.
- Krings, M., Stone, A., Schmitz, R.W., Krainitzki, H., Stoneking, M., Pääbo, S., 1997. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90, 19–30.

## L

- Lacan, M., 2011. La néolithisation du bassin méditerranéen : apports de l'ADN ancien (Thèse de doctorat). Université Paul Sabatier, Toulouse, France.

- Landis, W.J., Hodgens, K.J., Song, M.J., Arena, J., Kiyonaga, S., Marko, M., Owen, C., McEwen, B.F., 1996. Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging. *J. Struct. Biol.* 117, 24–35.
- Le Bras-Goude, G., 2007. Étude des modes de subsistance de populations néolithiques (VIe-IVe millénaires av. J.-C.) dans le nord-ouest de la Méditerranée. Approche par l'utilisation des isotopes stables ( $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{15}\text{N}$ ) du collagène. Université Sciences et Technologies-Bordeaux I.
- Lee, H.Y., Park, M.J., Kim, N.Y., Sim, J.E., Yang, W.I., Shin, K.-J., 2010. Simple and highly effective DNA extraction methods from old skeletal remains using silica columns. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4, 275–280.
- Lee, J., Tripathi, A., 2005. Intrinsic Viscosity of Polymers and Biopolymers Measured by Microchip. *Anal. Chem.* 77, 7137–7147.
- LeGeros, R.Z., Bonel, G., Legros, R., 1978. Types of “H<sub>2</sub>O” in human enamel and in precipitated apatites. *Calcif. Tissue Res.* 26, 111–118.
- Legros, R., 1984. Apport de la physico-chimie à l'étude de la phase minérale des tissus calcifiés (Thèse d'État). Institut national polytechnique, Toulouse, France.
- Leventouri, T., 2006. Synthetic and biological hydroxyapatites: Crystal structure questions. *Biomaterials* 27, 3339–3342.
- Li, B., Wu, P., Ruan, B., Liu, P., Zhu, N., 2014. Study on the adsorption of DNA on the layered double hydroxides (LDHs). *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 121, 387–393.
- Li, L., Stanforth, R., 2000. Distinguishing Adsorption and Surface Precipitation of Phosphate on Goethite ( $\alpha\text{-FeOOH}$ ). *J. Colloid Interface Sci.* 230, 12–21.
- Li, Y., Aparicio, C., 2013. Discerning the Subfibrillar Structure of Mineralized Collagen Fibrils: A Model for the Ultrastructure of Bone. *PLoS ONE* 8, e76782.
- Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–715.
- Lindahl, T., 1996. The Croonian Lecture, 1996: Endogenous Damage to DNA. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 351, 1529–1538.
- Lindahl, T., Nyberg, B., 1972. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry (Mosc.)* 11, 3610–3618.
- Liu, D. (Ed.), 2009. Handbook of nucleic acid purification. CRC Press, Boca Raton, Etats-Unis.
- López-Macipe, A., Gómez-Morales, J., Rodríguez-Clemente, R., 1998. The Role of pH in the Adsorption of Citrate Ions on Hydroxyapatite. *J. Colloid Interface Sci.* 200, 114–120.

- Loreille, O.M., Diegoli, T.M., Irwin, J.A., Coble, M.D., Parsons, T.J., 2007. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci. Int. Genet.* 1, 191–195.
- Lorenz, M.G., Wackernagel, W., 1987. Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2948–2952.
- Ludes, B., Pfitzinger, H., Mangin, P., 1993. DNA fingerprinting from tissues after variable postmortem periods. *J. Forensic Sci.* 38, 686–686.
- Lyman, R.L., 1994. *Vertebrate Taphonomy*. Cambridge University Press.
- Lysetskaya, M., Knoll, A., Boehringer, D., Hey, T., Krauss, G., Krausch, G., 2002. UV light-damaged DNA and its interaction with human replication protein A: an atomic force microscopy study. *Nucleic Acids Res.* 30, 2686–2691.

## M

- Mahmud, K., Islam, M.A., Mitsionis, A., Albanis, T., Vaimakis, T., 2012. Adsorption of direct yellow 27 from water by poorly crystalline hydroxyapatite prepared via precipitation method. *Desalination Water Treat.* 41, 170–178.
- Main, R.K., Wilkins, M.J., Cole, L.J., 1959. Partial chromatographic separation of pentose- and deoxypentose nucleic acids. *Science* 129, 331–332.
- Malmstrom, H., 2005. Extensive Human DNA Contamination in Extracts from Ancient Dog Bones and Teeth. *Mol. Biol. Evol.* 22, 2040–2047.
- Marinho, A.N. do R., Miranda, N.C., Braz, V., Ribeiro-dos-Santos, Â.K., Souza, S.M.F.M. de, 2006. Paleogenetic and taphonomic analysis of human bones from Moa, Beirada, and Zé Espinho Sambaquis, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 15–23.
- McDowell, H., Gregory, T.M., Brown, W.E., 1977. Solubility of Ca<sub>5</sub>(P<sub>04</sub>)<sub>3</sub>OH in the System Ca(OH)<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>P<sub>04</sub>-H<sub>2</sub>O at 5, 15, 25, and 37 C. *J Res Natl Bur Stand. A* 81, 273–281.
- McElderry, J.-D.P., Zhu, P., Mroue, K.H., Xu, J., Pavan, B., Fang, M., Zhao, G., McNerny, E., Kohn, D.H., Franceschi, R.T., Holl, M.M.B., Tecklenburg, M.M.J., Ramamoorthy, A., Morris, M.D., 2013. Crystallinity and compositional changes in carbonated apatites: Evidence from <sup>31</sup>P solid-state NMR, Raman, and AFM analysis. *J. Solid State Chem.* 206, 192–198.
- Meinke, D.K., Skinner, H.C.W., Thomson, K.S., 1979. X-ray diffraction of the calcified tissues in *Polypterus*. *Calcif. Tissue Int.* 28, 37–42.
- Mello, M.L.S., Vidal, B.C., 2012. Changes in the Infrared Microspectroscopic Characteristics of DNA Caused by Cationic Elements, Different Base Richness and Single-Stranded Form. *PLoS ONE* 7, e43169.
- Melzak, K.A., Sherwood, C.S., Turner, R.F.B., Haynes, C.A., 1996. Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 181, 635–644.

- Mendisco, F., 2011. Apports de la paléogénétique à l'histoire du peuplement précolombien des Andes méridionales (Vème–XVème siècles). Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Meyer, M., Fu, Q., Aximu-Petri, A., Glocke, I., Nickel, B., Arsuaga, J.-L., Martínez, I., Gracia, A., de Castro, J.M.B., Carbonell, E., Pääbo, S., 2013. A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos. *Nature* 505, 403–406.
- Meyer, M., Kircher, M., Gansauge, M.-T., Li, H., Racimo, F., Mallick, S., Schraiber, J.G., Jay, F., Prüfer, K., Filippo, C. de, Sudmant, P.H., Alkan, C., Fu, Q., Do, R., Rohland, N., Tandon, A., Siebauer, M., Green, R.E., Bryc, K., Briggs, A.W., Stenzel, U., Dabney, J., Shendure, J., Kitzman, J., Hammer, M.F., Shunkov, M.V., Derevianko, A.P., Patterson, N., Andrés, A.M., Eichler, E.E., Slatkin, M., Reich, D., Kelso, J., Pääbo, S., 2012. A High-Coverage Genome Sequence from an Archaic Denisovan Individual. *Science* 338, 222–226.
- Mills, J.B., Hagerman, P.J., 2004. Origin of the intrinsic rigidity of DNA. *Nucleic Acids Res.* 32, 4055–4059.
- Misra, D.N., 1993. Adsorption of low-molecular-weight sodium polyacrylate on hydroxyapatite. *J. Dent. Res.* 72, 1418–1422.
- Montel, G., Bonel, G., Trombe, J.-C., Heughebaert, J.-C., Rey, C., 1980. Progres dans le domaine de la chimie des composés phosphores solides à structure d'apatite. Application à la biologie et au traitement des minerais. *Pure Appl Chem* 52, 973–987.
- Moreno, E.C., Kresak, M., Hay, D.I., 1984. Adsorption of molecules of biological interest onto hydroxyapatite. *Calcif. Tissue Int.* 36, 48–59.
- Moreno, E.C., Kresak, M., Zahradnik, R.T., 1974. Fluoridated Hydroxyapatite Solubility and Caries Formation. *Nature* 247, 64–65.
- Mount, G.J., Hume, W.R., 2002. Préservation et restauration de la structure dentaire. De Boeck Supérieur.
- Mrevlishvili, G.M., Carvalho, A., da Silva, M.R., Mdzinarashvili, T.D., Razmadze, G.Z., Tarielashvili, T.Z., 2001. The role of bound water on the energetics of DNA duplex melting. *J. Therm. Anal. Calorim.* 66, 133–144.
- Mundorff, A., Davoren, J.M., 2014. Examination of DNA yield rates for different skeletal elements at increasing post mortem intervals. *Forensic Sci. Int. Genet.* 8, 55–63.
- Murgia, M., Pizzo, P., Sandoná, D., Zanovello, P., Rizzuto, R., Virgilio, F.D., 1992. Mitochondrial DNA is not fragmented during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 267, 10939–10941.

## N

- Naimushin, A.N., Fujimoto, B.S., Schurr, J.M., 2000. Dynamic Bending Rigidity of a 200-bp DNA in 4mM Ionic Strength: A Transient Polarization Grating Study. *Biophys. J.* 78, 1498–1518.

- Neidle, S., 1999. Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure. Oxford University Press.
- Nielsen-Marsh, C.M., Hedges, R.E., 2000. Patterns of Diagenesis in Bone I: The Effects of Site Environments. *J. Archaeol. Sci.* 27, 1139–1150.
- Nielsen-Marsh, C.M., A.M.G., 2000. The chemical degradation of bone.
- Norde Willem, Haynes Charles A., 1995. Reversibility and the Mechanism of Protein Adsorption, in: *Proteins at Interfaces II*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 26–40.

## O

- O'Rourke, D.H., Carlyle, S.W., Parr, R.L., 1996. Ancient DNA: Methods, progress, and perspectives. *Am. J. Hum. Biol.* 8, 557–571.
- Ogram, A.V., Mathot, M.L., Harsh, J.B., Boyle, J., Pettigrew, C.A., 1994. Effects of DNA polymer length on its adsorption to soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 393–396.
- Okazaki, M., Yoshida, Y., Yamaguchi, S., Kaneno, M., Elliott, J.C., 2001. Affinity binding phenomena of DNA onto apatite crystals. *Biomaterials* 22, 2459–2464.
- Orlando, L., Darlu, P., Toussaint, M., Bonjean, D., Otte, M., Hänni, C., 2006. Revisiting Neandertal diversity with a 100,000 year old mtDNA sequence. *Curr. Biol. CB* 16, R400–402.
- Orlando, L., Ginolhac, A., Raghavan, M., Vilstrup, J., Rasmussen, M., Magnussen, K., Steinmann, K.E., Kapranov, P., Thompson, J.F., Zazula, G., Froese, D., Moltke, I., Shapiro, B., Hofreiter, M., Al-Rasheid, K.A.S., Gilbert, M.T.P., Willerslev, E., 2011. True single-molecule DNA sequencing of a pleistocene horse bone. *Genome Res.* 21, 1705–1719.
- Orlando, L., Hänni, C., 2000. Du nouveau pour l'ADN ancien.
- Ouizat, S., Barroug, A., Legrouri, A., Rey, C., 1999. Adsorption of bovine serum albumin on poorly crystalline apatite: influence of maturation. *Mater. Res. Bull.* 34, 2279–2289.
- Ozawa, T., 1997. Oxidative damage and fragmentation of mitochondrial DNA in cellular apoptosis. *Biosci. Rep.* 17, 237–250.

## P

- Paabo, S., 1989. Ancient DNA: Extraction, Characterization, Molecular Cloning, and Enzymatic Amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 1939–1943.
- Pääbo, S., 1985. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314, 644–645.
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Després, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L., Hofreiter, M., 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.* 38, 645–679.
- Pascaud, P., Gras, P., Coppel, Y., Rey, C., Sarda, S., 2013. Interaction between a Bisphosphonate, Tiludronate, and Biomimetic Nanocrystalline Apatites. *Langmuir* 29, 2224–2232.

- Paschalis, E.P., Betts, F., DiCarlo, E., Mendelsohn, R., Boskey, A.L., 1997. FTIR microspectroscopic analysis of normal human cortical and trabecular bone. *Calcif. Tissue Int.* 61, 480–486.
- Pearce, E.I.F., 1981. Ion displacement following the adsorption of anionic macromolecules on hydroxyapatite. *Calcif. Tissue Int.* 33, 395–402.
- Perumal, S., Antipova, O., Orgel, J.P.R.O., 2008. Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical conformation govern its proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 2824–2829.
- Phillips, R., Kondev, J., Theriot, J., Garcia, H.G., 2012. *Physical Biology of the Cell*. Taylor & Francis Group.
- Piepenbrink, H., 1989. Examples of chemical changes during fossilisation. *Appl. Geochem.* 4, 273–280.
- Podesta, A., Indrieri, M., Brogioli, D., Manning, G.S., Milani, P., Guerra, R., Finzi, L., Dunlap, D., 2005. Positively Charged Surfaces Increase the Flexibility of DNA. *Biophys. J.* 89, 2558–2563.
- Poinar, H.N., Hoss, M., Bada, J.L., Paabo, S., 1996. Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* 272, 864–866.
- Poinar, H.N., Stankiewicz, B.A., 1999. Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 8426–8431.
- Pollard, T.D., Earnshaw, W.C., 2004. *Biologie cellulaire*. Elsevier Masson.
- Porsch, B., Laga, R., Horský, J., Koňák, C., Ulbrich, K., 2009. Molecular Weight and Polydispersity of Calf-Thymus DNA: Static Light-Scattering and Size-Exclusion Chromatography with Dual Detection. *Biomacromolecules* 10, 3148–3150.
- Posner, A.S., Blumenthal, N.C., Boskey, A.L., Betts, F., 1975. Synthetic Analogue of Bone Mineral Formation. *J. Dent. Res.* 54, B88–B93.
- Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G., Gabai, V.L., 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* 283, 1–16.
- Pruvost, M., Schwarz, R., Correia, V.B., Champlot, S., Braguier, S., Morel, N., Fernandez-Jalvo, Y., Grange, T., Geigl, E.-M., 2007. Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 739–744.

## Q

- Qin, X., Liu, F., Wang, G., 2012. Fractionation and kinetic processes of humic acid upon adsorption on colloidal hematite in aqueous solution with phosphate. *Chem. Eng. J.* 209, 458–463.

**R**

- Rankin, D.R., Narveson, S.D., Birkby, W.H., Lai, J., 1996. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis on DNA from human compact bone. *J. Forensic Sci.* 41, 40–46.
- Rawls, H.R., Cabasso, I., 1984. Adsorption of Phosphorylated Polyelectrolytes on Hydroxyapatite, in: Misra, D.N. (Ed.), *Adsorption on and Surface Chemistry of Hydroxyapatite*. Springer US, pp. 115–128.
- Razmovski, R., Šćiban, M., 2008. Biosorption of Cr(VI) and Cu(II) by waste tea fungal biomass. *Ecol. Eng.* 34, 179–186.
- Reich, D., Green, R.E., Kircher, M., Krause, J., Patterson, N., Durand, E.Y., Viola, B., Briggs, A.W., Stenzel, U., Johnson, P.L.F., Maricic, T., Good, J.M., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Fu, Q., Mallick, S., Li, H., Meyer, M., Eichler, E.E., Stoneking, M., Richards, M., Talamo, S., Shunkov, M.V., Derevianko, A.P., Hublin, J.-J., Kelso, J., Slatkin, M., Pääbo, S., 2010. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature* 468, 1053–1060.
- Reiche, I., Chadeaux, C., Müller, K., Gourrier, A., 2012. Towards a Better Understanding of Alteration Phenomena of Archaeological Bone by a Closer Look at the Organic/Mineral Association at Micro- and Nanoscale. Preliminary Results on Neolithic Samples from Chalain Lake Site 19, Jura, France. *ArchéoSciences* n° 35, 143–158.
- Reihls, T., Müller, M., Lunkwitz, K., 2004. Preparation and adsorption of refined polyelectrolyte complex nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 271, 69–79.
- Rey, C., 1984. Étude des relations entre apatites et composés moléculaires (Thèse Etat). Institut national polytechnique, Toulouse, France.
- Rey, C., Combes, C., Drouet, C., Lebugle, A., Sfihi, H., Barroug, A., 2007. Nanocrystalline apatites in biological systems: characterisation, structure and properties. *Mater. Werkst.* 38, 996–1002.
- Rey, C., Hina, A., Tofighi, A., Glimcher, M.J., 1995. Maturation of poorly crystalline apatites: Chemical and structural aspects in vivo and in vitro. *Cells Mater.* 5, 345–356.
- Rey, C., Lian, J., Grynopas, M., Shapiro, F., Zylberberg, L., Glimcher, M.J., 1989. Non-apatitic environments in bone mineral: FT-IR detection, biological properties and changes in several disease states. *Connect. Tissue Res.* 21, 267–273.
- Rey, C., Shimizu, M., Collins, B., Glimcher, M.J., 1990. Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium-phosphate in bone and enamel, and their evolution with age. I: Investigations in the 4 PO<sub>4</sub> domain. *Calcif. Tissue Int.* 46, 384–394.
- Rey, C., Shimizu, M., Collins, B., Glimcher, M.J., 1991. Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age: 2. Investigations in the 3 PO<sub>4</sub> domain. *Calcif. Tissue Int.* 49, 383–388.

- Rey C., Strawich E., Glimcher M.J., 1994. Non-apatitic environments in Ca–P biominerals. Implications in reactivity of the mineral phase and its interactions with the organic matrix constituents, *Bull. Inst. Océanogr. Monaco* 14, 55–64 (special issue).
- Ritchie, A.G., 1997. Alternative to the Elovich equation for kinetics of adsorption of gases on solids. *J Chem Soc Faraday Trans* 73, 1650–1653.
- Roberts, J.E., Bonar, L.C., Griffin, R.G., Glimcher, M.J., 1992. Characterization of very young mineral phases of bone by solid state  $^{31}\text{P}$  phosphorus magic angle sample spinning nuclear magnetic resonance and X-ray diffraction. *Calcif. Tissue Int.* 50, 42–48.
- Roche, D., Ségalen, L., Balan, E., Delattre, S., 2010. Preservation assessment of Miocene–Pliocene tooth enamel from Tugen Hills (Kenyan Rift Valley) through FTIR, chemical and stable-isotope analyses. *J. Archaeol. Sci.* 37, 1690–1699.
- Rohland, N., Hofreiter, M., 2007a. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat. Protoc.* 2, 1756–1762.
- Rohland, N., Hofreiter, M., 2007b. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques* 42, 343–352.
- Rölla, G., Melsen, B., 1975. Desorption of protein and bacteria from hydroxyapatite by fluoride and monofluorophosphate. *Caries Res.* 9, 66–73.
- Rollin-Martinet, S., 2011. Développement de nouvelles biocéramiques par consolidation à basse température d'apatites nanocristallines biomimétiques. Université de Limoges.
- Rollin-Martinet, S., Navrotsky, A., Champion, E., Grossin, D., Drouet, C., 2013. Thermodynamic basis for evolution of apatite in calcified tissues. *Am. Mineral.* 98, 2037–2045.
- Romanowski, G., Lorenz, M.G., Wackernagel, W., 1991. Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1057–1061.
- Roveri, N., Iafisco, M., 2011. The Biomimetic Approach to Design Apatites for Nanobiotechnological Applications, in: *Advances in Biomimetics*. Prof. Marko Cavrak.
- Rudbeck, L., Gilbert, M.T.P., Willerslev, E., Hansen, A.J., Lynnerup, N., Christensen, T., Dissing, J., 2005. mtDNA analysis of human remains from an early Danish Christian cemetery. *Am. J. Phys. Anthropol.* 128, 424–429.
- Rudiuk, S., 2009. Complexation entre l'ADN et des tensioactifs cationiques: études physico-chimiques et photobiologiques. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Ruysen, R., Molle, L., 1965. *Principes de chimie physique: à l'usage des pharmaciens et biologistes*, par R. Ruysen [et] L. Molle. Masson.

## S

- Saeki, K., Ihyo, Y., Sakai, M., Kunito, T., 2011. Strong adsorption of DNA molecules on humic acids. *Environ. Chem. Lett.* 9, 505–509.

- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350–1354.
- Salamon, M., Tuross, N., Arensburg, B., Weiner, S., 2005. Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 13783–13788.
- Sallek, B., Lebugle, A., 1993. Les phosphates de calcium, supports potentiels de médicaments implantables : étude de leurs mécanismes de dissolution et d'adsorption (Text). Institut national polytechnique de Toulouse, Toulouse, France.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press.
- Sanchez-Navas, A., Martin-Algarra, A., Sanchez-, M., Jimenez-Lopez, C., Nieto, F., Ruiz-Bustos, A., 2013. Crystal Growth of Inorganic and Biomediated Carbonates and Phosphates, in: Ferreira, S. (Ed.), *Advanced Topics on Crystal Growth*. InTech.
- Sankararaman, S., Patterson, N., Li, H., Pääbo, S., Reich, D., 2012. The Date of Interbreeding between Neandertals and Modern Humans. *PLoS Genet* 8, e1002947.
- Saoudi, B., Jammul, N., Abel, M.-L., Chehimi, M.M., Dodin, G., 1997. DNA adsorption onto conducting polypyrrole. *Synth. Met.* 87, 97–103.
- Scherrer, P., 1918. Bestimmung der Größe und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen. *Nachrichten Von Ges. Wiss. Zu Gött. Math.-Phys. Kl.* 1918, 98–100.
- Sciascia, L., Turco Liveri, M.L., Merli, M., 2011. Kinetic and equilibrium studies for the adsorption of acid nucleic bases onto K10 montmorillonite. *Appl. Clay Sci.* 53, 657–668.
- Scruggs, R.L., Ross, P.D., 1964. Viscosity study of DNA. *Biopolymers* 2, 593–609.
- Serre, D., Langaney, A., Chech, M., Teschler-Nicola, M., Paunovic, M., Menecier, P., Hofreiter, M., Possnert, G., Pääbo, S., 2004. No Evidence of Neandertal mtDNA Contribution to Early Modern Humans. *PLoS Biol* 2, e57.
- Shakespeare, W., 1592. *The Life and Death of King Richard the Third*.
- Shannon, R.D., Prewitt, C.T., 1969. Effective ionic radii in oxides and fluorides. *Acta Crystallogr. B* 25, 925–946.
- Shew, C.-Y., Yethiraj, A., 2002. Integral equation theory for the structure of DNA solutions. *J. Chem. Phys.* 116, 5308.
- Shrotri, S., Harris, C.C., Huang, L., Somasundaran, P., 1998. A graphical technique for calculating adsorption/desorption isotherms for different solid/liquid ratios. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 141, 189–192.
- Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O., 2008. *Biomineralization: From Nature to Application*. John Wiley & Sons.

- Silvan, M.M., Hernandez, M.A., Costa, V.T., Palma, R.J.M., Duarte, J.M.M., 2006. Structured porous silicon sub-micrometer wells grown by colloidal lithography. *EPL Europhys. Lett.* 76, 690.
- Simmer, J.P., Fincham, A.G., 1995. Molecular Mechanisms of Dental Enamel Formation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 6, 84–108.
- Sims, N.A., Martin, T.J., 2014. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKEY Rep.* 3.
- Skodras, G., Diamantopoulou, I., Pantoleonos, G., Sakellaropoulos, G.P., 2008. Kinetic studies of elemental mercury adsorption in activated carbon fixed bed reactor. *J. Hazard. Mater.* 158, 1–13.
- Smith, A.L., 1960. Infrared spectra-structure correlations for organosilicon compounds. *Spectrochim. Acta* 16, 87–105.
- Smith, C.I., Chamberlain, A.T., Riley, M.S., Cooper, A., Stringer, C.B., Collins, M.J., 2001. Neanderthal DNA: Not just old but old and cold? *Nature* 410, 771–772.
- Smith, C.I., Chamberlain, A.T., Riley, M.S., Stringer, C., Collins, M.J., 2003. The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *J. Hum. Evol.* 45, 203–217.
- Smith, C.I., Craig, O.E., Prigodich, R.V., Nielsen-Marsh, C.M., Jans, M.M.E., Vermeer, C., Collins, M.J., 2005. Diagenesis and survival of osteocalcin in archaeological bone. *J. Archaeol. Sci.* 32, 105–113.
- Sosa, C., Vispe, E., Nunez, C., Baeta, M., Casalod, Y., Bolea, M., Hedges, R.E.M., Martinez-Jarreta, B., 2013. Association between ancient bone preservation and dna yield: A multidisciplinary approach. *Am. J. Phys. Anthropol.* 151, 102–109.
- Spotheim-Maurizot, M., Begusova, M., Charlier, M., 2003. DNA damaging by ionising radiations. Influence of the structure and of the environment. *Actual. Chim.* 97–102.
- Stott, A., Evershed, R., Jim, S., Jones, V., Rogers, J., Tuross, N., Ambrose, S., 1999. Cholesterol as a New Source of Palaeodietary Information: Experimental Approaches and Archaeological Applications. *J. Archaeol. Sci.* 26, 705–716.
- Stutz, A.J., 2002. Polarizing Microscopy Identification of Chemical Diagenesis in Archaeological Cementum. *J. Archaeol. Sci.* 29, 1327–1347.
- Sumner, M.E., 1999. *Handbook of Soil Science*. CRC Press.

## T

- Takeshita, T., Matsuura, Y., Arakawa, S., Okamoto, M., 2013. Biomineralization of Hydroxyapatite on DNA Molecules in SBF: Morphological Features and Computer Simulation. *Langmuir* 29, 11975–11981.
- Tanaka, H., Miyajima, K., Nakagaki, M., Shimabayashi, S., 1991a. Incongruent dissolution of hydroxyapatite in the presence of phosphoserine. *Colloid Polym. Sci.* 269, 161–165.

- Tanaka, H., Miyajima, K., Nakagaki, M., Shimabayashi, S., 1991b. Incongruent dissolution of hydroxyapatite in the presence of phosphoserine. *Colloid Polym. Sci.* 269, 161–165.
- Temkin, M., Pyzhev, V., 1940. Kinetics of ammonia synthesis on promoted iron catalysts. *Acta Physicochim* 327–356.
- Thèves, C., 2006. Recherche de mutations ponctuelles de l'ADN mitochondrial dans l'os pour une détermination de l'âge. Ecole des Hautes Etudes en Sciences Sociales (EHESS).
- Thomas, J.M., Thomas, W.J., 1996. Principles and practice of heterogeneous catalysis. VCH, New York, Etats-Unis.
- Tiainen, P., Gustavsson, P.-E., Månsson, M.-O., Larsson, P.-O., 2007. Plasmid purification using non-porous anion-exchange silica fibres. *J. Chromatogr. A* 1149, 158–168.
- Tomić, S., Grgičin, D., Ivek, T., Vuletić, T., Dolanski Babić, S., Podgornik, R., 2012. Dynamics and structure of biopolyelectrolytes in repulsion regime characterized by dielectric spectroscopy. *Phys. B Condens. Matter* 407, 1958–1963.
- Torrent, J., 1987. Rapid and Slow Phosphate Sorption by Mediterranean Soils: Effect of Iron Oxides I. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51, 78.
- Trabuco, L., Villa, E., n.d. VMD Case Study: DNA [WWW Document]. Theor. Comput. Biophys. Group. URL <http://www-s.ks.uiuc.edu/Training/CaseStudies/pdfs/dna.pdf> (accessed 12.19.13).
- Tran-Hung, L., Tran-Thi, N., Aboudharam, G., Raoult, D., Drancourt, M., 2007. A New Method to Extract Dental Pulp DNA: Application to Universal Detection of Bacteria. *PLoS ONE* 2, e1062.
- Trasatti, S., Formaro, L., 1968. Kinetics and mechanism of the adsorption of glycolaldehyde on a smooth platinum electrode. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 17, 343–364.
- Trouillet, F., 2009. En quoi consiste la datation isotopique ? [WWW Document]. URL <http://aces.ens-lyon.fr/aces/terre/limites/Temps/datation-isotopique/comprendre/application-a-la-datation> (accessed 11.3.13).
- Trueman, C.N., Behrensmeyer, A.K., Potts, R., Tuross, N., 2006. High-resolution records of location and stratigraphic provenance from the rare earth element composition of fossil bones. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70, 4343–4355.
- Trueman, C.N., Palmer, M.R., Field, J., Privat, K., Ludgate, N., Chavagnac, V., Eberth, D.A., Cifelli, R., Rogers, R.R., 2008. Comparing rates of recrystallisation and the potential for preservation of biomolecules from the distribution of trace elements in fossil bones. *Comptes Rendus Palevol* 7, 145–158.
- Trueman, C.N., Tuross, N., 2002. Trace Elements in Recent and Fossil Bone Apatite. *Rev. Mineral. Geochem.* 48, 489–521.

- Trueman, C.N., Behrensmeyer, A.K., Tuross, N., Weiner, S., 2004. Mineralogical and compositional changes in bones exposed on soil surfaces in Amboseli National Park, Kenya: diagenetic mechanisms and the role of sediment pore fluids. *J. Archaeol. Sci.* 31, 721–739.
- Tsortos, A., Papadakis, G., Gizeli, E., 2011. The intrinsic viscosity of linear DNA. *Biopolymers* 95, 824–832.
- Turner-Walker, G., Jans, M., 2008. Reconstructing taphonomic histories using histological analysis. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 266, 227–235.
- Tuross, N., 1994. The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia* 50, 530–535.
- Tuross, N., 2002. Alterations in fossil collagen. *Archaeometry* 44, 427–434.
- Tütken, T., Vennemann, T.W., 2011. Fossil bones and teeth: Preservation or alteration of biogenic compositions? *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 310, 1–8.
- Tütken, T., Vennemann, T.W., Pfretzschner, H.-U., 2008. Early diagenesis of bone and tooth apatite in fluvial and marine settings: Constraints from combined oxygen isotope, nitrogen and REE analysis. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 266, 254–268.

## V

- Vandecandelaere, N., Rey, C., Drouet, C., 2012. Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23, 2593–2606.
- Vandeventer, P.E., Lin, J.S., Zwang, T.J., Nadim, A., Johal, M.S., Niemz, A., 2012. Multiphasic DNA Adsorption to Silica Surfaces under Varying Buffer, pH, and Ionic Strength Conditions. *J. Phys. Chem. B* 116, 5661–5670.
- Vannice, M.A., 2005. Kinetics of catalytic reactions. Springer, New York.
- Vass, A.A., 2001. Beyond the grave—understanding human decomposition. *Microbiol. Today* 28, 190–193.
- Voet, D., Voet, J.G., 2005. Biochimie. De Boeck Supérieur.

## W

- Wang, L., Ferrari, M., Bloomfield, V.A., 1990. Large-scale preparation of mononucleosomal DNA from calf thymus for biophysical studies. *BioTechniques* 9, 24, 26–27.
- Wang, Y., 2012. Elaboration de modèles collagène/apatite pour l'étude de la biominéralisation du tissu osseux. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
- Warriss, P.D., 2010. Meat Science: An Introductory Text. CABI.
- Watanabe, T., Makitsuru, K., Nakazawa, H., Hara, S., Suehiro, T., Yamamoto, A., Hiraide, T., Ogawa, T., 1999. Separation of double-strand DNA fragments by high-performance liquid chromatography using a ceramic hydroxyapatite column. *Anal. Chim. Acta* 386, 69–75.

- Weiner, S., Veis, A., Beniash, E., Arad, T., Dillon, J.W., Sabsay, B., Siddiqui, F., 1999. Peritubular dentin formation: crystal organization and the macromolecular constituents in human teeth. *J. Struct. Biol.* 126, 27–41.
- Wiggins, P.A., van der Heijden, T., Moreno-Herrero, F., Spakowitz, A., Phillips, R., Widom, J., Dekker, C., Nelson, P.C., 2006. High flexibility of DNA on short length scales probed by atomic force microscopy. *Nat. Nanotechnol.* 1, 137–141.
- Wilczak, A., Keinath, T.M., 1993. Kinetics of Sorption and Desorption of Copper(II) and Lead(II) on Activated Carbon. *Water Environ. Res.* 65, 238–244.
- Williams, N.H., 2004. DNA Hydrolysis: Mechanism and Reactivity, in: *Artificial Nucleases*. Springer, pp. 3–17.
- Wilson, L., Pollard, A.M., 2002. Here Today, Gone Tomorrow? Integrated Experimentation and Geochemical Modeling in Studies of Archaeological Diagenetic Change. *Acc. Chem. Res.* 35, 644–651.
- Wiśniewska, M., 2012. The temperature effect on the adsorption mechanism of polyacrylamide on the silica surface and its stability. *Appl. Surf. Sci.* 258, 3094–3101.
- Wopenka, B., Pasteris, J.D., 2005. A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Mater. Sci. Eng. C* 25, 131–143.
- Wu, F.-C., Tseng, R.-L., Juang, R.-S., 2009. Characteristics of Elovich equation used for the analysis of adsorption kinetics in dye-chitosan systems. *Chem. Eng. J.* 150, 366–373.
- Wu, Y., Glimcher, M.J., Rey, C., Ackerman, J.L., 1994. A Unique Protonated Phosphate Group in Bone Mineral Not Present in Synthetic Calcium Phosphates: Identification by Phosphorus-31 Solid State NMR Spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 244, 423–435.
- Wyss, C., Cherix, D., 2006. *Traité d'entomologie forensique: les insectes sur la scène de crime*. PPUR presses polytechniques.

## X

- Xu, L., Lv, J., Ling, L., Wang, P., Song, P., Su, R., Zhu, G., 2011. Altered nucleic acid partitioning during phenol extraction or silica adsorption by guanidinium and potassium salts. *Anal. Biochem.* 419, 309–316.

## Y

- Young, R.A., 1974. Implications of Atomic Substitutions and Other Structural Details in Apatites. *J. Dent. Res.* 53, 193–203.
- Yu, S., Geng, J., Zhou, P., Wang, J., Chen, X., Hu, J., 2008. New hydroxyapatite monolithic column for DNA extraction and its application in the purification of *Bacillus subtilis* crude lysate. *J. Chromatogr. A* 1183, 29–37.
- Yuh-Shan, H., 2004. Citation review of Lagergren kinetic rate equation on adsorption reactions. *Scientometrics* 59, 171–177.

**Z**

- Zazzo, A., Lécuyer, C., Mariotti, A., 2004. Experimentally-controlled carbon and oxygen isotope exchange between bioapatites and water under inorganic and microbially-mediated conditions. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 1–12.
- Zazzo, A., Saliège, J.-F., 2011. Radiocarbon dating of biological apatites: A review. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 310, 52–61.
- Zhang, M., Powell, H.V., Mackenzie, S.R., Unwin, P.R., 2010. Kinetics of Porphyrin Adsorption and DNA-Assisted Desorption at the Silica–Water Interface. *Langmuir* 26, 4004–4012.
- Zhang, R., Wang, B., Ma, H., 2010. Studies on Chromium (VI) adsorption on sulfonated lignite. *Desalination* 255, 61–66.
- Zhang, X., Servos, M.R., Liu, J., 2012. Surface Science of DNA Adsorption onto Citrate-Capped Gold Nanoparticles. *Langmuir* 28, 3896–3902.
- Zhuo-hua, W., Hong-hao, L., Hui-wen, M., 2000. Recovery of DNA from agarose gel with home-made silica milk. *Wuhan Univ. J. Nat. Sci.* 5, 373–376.
- Zhuravlev, L.T., 2000. The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 173, 1–38.

## **ANNEXES**

## A ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

### 1 Diffraction des rayons X sur poudre

Les analyses de diffraction des rayons X ont été réalisées au moyen d'un diffractomètre à compteur courbe CPS 120 INEL, couplé à un analyseur et un ordinateur permettant l'acquisition du signal via le logiciel *Symphonix*. Les diagrammes des apatites nanocristallines et des échantillons biologiques ont été obtenus après une exposition de 15 heures au rayonnement émis par une anticathode de cobalt. Le générateur fournit un courant d'intensité 30 mA et de tension 45 kV. La poudre est disposée dans un portoir sans compression et placé sur une plateforme rotative, afin de limiter les phénomènes d'orientation préférentielle.

L'estimation de la taille moyenne des cristallites d'après les diffractogrammes a été réalisée à l'aide de la formule de Scherrer (Scherrer, 1918) en utilisant la largeur à mi-hauteur  $\Delta_r$  des raies (002) et (310). Ces raies fournissent respectivement des indications sur la dimension des cristallites selon l'axe  $c$  (longueur) et selon une dimension perpendiculaire à la précédente (compromis entre la largeur et l'épaisseur). La formule de Scherrer s'écrit :

$$L(h, k, l) = \frac{0,94 \lambda}{\cos \theta \sqrt{\Delta_r^2 + \Delta_0^2}}$$

avec :

$L$ , taille apparente dans la direction perpendiculaire au plan de diffraction  $hkl$  ( $\pm 3\text{\AA}$ )

0,94, constante de Scherrer

$\lambda$ , longueur d'onde du rayonnement X (pour le cobalt  $\lambda_{\text{CoK}\alpha}=1,78892$  (INEL), pour le cuivre,  $\lambda_{\text{CuK}\alpha}=1,5418\text{\AA}$ )

$\Delta_r$ , largeur d'une raie de diffraction de l'échantillon (radians)

$\Delta_0$ , largeur de la même raie d'une hydroxyapatite bien cristallisée (radians)

## **2 Analyses chimiques**

### **2.1 Préparation de la solution mère pour le dosage du calcium et des ions phosphate**

#### **2.1.1 Echantillons synthétiques**

Les poudres d'apatite synthétique sont dissoutes en milieu acide : 100 mg de solide sont dissous à l'aide d'1 mL d'acide perchlorique HClO<sub>4</sub> 6M dans une fiole de 100 mL, dont le volume est complété avec de l'eau désionisée.

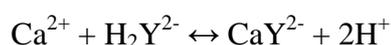
#### **2.1.2 Echantillons osseux ou dentaires (estimation de la quantité de matière organique)**

Les broyats d'os et de dents envoyés par le laboratoire d'Anthropologie Moléculaire de Strasbourg (Institut de Médecine Légale, Faculté de Médecine, Strasbourg) ont été cryobroyés à nouveau à l'aide du cryobroyeur Spex 5010 en présence d'azote liquide (5 minutes à intensité modérée). Cette poudre a ensuite été solubilisée par 1 à 3 mL d'HClO<sub>4</sub> en fonction de la difficulté à dissoudre le composé. Cette solution est ensuite filtrée à l'aide d'un filtre nylon monté sur seringue (seuil de filtration 0,45µm, diamètre 25 mm) préalablement pesé. Après mise à l'étuve (1 nuit à 50°C), les filtres usagés sont pesés après retour à température ambiante. La différence de masse entre le filtre usagé et le filtre neuf est indicative de la quantité de matière organique insoluble à l'acide contenu dans l'échantillon.

### **2.2 Dosage du calcium**

#### **2.2.1 Volumétrie en retour**

La quantité d'ions calcium dans la solution mère est déterminée par un dosage complexométrique en retour. L'agent complexant est l'EDTA (solution commerciale concentrée à 0,05M), qui complexe le calcium selon la réaction équilibrée :



L'équilibre est déplacé vers la complexation par l'addition de NH<sub>4</sub>OH 20% ; l'EDTA est ajouté en excès dans le milieu. La solution d'EDTA commerciale est préalablement dosée à l'aide d'une solution de chlorure de zinc de concentration connue grâce à une burette automatique pour vérification. L'excès d'EDTA est ensuite titré par la même méthode.

L'indicateur coloré de virage est le noir d'eriochrome triéthanolamine qui vire du bleu au rose. La précision du dosage est de l'ordre de 0,5% massique.

### **2.2.2 Absorption atomique**

Pour mesurer le calcium libéré en solution (par simple dissolution ou suite à l'adsorption), les surnageants ont été récupérés pour analyse de calcium par absorption atomique à source continue (ContrAA 300, Analytik Jena) en présence de chlorure de lanthane ( $\text{LaCl}_3$  0,1M) pour minimiser les interférences chimiques. La flamme est produite à partir d'un mélange protoxyde d'azote/acétylène selon les paramètres suivants : hauteur du brûleur 6 mm, combustible : 245 L/h, oxydant : 485 L/h, rapport combustible/oxydant : 0,505.

## **2.3 Dosage des ions phosphate**

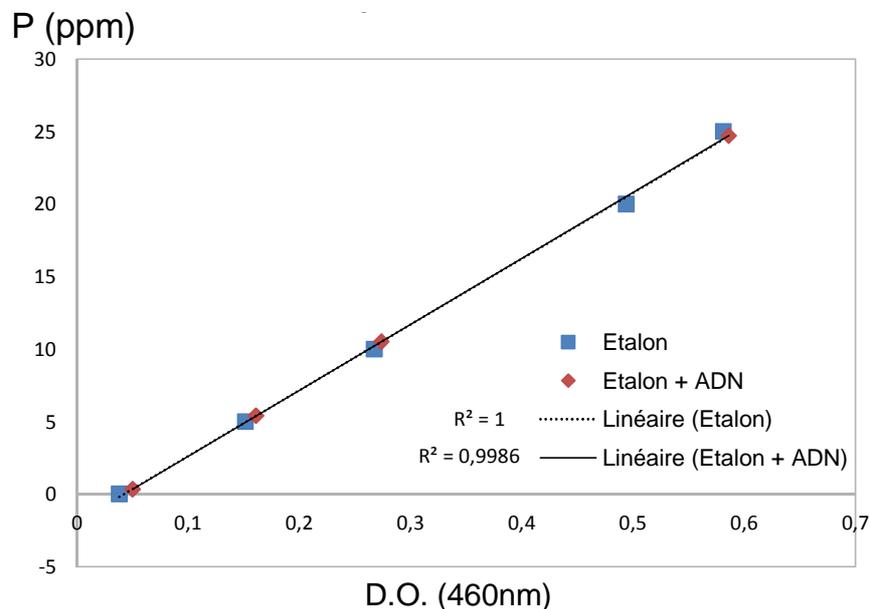
### **2.3.1 Dosage du solide**

Le phosphore est présent sous la forme d'ions phosphate  $\text{PO}_4^{3-}$  et hydrogénophosphate  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Ces ions sont dosés conjointement par colorimétrie à  $\lambda=460$  nm grâce au complexe phosphovanadomolybdique jaune  $\text{VO}_3[\text{P}(\text{MO}_3\text{O}_{10})_4]$  en milieu acide, par ajout d'  $\text{HClO}_4$  6M (Charlot, 1963; Gee and Deitz, 1953). Le réactif colorimétrique est préparé en mélangeant un volume équivalent de solution de molybdate d'ammonium (80 g/L) et de solution de monovanadate d'ammonium (4 g/L). Une gamme étalon est réalisée à partir de volumes croissants d'une solution de phosphore à 100 ppm (préparé à l'aide de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). L'absorbance des différentes solutions, en incluant un blanc qui ne contient pas de phosphate, est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre dans des cuves de 1 cm en quartz (Hitachi U-1100 à simple faisceau, en repassant le blanc, ou Shimadzu UV-1800 à double faisceau). L'erreur relative du dosage du phosphore est de l'ordre de 0,5%.

### **2.3.2 Dosage des surnageants**

Le dosage des ions phosphate éventuellement libérés en solution lors de l'adsorption à l'ADN a été réalisé selon le même protocole. Au préalable, en raison de la précipitation de l'ADN à pH acide, nous avons procédé à une clarification de la solution (Didier de Saint-Amand and Zuckerman, 1968) par centrifugation (5 minutes à 10 000 rpm) 10 minutes après avoir ajouté l'acide, avant de procéder au dosage colorimétrique. L'étalonnage a, dans ce cas, été réalisé à partir de standards qui contiennent 200  $\mu\text{L}$  d'ADN (Trevigen®, 10 mg/mL).

L'effet de ce traitement de la solution sur la lecture de l'absorbance à 460 nm est illustré sur la Figure B-1 : très peu de modifications sont observées par rapport au cas sans ADN, validant ainsi cette méthode.



**Figure B-1 Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration en phosphore, en présence (losanges rouges) ou en absence (carrés bleus) d'ADN. Les étalons contenant de l'ADN ont été préparés par clarification préalable des solutions par centrifugation, pour éviter l'interférence de l'ADN dans la lecture de la D.O**

## 2.4 Dosage des carbonates

La quantité d'ions carbonate présents dans les échantillons solides a été déterminée par coulométrie à l'aide d'un coulomètre UIC Inc. CM 5014, combiné à un module d'acidification 5130, équipé en amont d'un piège à CO<sub>2</sub> (KOH à 45%) et d'un dispenseur d'acide perchlorique (2M pour les apatites synthétiques et 6M pour les échantillons biologiques).

La masse  $m$  d'échantillon solide est comprise entre 30 et 80 mg, en fonction de la teneur attendue en carbonate (moins l'échantillon est carbonaté, plus la quantité d'échantillon est grande) afin d'avoir un rapport signal-bruit favorable. L'attaque acide produit un dégagement de CO<sub>2</sub> qui réagit avec une solution cathodique d'éthanolamine pour produire un acide fort qui provoque l'atténuation de la couleur bleue de l'indicateur colorimétrique de pH en présence. Une cellule photométrique mesure la diminution de densité optique et initie sa régénération électrochimique pour ramener la solution à sa coloration initiale (100% transmission). La quantité de courant nécessaire à cette opération est intégrée et transformée

en mg de carbone. Le pourcentage massique de  $\text{CO}_3$  est alors déterminé à l'aide de la relation suivante :

$$\% \text{wt. CO}_3^{2-} = (0,5 \text{ c/m}) \times 100, \text{ avec } c : \text{ mg de carbone lu.}$$

### **3 Analyses spectroscopiques infrarouge et post-traitements de données IR**

Pour la préparation des pastilles en vue de l'acquisition en mode transmission, une petite quantité de poudre d'échantillon a été broyée dans un mortier en agate puis mélangée à du bromure de potassium KBr en proportion 1:300. Le mélange est mis sous presse uniaxiale (8 tonnes pendant quelques secondes). La pastille est placée dans le porte-échantillon dans l'enceinte du spectromètre.

En mode ATR (*Attenuated Total Reflexion*), l'échantillon est déposé directement sur la fenêtre en quartz et maintenu à l'aide du levier rotatif.

Les spectres ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre FTIR Nicolet 5700. La gamme spectrale est comprise entre 4000 et 400  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution 4  $\text{cm}^{-1}$  et avec 64 scans d'acquisition.

#### **3.1 Apodisation de Happ-Genzel du domaine spectral $\nu_3\nu_1$ ( $\text{PO}_4$ )**

L'apodisation permet de réduire la largeur intrinsèque des bandes d'absorption infrarouge à transformée de Fourier. Ce traitement permet la mise en évidence partielle de contributions particulières dans un domaine d'absorption complexe, en plus des principales bandes d'absorption du massif (nombre et position des bandes). Elle est réalisée d'après le spectre infrarouge exprimé en absorbance sur le logiciel Omnic 8. Au préalable, la bande est normalisée à une unité d'absorbance. L'apodisation est réalisé grâce à la fonction « self-deconvolution » en ajustant les paramètres  $\rho$  (largeur de pied de bande) et  $k$  (amélioration). Dans notre cas,  $\rho$  se situe aux alentours de 22  $\text{cm}^{-1}$  et  $k$  entre 1,5 et 2. Des valeurs trop basses auront tendance à diminuer l'efficacité de ce traitement. Des valeurs trop hautes pourront, pour le facteur  $\rho$ , produire des bandes négatives et pour le facteur  $k$ , produire de petites oscillations artefactuelles sur le spectre traité.

#### **3.2 Décomposition spectrale du domaine $\nu_4(\text{PO}_4)$ (*curve-fitting*)**

Le *curve-fitting* ou décomposition spectrale permet d'ajuster un ensemble connu de contributions potentielles au sein d'un massif complexe, en fonction de données

expérimentales globales. Au sein d'un domaine d'absorption infrarouge défini, ces courbes correspondent chacune à une espèce chimique qui contribue simultanément à l'intérieur de ce domaine. L'aire (ou intensité intégrée) des différentes contributions ainsi positionnées servira, par le biais de rapports d'aires, à quantifier ces espèces chimiques. Cette méthode est particulièrement utile, dans le cas d'apatites, pour la semi-quantification (variations relatives) d'espèces chimiques labiles.

La méthode de décomposition spectrale décrite ici se base sur une méthodologie précédemment développée au laboratoire CIRIMAT (voir notamment citer publi nicolas) à partir de la réponse FTIR obtenue dans le domaine spectral 400-800  $\text{cm}^{-1}$  et à l'aide du logiciel ORIGIN 8.1. Au préalable, une correction de ligne de base est réalisée dans ce domaine, en soustrayant une droite de référence ancrée aux minima d'absorption de part et d'autre du massif. Les positions et la nature des neuf bandes (ou seulement huit bandes si l'on exclut la bande de libration de  $\text{H}_2\text{O}$ ) sont paramétrées manuellement (voir positions détaillées dans le texte). Ces bandes sont considérées comme des fonctions lorentziennes, à l'exception de la  $\nu_2(\text{PO}_4)$  que l'on identifie comme gaussienne.

Le *curve-fitting* est ensuite guidé en fixant certains paramètres (positions et largeurs à mi-hauteur) pour limiter les solutions mathématiques proposées par le logiciel à des ensembles cohérents qui correspondent à de précédentes observations faites sur les phosphates de calcium.

Les bandes d'absorption fixes en première intention sont celles à 550, 617 et 631  $\text{cm}^{-1}$  (respectivement  $\text{HPO}_4^{2-}$  apatitique,  $\text{PO}_4^{3-}$  apatitique et  $\text{OH}^-$  apatitique). La bande des ions  $\text{HPO}_4^{2-}$  non-apatitiques a également été fixée dans un intervalle entre 530 et 534  $\text{cm}^{-1}$ . Les autres bandes ne sont pas fixées ( $\nu_2$  à 470  $\text{cm}^{-1}$  et  $\nu_4$  des ions phosphate apatitiques à 560, 575 et 601  $\text{cm}^{-1}$ ). Un guidage supplémentaire concerne la largeur à mi-hauteur des bandes 530-534  $\text{cm}^{-1}$  et 631  $\text{cm}^{-1}$  pour éviter une trop grande divergence du fit proposé par le logiciel. Par la suite, certains paramètres sont défixés pour un dernier affinement, rendant ainsi mieux compte de la spécificité de chaque échantillon.

#### **4 Mesure de surface spécifique**

La détermination de la surface spécifique de poudres d'apatites synthétiques par la méthode BET (Brunauer Emmer Teller) a été réalisée à l'aide du Micromeritics Tristar II 3020 en 5 points, avec un mélange gazeux He /  $\text{N}_2$ . La quantité de molécules gazeuse

adsorbées (azote) est rapporté à la masse d'échantillon après dégazage (en l'occurrence 1 heure à 37°C pour limiter l'altération de la couche hydratée des apatites nanocristallines).

## **5 Microscopie électronique à balayage (MEB) équipé d'une sonde EDX (Energy Dispersive X-ray spectrometry)**

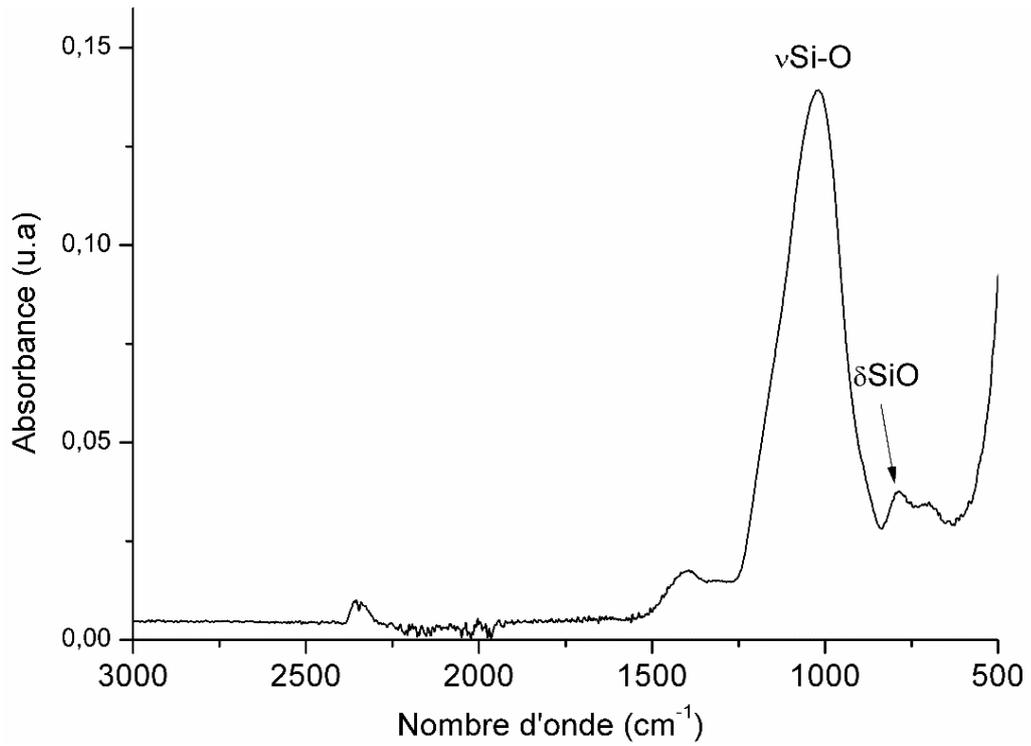
La caractérisation par MEB-EDX des poudres d'os et de dents diagénétiques a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à balayage LEO-435VP. Les échantillons ont été préalablement métallisés à l'argent pour rendre les échantillons conducteurs. Ce microscope électronique à balayage est équipé d'un analyseur *IMIX-PC EDS (PGT)* à diode de germanium. L'analyse EDX a été réalisée en appliquant un courant de 15 keV et 1,5 nA, pour une distance de travail (WD) de 13 mm, pour la détection des éléments présents en surface des échantillons (les éléments lourds seront préférentiellement détectés par cette technique).

## **6 Spectroscopie Raman**

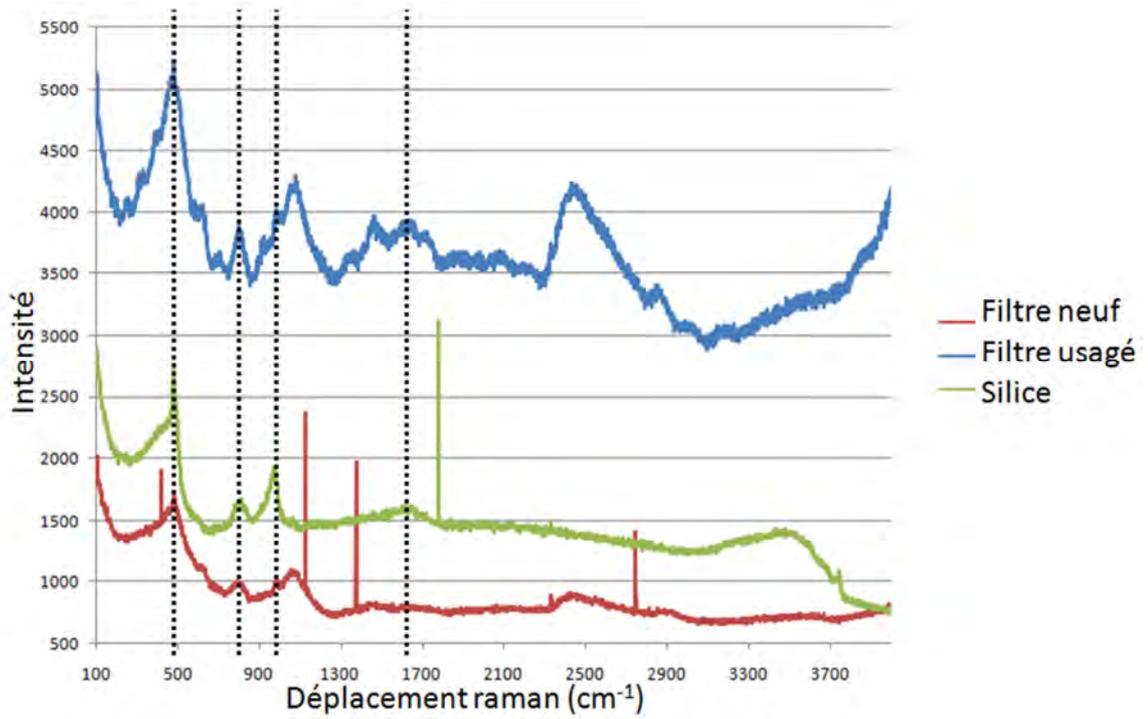
En spectroscopie Raman, les nuages électroniques des atomes vont se déformer sous l'effet d'un champ électrique apporté par le laser, créant ainsi un moment dipolaire induit qui dépend du champ électrique appliqué, de la nature du nuage déformé et donc de l'espèce impactée. Comme l'infrarouge, la spectroscopie Raman caractérise un composé en fonction du type de liaison et est une spectroscopie vibrationnelle. Les acquisitions des spectres Raman ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Raman labRAM HR 800 Horiba Jobin Yvon muni d'un laser vert ( $\lambda=532$  nm).

## B FIGURES ANNEXES (KIT D'EXTRACTION D'ADN ANCIEN)

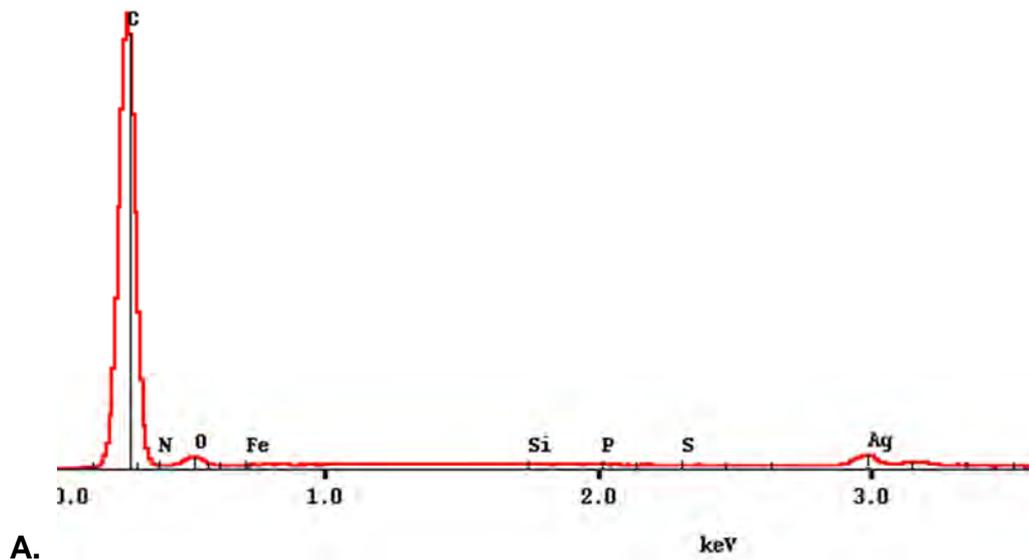
Annexe 1 Spectre IR ATR du filtre de silice neuf



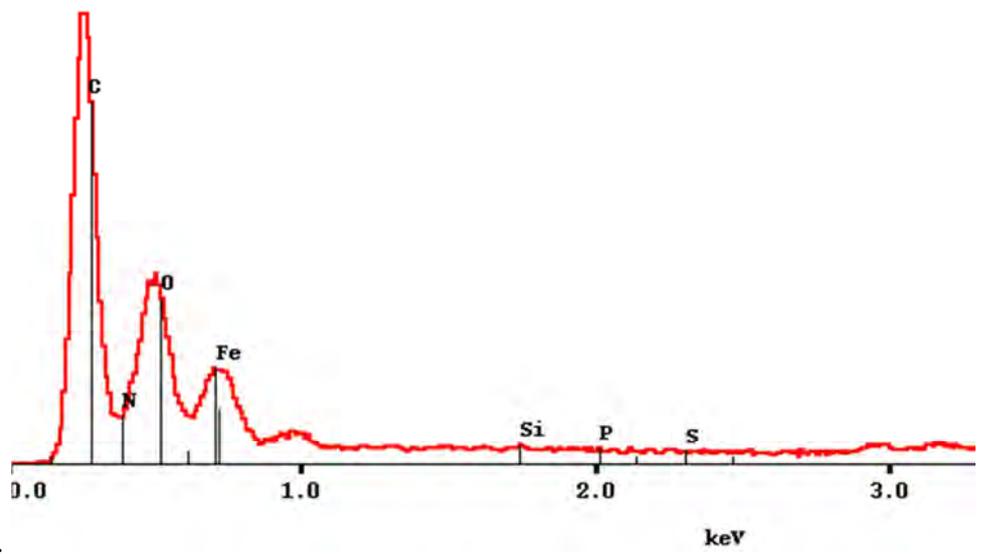
**Annexe 2 Spectre Raman du filtre de silice neuf (rouge), usagé (bleu) et d'une silice de référence (vert)**



**Annexe 3 Spectre EDX de la partie granulaire (A) et de la partie fondue (B) de la membrane**

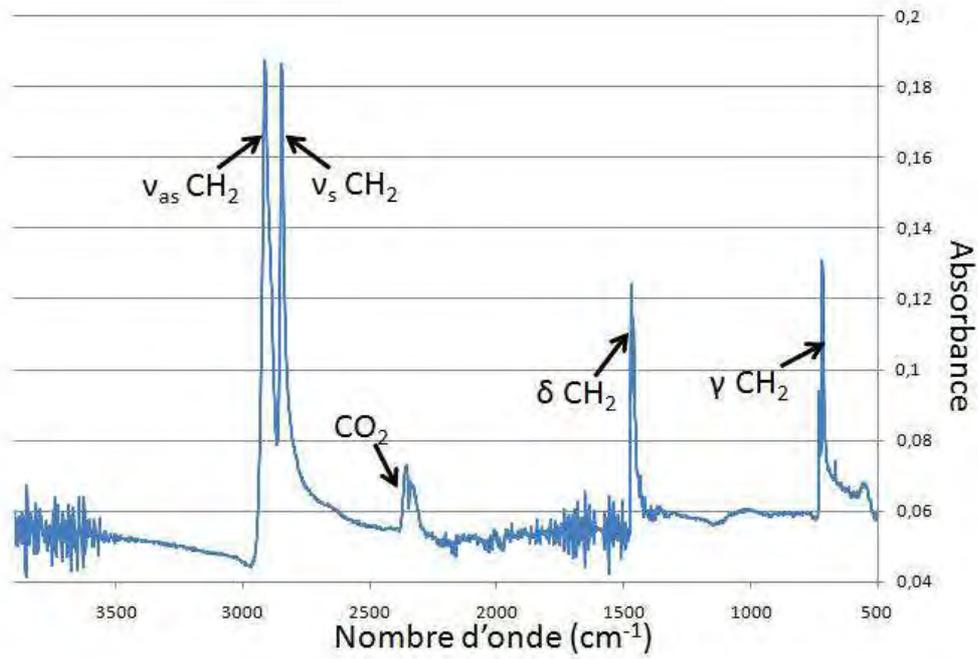


**A.**

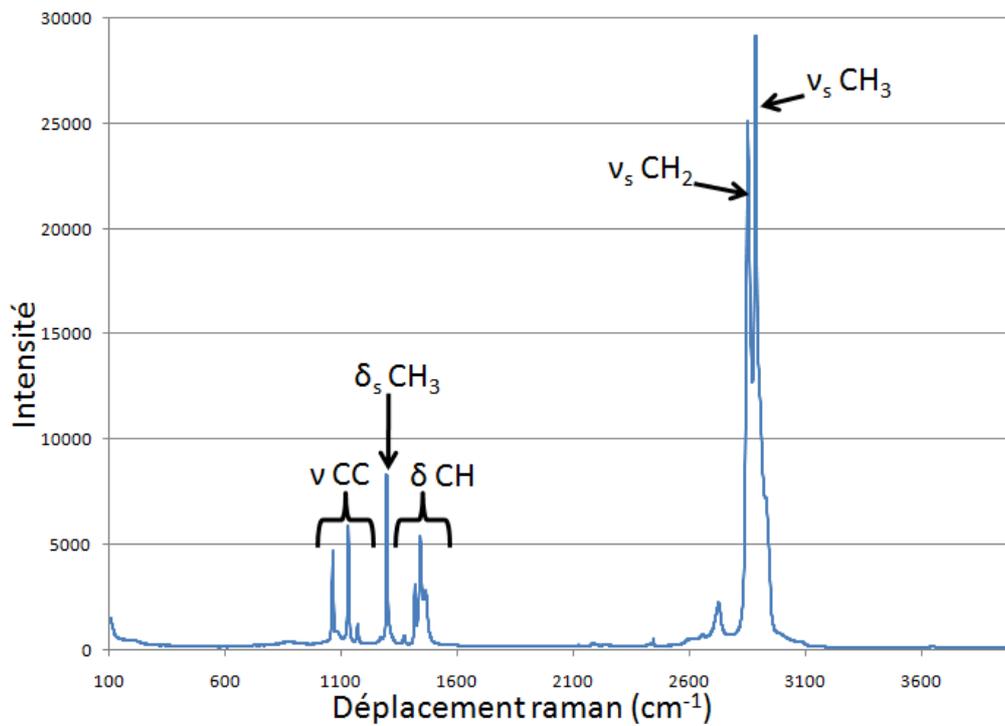


**B.**

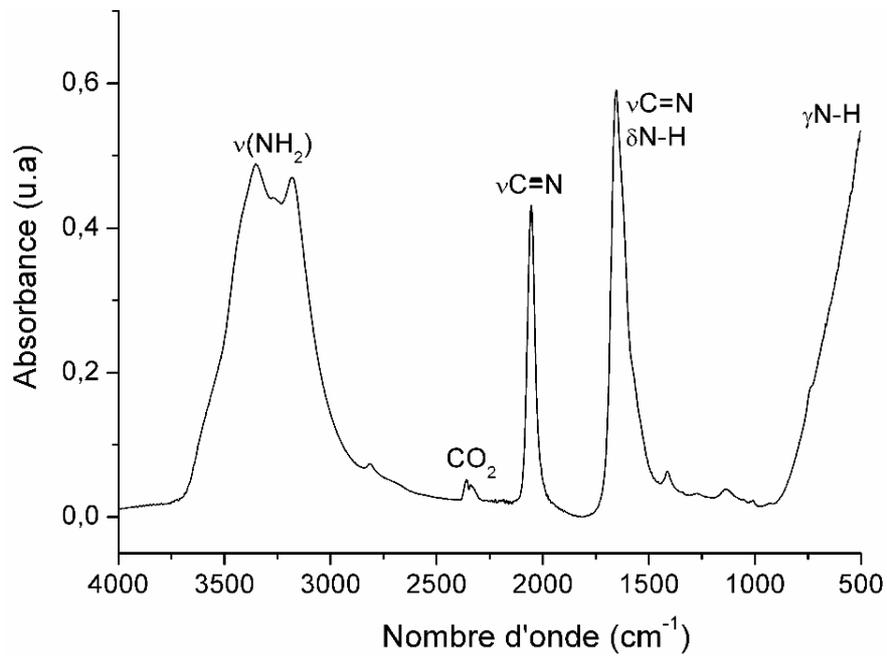
**Annexe 4 Spectre IR ATR de la membrane neuve**



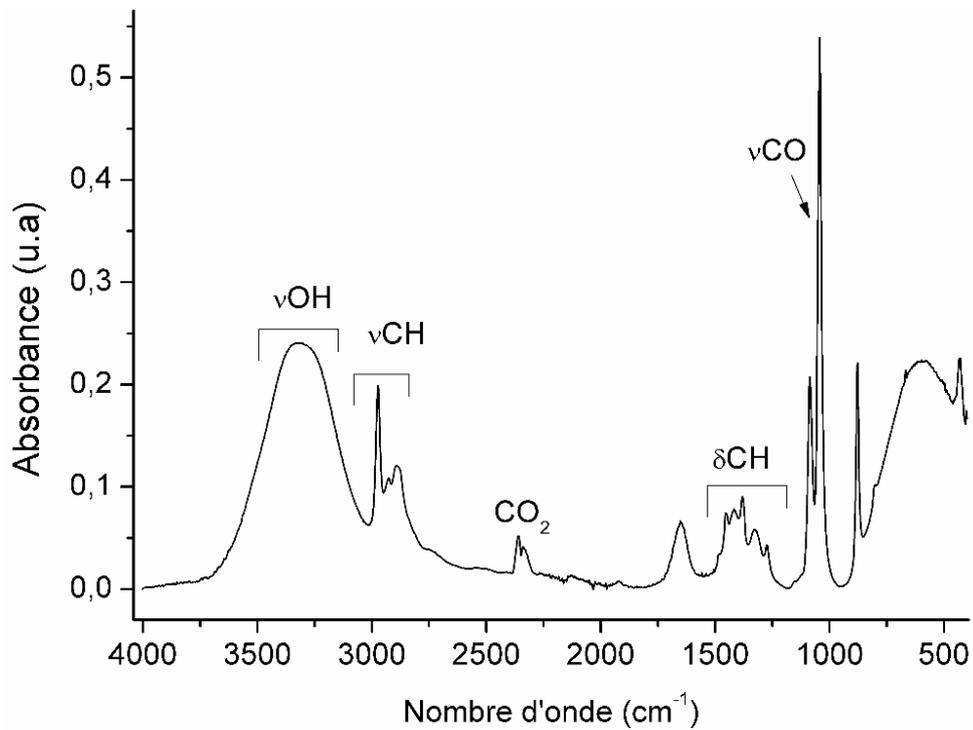
**Annexe 5 Spectre Raman de la membrane placée sous le filtre**



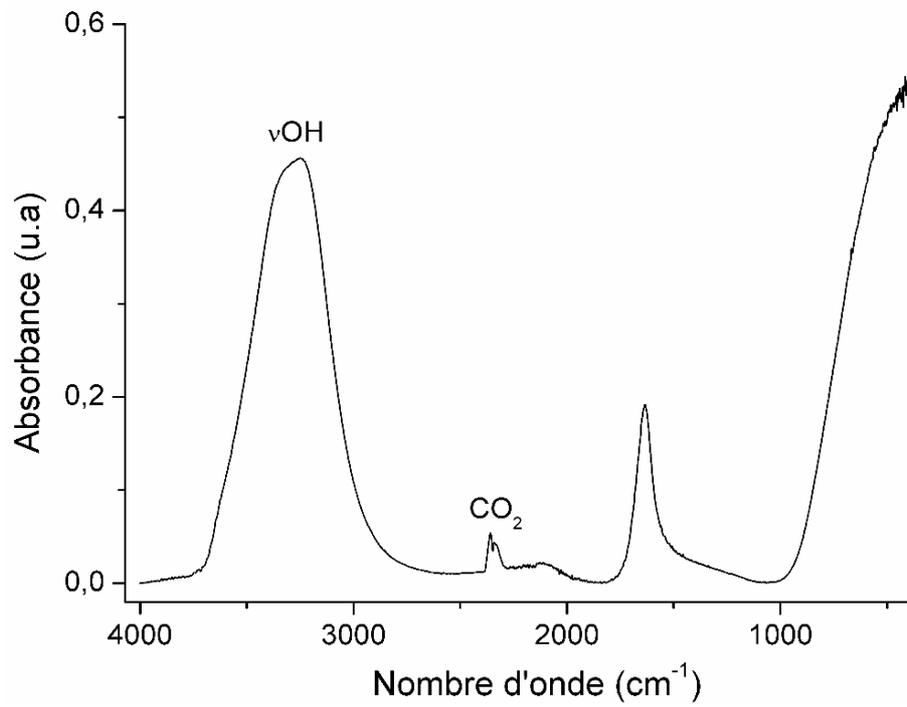
**Annexe 6 Spectre IR-ATR de la solution d'accrochage (*binding*) du kit d'extraction d'ADN ancien**



**Annexe 7 Spectre IR-ATR de la solution de lavage (*washing*) du kit d'extraction d'ADN ancien**



**Annexe 8 Spectre IR-ATR de la solution d'élution (*elution*) du kit d'extraction d'ADN ancien**



**C RAPPORT DE L'ISOTHERME BET DE L'HACS4**

Sample: hac S4 2  
Operator:  
Submitter:  
File: C:\WIN3020\DATA\20120713.SMP

Started: 13/07/2012 10:43:55	Analysis Adsorptive: N2
Completed: 13/07/2012 22:38:35	Analysis Bath Temp.: -195.850 °C
Report Time: 09/11/2012 11:02:27	Sample Mass: 0.1937 g
Warm Free Space: 20.2748 cm <sup>3</sup> Measured	Cold Free Space: 62.4541 cm <sup>3</sup> Measured
Equilibration Interval: 10 s	Low Pressure Dose: None
Sample Density: 1.000 g/cm <sup>3</sup>	Automatic Degas: No

### Summary Report

#### Surface Area

Single point surface area at  $p/p^{\circ} = 0.198608720$ : 150.9399 m<sup>2</sup>/g

BET Surface Area: 156.4733 m<sup>2</sup>/g

Langmuir Surface Area: 215.1404 m<sup>2</sup>/g

BJH Adsorption cumulative surface area of pores  
between 17.000 Å and 3000.000 Å diameter: 168.567 m<sup>2</sup>/g

BJH Desorption cumulative surface area of pores  
between 17.000 Å and 3000.000 Å diameter: 168.0760 m<sup>2</sup>/g

#### Pore Volume

Single point adsorption total pore volume of pores  
less than 1050.900 Å diameter at  $p/p^{\circ} = 0.981224213$ : 0.553137 cm<sup>3</sup>/g

BJH Adsorption cumulative volume of pores  
between 17.000 Å and 3000.000 Å diameter: 0.616155 cm<sup>3</sup>/g

BJH Desorption cumulative volume of pores  
between 17.000 Å and 3000.000 Å diameter: 0.616398 cm<sup>3</sup>/g

#### Pore Size

Adsorption average pore width (4V/A by BET): 141.4010 Å

BJH Adsorption average pore diameter (4V/A): 146.210 Å

BJH Desorption average pore diameter (4V/A): 146.695 Å

Sample: hac S4 2  
 Operator:  
 Submitter:  
 File: C:\WIN3020\DATA\20120713.SMP

Started: 13/07/2012 10:43:55      Analysis Adsorptive: N2  
 Completed: 13/07/2012 22:38:35      Analysis Bath Temp.: -195.850 °C  
 Report Time: 09/11/2012 11:02:27      Sample Mass: 0.1937 g  
 Warm Free Space: 20.2748 cm<sup>3</sup> Measured      Cold Free Space: 62.4541 cm<sup>3</sup> Measured  
 Equilibration Interval: 10 s      Low Pressure Dose: None  
 Sample Density: 1.000 g/cm<sup>3</sup>      Automatic Degas: No

**Isotherm Tabular Report**

Relative Pressure (p/p <sub>0</sub> )	Absolute Pressure (mmHg)	Quantity Adsorbed (cm <sup>3</sup> /g STP)	Elapsed Time (h:min)	Saturation Pressure (mmHg)
			00:50	752.271912
0.063641017	47.886505	33.9426	00:59	752.447205
0.078311536	58.926018	35.2606	01:03	752.456421
0.119541625	89.938744	38.3028	01:08	752.363403
0.140036566	105.357285	39.6510	01:12	752.355530
0.159595074	120.030205	40.8916	01:16	752.092163
0.198608720	149.365189	43.2664	01:20	752.057556
0.249811216	187.861313	46.3551	01:25	752.013123
0.300294180	225.828720	49.4576	01:29	752.024963
0.348559067	262.128906	52.5397	01:34	752.035828
0.397609949	298.974579	55.9257	01:39	751.929321
0.447766000	336.645477	59.5460	01:44	751.833496
0.496708411	373.359772	63.4985	01:49	751.667908
0.547421955	411.351013	68.1619	01:55	751.433167
0.596820336	448.316254	73.5134	02:01	751.174561
0.645513236	484.929565	80.0140	02:08	751.231018
0.694927743	521.937561	88.3317	02:17	751.067383
0.735758251	552.452148	97.0566	02:26	750.860962
0.766930604	575.730835	105.3737	02:35	750.694824
0.795988703	597.306152	115.2428	02:45	750.395264
0.818103506	613.614380	124.3155	02:55	750.044922
0.837306049	627.815796	133.9519	03:06	749.804443
0.857604344	642.826172	145.8688	03:17	749.560303
0.872874070	654.012085	156.5077	03:28	749.262817
0.887804721	665.085815	168.8949	03:40	749.135254
0.902591813	675.991577	183.3593	03:53	748.944946
0.914095588	684.510193	195.6934	04:04	748.838745
0.923540098	691.191467	206.9570	04:14	748.415222
0.931537464	697.178467	218.7219	04:25	748.416992
0.939552361	702.957031	230.7615	04:35	748.182922
0.945570020	707.322388	241.5286	04:44	748.038086
0.952026594	712.080505	255.1147	04:54	747.962830
0.958586960	716.840210	269.5179	05:03	747.809265
0.962600158	719.701721	281.0071	05:12	747.664246
0.968345361	723.960205	298.2360	05:22	747.626038
0.970126088	725.093933	305.4941	05:29	747.422363
0.974178985	727.977722	322.9911	05:38	747.273071
0.977087377	730.178101	332.9705	05:45	747.300720
0.977793388	730.660645	339.2355	05:51	747.254639
0.980337781	732.559082	353.0322	05:58	747.251709
0.981224213	733.175415	357.6008	06:02	747.204773
0.982404510	734.055420	371.0857	06:10	747.202820
0.984550190	735.704529	383.8629	06:16	747.249390
0.983829269	735.191101	386.0892	06:20	747.275085
0.985523726	736.340332	394.7511	06:26	747.156372
0.982235555	733.826660	390.1770	06:30	747.098450
0.979675631	731.823975	384.3780	06:36	747.006409
0.977204431	729.912842	377.5727	06:42	746.939758
0.974379716	727.632385	369.5464	06:48	746.764709
0.972052818	725.963562	361.7966	06:55	746.835510

Sample: hac S4 2  
 Operator:  
 Submitter:  
 File: C:\WIN3020\DATA\20120713.SMP

Started: 13/07/2012 10:43:55      Analysis Adsorptive: N2  
 Completed: 13/07/2012 22:38:35      Analysis Bath Temp.: -195.850 °C  
 Report Time: 09/11/2012 11:02:27      Sample Mass: 0.1937 g  
 Warm Free Space: 20.2748 cm<sup>3</sup> Measured      Cold Free Space: 62.4541 cm<sup>3</sup> Measured  
 Equilibration Interval: 10 s      Low Pressure Dose: None  
 Sample Density: 1.000 g/cm<sup>3</sup>      Automatic Degas: No

**Isotherm Tabular Report**

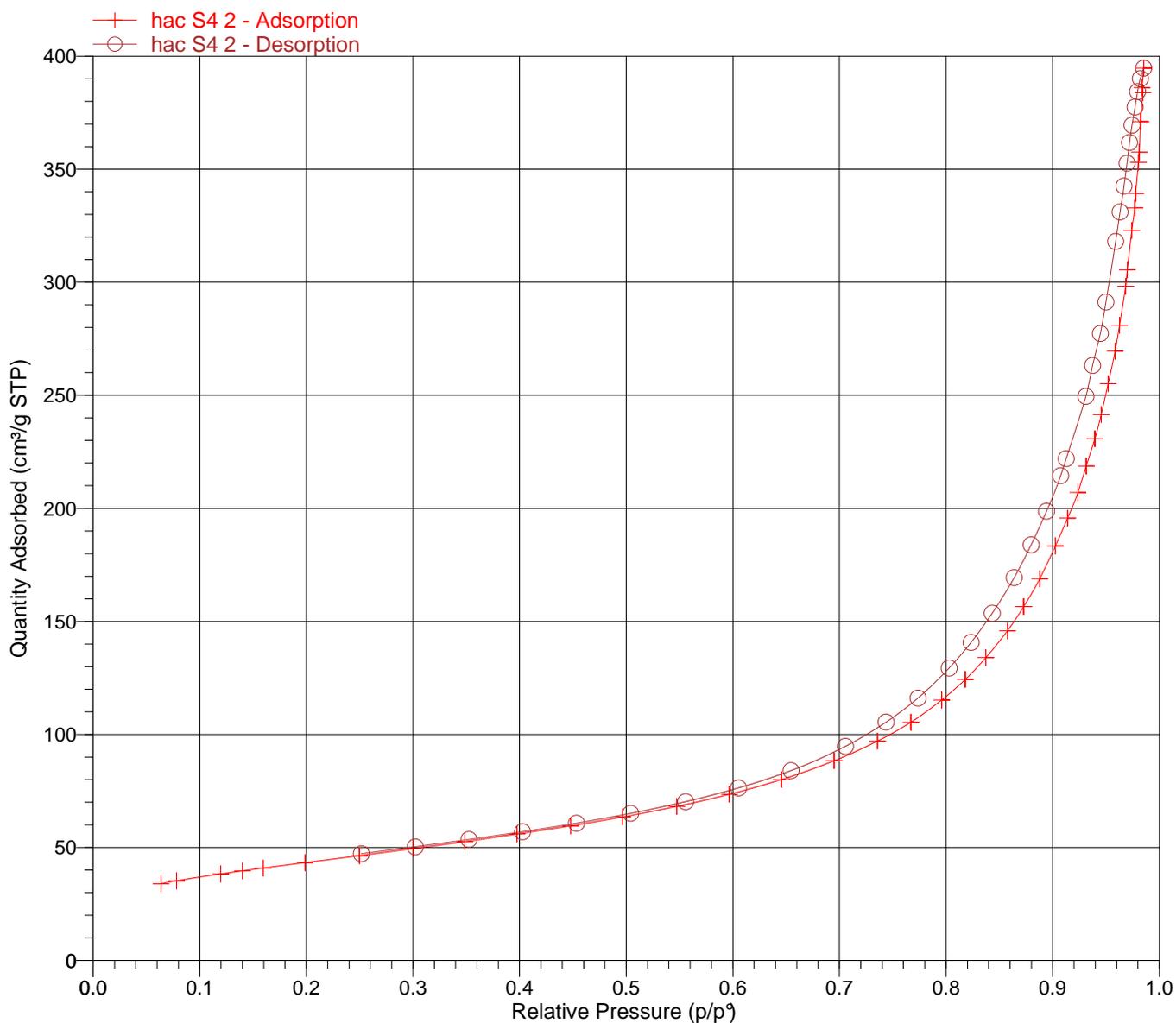
Relative Pressure (p/p <sup>0</sup> )	Absolute Pressure (mmHg)	Quantity Adsorbed (cm <sup>3</sup> /g STP)	Elapsed Time (h:min)	Saturation Pressure (mmHg)
0.969657876	724.179077	352.6743	07:03	746.839783
0.966974856	722.123413	342.5273	07:11	746.786133
0.963167570	719.217224	331.1332	07:19	746.720764
0.959179945	716.261536	318.1296	07:29	746.743652
0.950074108	709.397095	291.2905	07:49	746.675537
0.944680384	705.306885	277.4088	08:00	746.609009
0.937545624	699.946533	263.2496	08:11	746.573303
0.931108650	695.144043	249.5845	08:23	746.576721
0.912569819	681.275757	221.9836	08:47	746.546448
0.907412928	677.602905	214.4805	08:57	746.741516
0.894163564	667.860229	198.6789	09:11	746.910583
0.879791602	657.319885	183.8982	09:24	747.131348
0.863812323	645.460876	169.3239	09:39	747.223511
0.843217002	630.329773	153.6654	09:53	747.529724
0.823431468	615.641724	140.7156	10:07	747.653870
0.802878380	600.511963	129.4078	10:20	747.948853
0.773740410	578.721558	116.1197	10:34	747.953125
0.743660847	556.222229	105.4366	10:45	747.951477
0.705682439	527.978516	94.7576	10:56	748.181458
0.654659656	489.982025	84.0066	11:06	748.453064
0.605282425	453.110382	76.3445	11:14	748.593323
0.555807420	416.142181	70.2701	11:21	748.716492
0.504157318	377.543427	65.0658	11:27	748.860352
0.453384882	339.554810	60.7127	11:33	748.932800
0.402737788	301.663361	56.9267	11:38	749.031677
0.352441878	264.023560	53.5070	11:43	749.126526
0.302022982	226.282608	50.2854	11:48	749.223145
0.251620362	188.537537	47.2118	11:53	749.293640

Sample: hac S4 2  
Operator:  
Submitter:  
File: C:\WIN3020\DATA\20120713.SMP

Started: 13/07/2012 10:43:55  
Completed: 13/07/2012 22:38:35  
Report Time: 09/11/2012 11:02:27  
Warm Free Space: 20.2748 cm<sup>3</sup> Measured  
Equilibration Interval: 10 s  
Sample Density: 1.000 g/cm<sup>3</sup>

Analysis Adsorptive: N<sub>2</sub>  
Analysis Bath Temp.: -195.850 °C  
Sample Mass: 0.1937 g  
Cold Free Space: 62.4541 cm<sup>3</sup> Measured  
Low Pressure Dose: None  
Automatic Degas: No

Isotherm Linear Plot

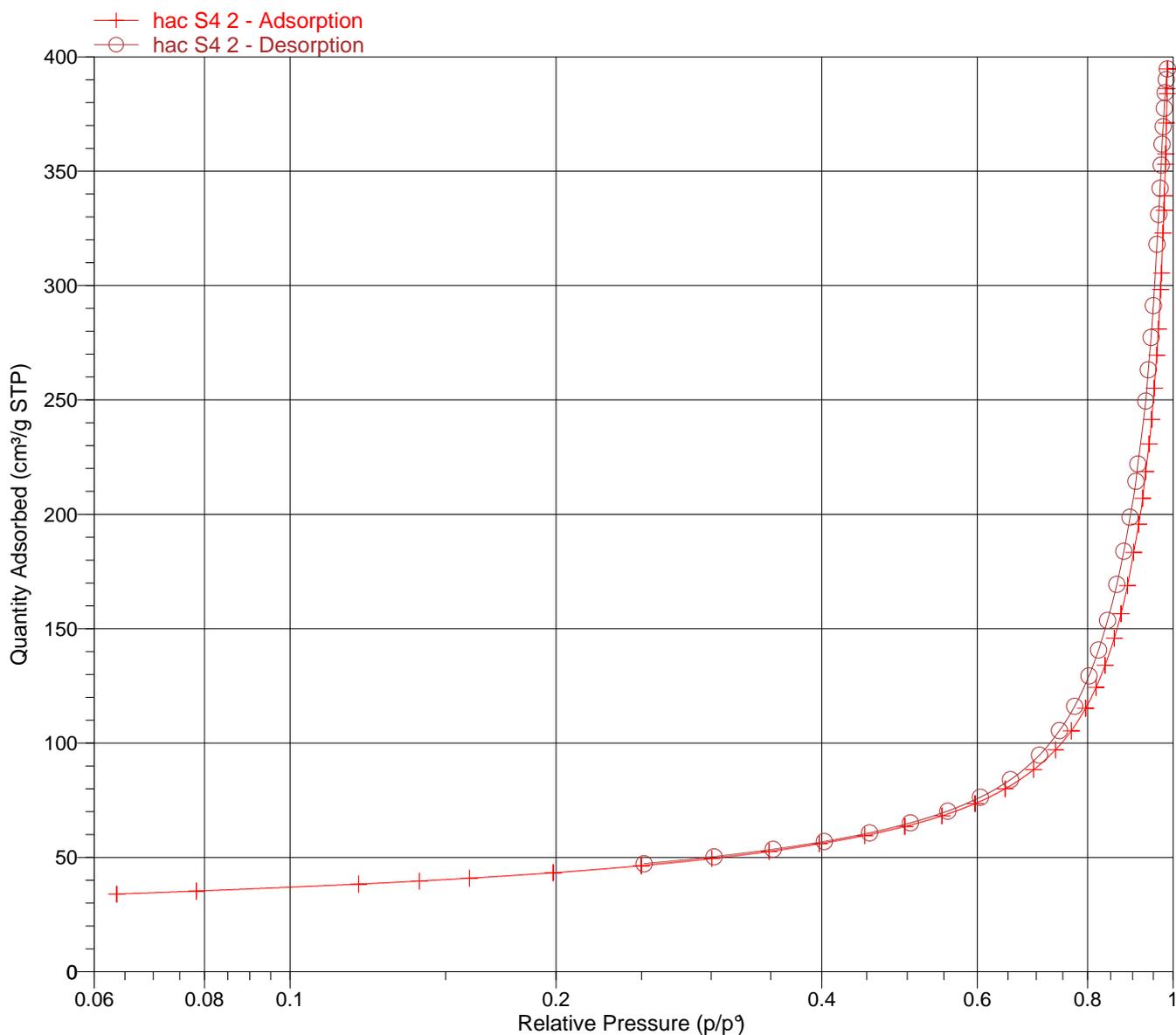


Sample: hac S4 2  
Operator:  
Submitter:  
File: C:\WIN3020\DATA\20120713.SMP

Started: 13/07/2012 10:43:55  
Completed: 13/07/2012 22:38:35  
Report Time: 09/11/2012 11:02:27  
Warm Free Space: 20.2748 cm<sup>3</sup> Measured  
Equilibration Interval: 10 s  
Sample Density: 1.000 g/cm<sup>3</sup>

Analysis Adsorptive: N2  
Analysis Bath Temp.: -195.850 °C  
Sample Mass: 0.1937 g  
Cold Free Space: 62.4541 cm<sup>3</sup> Measured  
Low Pressure Dose: None  
Automatic Degas: No

**Isotherm Log Plot**



Sample: hac S4 2  
Operator:  
Submitter:  
File: C:\WIN3020\DATA\20120713.SMP

Started: 13/07/2012 10:43:55  
Completed: 13/07/2012 22:38:35  
Report Time: 09/11/2012 11:02:27  
Warm Free Space: 20.2748 cm<sup>3</sup> Measured  
Equilibration Interval: 10 s  
Sample Density: 1.000 g/cm<sup>3</sup>

Analysis Adsorptive: N2  
Analysis Bath Temp.: -195.850 °C  
Sample Mass: 0.1937 g  
Cold Free Space: 62.4541 cm<sup>3</sup> Measured  
Low Pressure Dose: None  
Automatic Degas: No

**BET Surface Area Report**

BET Surface Area: 156.4733 ± 0.1696 m<sup>2</sup>/g  
Slope: 0.027573 ± 0.000030 g/cm<sup>3</sup> STP  
Y-Intercept: 0.000248 ± 0.000004 g/cm<sup>3</sup> STP  
C: 112.208712  
Qm: 35.9444 cm<sup>3</sup>/g STP  
Correlation Coefficient: 0.9999976  
Molecular Cross-Sectional Area: 0.1620 nm<sup>2</sup>

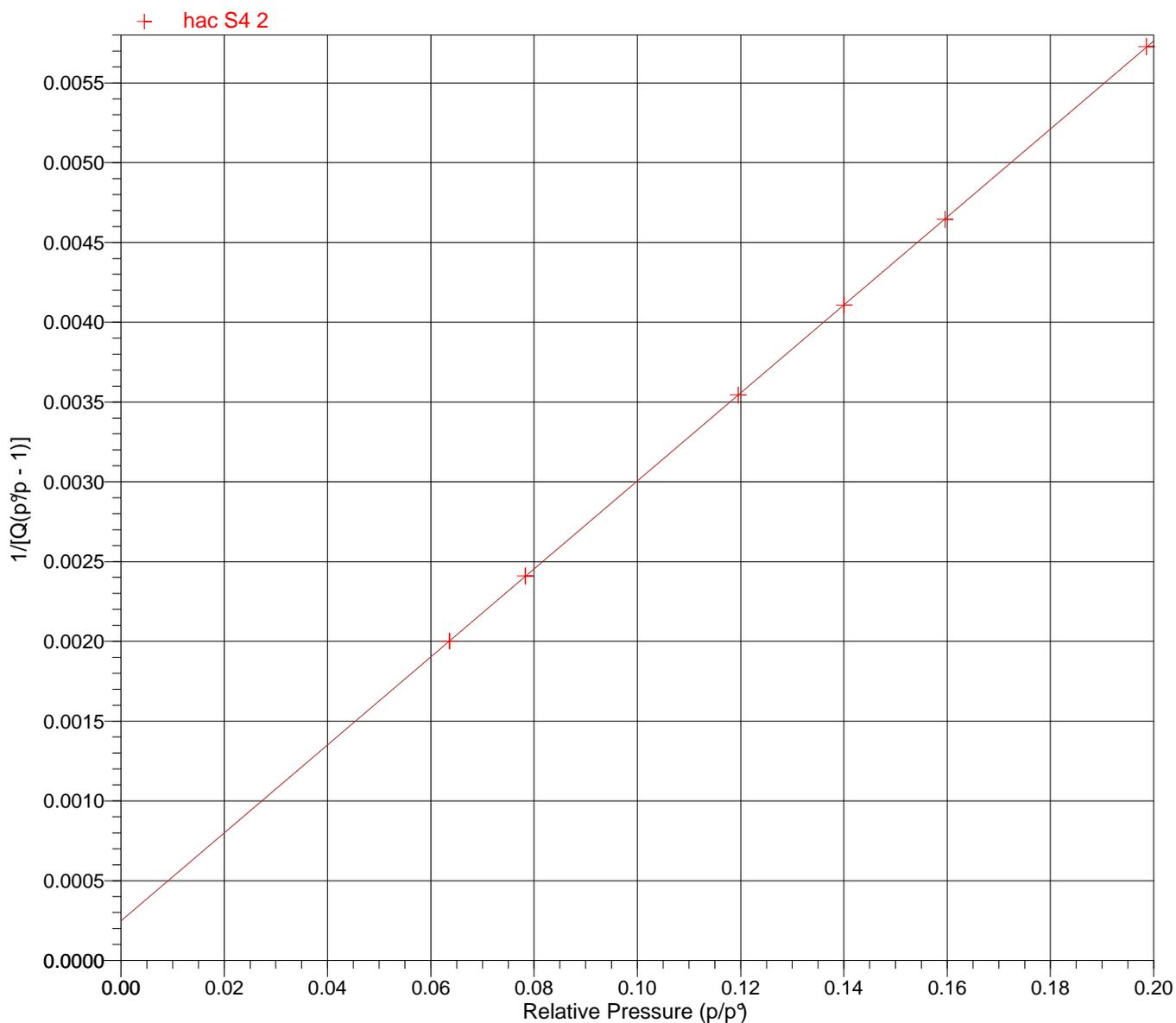
Relative Pressure (p/p <sup>0</sup> )	Quantity Adsorbed (cm <sup>3</sup> /g STP)	1/[Q(p <sup>0</sup> p - 1)]
0.063641017	33.9426	0.002002
0.078311536	35.2606	0.002410
0.119541625	38.3028	0.003545
0.140036566	39.6510	0.004107
0.159595074	40.8916	0.004644
0.198608720	43.2664	0.005728

Sample: hac S4 2  
Operator:  
Submitter:  
File: C:\WIN3020\DATA\20120713.SMP

Started: 13/07/2012 10:43:55  
Completed: 13/07/2012 22:38:35  
Report Time: 09/11/2012 11:02:27  
Warm Free Space: 20.2748 cm<sup>3</sup> Measured  
Equilibration Interval: 10 s  
Sample Density: 1.000 g/cm<sup>3</sup>

Analysis Adsorptive: N2  
Analysis Bath Temp.: -195.850 °C  
Sample Mass: 0.1937 g  
Cold Free Space: 62.4541 cm<sup>3</sup> Measured  
Low Pressure Dose: None  
Automatic Degas: No

**BET Surface Area Plot**



## SUMMARY AND KEYWORDS

**Title:** Study of the interaction between DNA and apatite analogous to bone and tooth mineral. Implications for preservation, extraction and analysis of ancient DNA

This thesis contributes to explore the physico-chemical mechanisms underlying the preservation of ancient DNA within skeletal remains, arising from anthropological or forensic contexts. The complexity of such systems is not only related to the intrinsic features of hard tissues, but also to the effect of environmental parameters (temperature, pH, ionic strength, microbiological activity). In particular, we focused on the potential key role played by the mineral matrix, composed of calcium phosphate apatite. We addressed this topic from three viewpoints. First, an *in situ* study was achieved by means of physico-chemical characterization of bone and tooth remains, previously used as DNA substrates. Our results contribute to identify diagenetic indicators, such as the amount of residual organic matter, the maturation state of the apatite phase, or else mean crystallite dimensions. Next, we initiated a study of DNA adsorption/desorption processes on synthetic biomimetic apatite, pointing to the existence of strong physico-chemical interactions, that we have attempted to model. Our data substantiate the empirical hypothesis often alleged by paleogenetics researchers – but not experimentally demonstrated – explaining the exceptional preservation of DNA over time thanks to an adsorption phenomenon onto apatite within hard tissues. From a more applied perspective, the components of a DNA purification kit, used for ancient DNA, have been examined from a physico-chemical point of view with the goal to better understand DNA affinity toward inorganic surfaces and identify key parameters which may allow improving the yield and the quality of ancient DNA extracts.

**Keywords:** *ancient DNA, nanocrystalline apatite, adsorption, bone, teeth, diagenesis*



**AUTEUR :** GRUNENWALD Anne

**TITRE :** Etude de l'interaction entre ADN et apatites analogues au minéral osseux et dentaire – Implications pour la préservation de l'ADN ancien, son extraction, son analyse

**DIRECTION DE THESE :** Pr. Anne-Marie SAUTEREAU (directrice), Pr. Christine KEYSER (co-directrice), Dr. Christophe DROUET

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE :** Toulouse, le 28 mars 2014

---

**RESUME EN FRANÇAIS :** Ce mémoire contribue à l'exploration des mécanismes physico-chimiques qui sous-tendent la préservation post mortem de l'ADN ancien au sein de restes squelettiques dans un contexte anthropologique ou médico-légal. Nous avons étudié le rôle potentiellement joué par la matrice minérale, composée d'apatite phosphocalcique, au sein d'un système complexe. Cette complexité provient tant des propriétés intrinsèques du tissu que de l'influence de paramètres dits « environnementaux » (température, pH, force ionique, activités enzymatiques) dans la préservation de l'ADN. Trois volets d'exploration ont été retenus. Une étude in situ a été réalisée via la caractérisation physico-chimique de spécimens osseux et dentaires anciens utilisés comme substrats d'ADN. Nos résultats contribuent à l'identification d'indicateurs physico-chimiques de la diagenèse, tels que la quantité de matière organique résiduelle, l'état de maturation de l'apatite, ou encore la taille de cristallites. L'exploration in vitro de processus d'adsorption/désorption d'ADN sur une apatite biomimétique de synthèse préalablement caractérisée a été initiée, permettant des essais de modélisation des interactions physico-chimiques observées. Nos données corroborent l'hypothèse d'une conservation exceptionnelle de l'ADN dans le temps par le biais d'une adsorption sur l'apatite, avancée empiriquement par de nombreux paléogénéticiens. Sous un angle plus appliqué, un kit de purification d'ADN, utilisé pour l'ADN ancien, a été caractérisé afin de mieux comprendre l'affinité de l'ADN pour des surfaces inorganiques et identifier les éventuels paramètres influençant le rendement et la qualité des extraits d'ADN ancien.

---

**TITRE et résumé en anglais au recto de la dernière page**

---

**MOTS-CLES :** ADN ancien, apatite nanocristalline, adsorption, os, dent, diagenèse

---

**DISCIPLINE :** Sciences et génie des matériaux

---

**INTITULE ET ADRESSE DES LABORATOIRES :**

Institut Carnot-CIRIMAT – INPT/ENSIACET – 4 allée Emile Monso – BP44362 – 31030 TOULOUSE Cedex 4

Laboratoire d'Anthropologie et d'Imagerie de Synthèse – Faculté de Médecine – 37 Allées Jules Guesde – 31073 TOULOUSE Cedex 3