De l'analyse des ivoires archéologiques dorés à la synthèse archéo-inspirée des nanoparticules hybrides pour les applications biomédicales

Ina Reiche[1,2], Aurélien Gourrier[3,4] et Jolanda Spadavecchia[5]

[1] Université Paris-VI Sorbonne, LAMS UMR 8220 CNRS – Rathgen-Forschungslabor, Staatliche Museen zu Berlin-Preußischer Kulturbesitz, Berlin

[2] Sorbonne Universités, Univ. Paris 06, CNRS, UMR 8220, Laboratoire d'Archéologie Moléculaire et Structurale, Paris

[3] Uniersité Grenoble-Alpes, LIPHY, Grenoble

[4] CNRS, LIPHY, Grenoble

[5] Université Paris 13, UFR « Santé, médecine, biologie humaine », CSPBAT - UMR 7244 CNRS, Bobigny

Résumé : S'il est bien une discipline qui, par essence, se positionne au carrefour des savoirs, c'est l'archéologie. L'apport de la chimie dans ce domaine, notamment, est indispensable, tant du point de vue de l'apport intellectuel que des méthodes et des outils. De façon surprenante, cependant, le principe de réciprocité ne s'applique pas toujours ici de façon naturelle. Pourtant, il est indéniable que les connaissances acquises en archéologie pourraient parfaitement être pertinentes dans d'autres contextes qu'*a priori* tout sépare. Ainsi, quel lien peut-il exister entre les processus de diagénèse à la surface d'objets en ivoire anciennement décorés et l'ingénierie tissulaire des tissus osseux ? C'est sur cette question que nous avons choisi de focaliser ce chapitre. Tout d'abord en situant la problématique archéologique : l'observation de taches pourpres sur des objets en ivoire ayant été enfouies pendant plusieurs millénaires, l'identification de la nature de ces taches qui s'avèrent être formées de nanoparticules d'or (NpAu) et, enfin, la compréhension des mécanismes conduisant à la dégradation des polychromies et dorures anciennes en NpAu. L'analyse développée ici s'appuie sur l'idée que la matrice collagénique formant l'ivoire ou la colle protéique jouent un rôle essentiel dans la formation des NpAu. Dès lors, est-il possible de renverser l'approche ? Peut-on, dans des conditions chimiques inspirées de celles observées sur des temps archéologiques, proposer des nouvelles voies de synthèses de NpAu biocompatibles par greffage de collagène en surface ? C'est le propos développé dans une deuxième partie. Sans suspens, la réponse est affirmative et nous illustrons le potentiel d'application dans le domaine biomédical par une étude récente de régénération tissulaire osseuse utilisant de telles NpAu. Peut-être assiste-t-on aujourd'hui à la naissance d'une nouvelle discipline : l'archéomimétisme ?

1 Introduction

Pour son aspect esthétique et ses propriétés mécaniques exceptionnelles, l'ivoire a été employé par l'Homme dès le Paléolithique pour la fabrication de parures et d'objets d'art. Il a aussi été décoré avec de la polychromie et de la dorure [1] et des traces rouges sont même décelées sur des objets en ivoire de mammouth datant du Paléolithique supérieur [2]. Quelques sites archéologiques ont livré d'extraordinaires objets en provenance de Mésopotamie, comme Ougarit (Syrie, II^{e} millénaire av. notre ère), Nimroud (Irak, IX^{e} au VII^{e} siècle av. notre ère, plus de 5 000 pièces), Samarie (Israël, VIII^{e} siècle av. notre ère), ou Arslan Tash (Syrie, VIII^{e} siècle av. notre ère), aujourd'hui conservés dans diverses collections muséales internationales.

De par l'action des phénomènes d'altération auxquels ils sont soumis dans leur environnement naturel, les ivoires polychromes et dorés sont fortement modifiés au cours du temps et ne présentent aujourd'hui plus forcément leur aspect d'origine. Afin de reconstituer le décor altéré de certaines pièces sculptées en ivoire, il est donc indispensable d'étudier les mécanismes physico-chimiques d'altération. Ces processus sont extrêmement complexes, non-linéaires et peuvent fortement varier d'un site à l'autre. Ainsi, l'étude des ivoires anciens et de leurs traces de polychromie et de dorure préservées peut constituer un réel défi analytique, ce qui est d'autant plus complexe qu'il est souhaitable de reconstituer fidèlement leur aspect d'origine.

L'étude des ivoires archéologiques permet aussi d'évaluer les facteurs primordiaux de préservation de la matière osseuse qui représentent, en sus, des indicateurs de la durabilité de la matière. Par ailleurs, étant intrinsèquement biocompatible, ce matériau peut représenter un excellent modèle pour la recherche de nouveaux procédés de synthèse de matériaux pour des applications biomédicales [3].

Ce chapitre vise donc à introduire différents concepts développés autour de l'analyse d'ivoires anciennement dorés et polychromes en s'appuyant sur le cas des ivoires sculptés du site d'Arslan Tash [4] qui ont permis de mieux évaluer leur état de surface et d'en déduire de précieuses informations sur le savoir-faire technique et artistique des Hommes durant les périodes anciennes. Il a également pour but de montrer comment ces recherches peuvent mener au développement de synthèses originales de nanoparticules (Np) hybrides multifonctionnelles potentiellement utilisables dans le domaine biomédical.

Après une brève introduction sur la constitution de l'ivoire, la caractérisation des ivoires sculptés du site d'Arslan Tash conservés au musée du Louvre, Paris est présentée [5]. Lors de ces recherches, nous avons été amenés à étudier les mécanismes physico-chimiques d'altération des feuilles d'or sur l'ivoire. Ceci a notamment permis d'analyser les processus de formation des nanoparticules d'or (NpAu) au cours du temps qui peuvent être observés sur l'ivoire doré ancien [6]. Comme il s'agit d'un processus ayant lieu dans les environnements naturels, ceci peut inspirer de nouvelles approches de synthèse des Np biocompatibles.

Les NpAu connaissent actuellement un grand essor dans différentes applications biomédicales et industrielles du fait de leurs excellentes propriétés catalytiques et optiques. Le contrôle de leur taille, de leur morphologie et de leur état de dispersion

est crucial pour optimiser leurs propriétés physique [7]. Par ailleurs, leur utilisation en biologie est fortement dépendante de la fonctionnalisation de ces Np par greffage de molécules et de macromolécules organiques en surface qui permet d'assurer leur biocompatibilité et leur transfert vers des cibles thérapeutiques [8, 9]. Plusieurs études ont notamment mis en évidence l'intérêt d'un couplage des NpAu avec du collagène pour la régénérescence de tissus osseux [10] ou le remplissage par les NpAu de tubules de dentine exposés à l'air et responsables de l'hypersensibilité dentaire [11]. Nous décrivons donc, dans ce chapitre, une synthèse archéo-inspirée de NpAu hybrides pour lesquels nous proposons des pistes de recherches futures.

2 Enjeux de l'étude de l'ivoire archéologique : de la macro- à l'ultrastructure

2.1 Constitution de l'ivoire actuel

Le terme d'ivoire peut désigner différents types de matière. En tant que matériau façonné et travaillé par l'homme, l'ivoire peut être défini directement comme la partie dentinaire des défenses des éléphants et mammouths [12]. Les dents d'hippopotame peuvent aussi être nommées ivoire. Il s'agit d'un matériau nano-composite qui présente une structure hiérarchique de la macro- à la nanoéchelle. Sa composition chimique est très proche de celles des dents et des os : il est constitué d'une partie organique, le collagène de type I (Col) constituant 30 % de la masse sèche totale et d'une partie minérale formant les 70 % restants, un carbonate de calcium formant des nanocristaux d'hydroxyapatite carbonatés (carb-HAP) [13-16]. Comme pour les dents, l'ivoire est parcouru d'un réseau de microtubules vides autour duquel s'organise la matrice minéralisée de collagène [16, 17]. L'ivoire possède des propriétés mécaniques et optiques intéressantes qui en font un matériau idéal pour la confection d'objets d'art.

2.2 Enjeux de l'étude des ivoires archéologiques

Au delà de leur forte hiérarchie structurale comme les autres matières dures d'origine animale, les objets d'art anciens en ivoire et les ivoires archéologiques sont modifiés par des processus taphonomiques et diagénétiques [18, 19]. Ces processus d'une très grande complexité peuvent fortement varier d'un site à l'autre. Ils ne dépendent pas forcément du temps mais surtout des conditions d'enfouissement. Dans les environnements de permafrost ou dans des grottes on peut retrouver des objets exceptionnellement bien conservés. Sur les sites humides, il est possible de retrouver des objets en ivoire intact mais qui se décomposent très rapidement lors de leur mise au jour par un séchage inadéquat [20]. Ainsi, les objets de chaque site représentent des cas uniques dont il s'agit d'étudier la composition et la structure afin de pouvoir évaluer l'état de conservation. De plus, ces altérations affectent l'ivoire d'une matière hétérogène et introduisent donc une difficulté analytique supplémentaire lorsqu'on voudrait étudier ces matériaux archéologiques pour des questions concernant les modes de vie anciens ou le savoir-faire technique des sociétés du passé [21-23]. En effet, les ivoires en tant que matériau formé biologiquement peuvent être utilisés pour établir une chronologie alimentaire ou environnementale grâce à l'analyse isotopique [24]. Les objets en ivoire

permettent de montrer les techniques de façonnage, les techniques de décoration ou encore de dorure dans le cas d'objets d'art polychromes et dorés.

Afin de sonder tout le potentiel informatif de ces objets et vestiges en ivoire sur notre passé, il est indispensable de considérer les altérations bio-géo-physico-chimiques qui les ont transformés au cours du temps.

2.3 Objets en ivoire sculpté et doré

À titre d'exemple nous présentons ici nos travaux de recherche réalisés sur les ivoires d'Arslan Tash conservés et exposés au Département des Antiquités Orientales du musée du Louvre (figure 1). Une attention particulière a été portée aux traces éventuelles de polychromie, de dorure et d'incrustations colorées. De nombreux objets antiques sont connus pour avoir été colorés. Or, ces décorations sont souvent perdues sous l'influence du temps et du milieu de conservation.

Des observations à l'œil nu, sous microscope optique, sous lumière UV et des premières analyses en laboratoire des ivoires d'Arslan Tash ont permis d'identifier différents états de préservation de la surface des ivoires et d'obtenir des premiers indices concernant la présence éventuelle de traces de polychromie. Cependant, l'essentiel de cette ancienne polychromie n'est plus visible. Il n'en demeure que quelques petites taches pourpres, d'origine incertaine, présentes sous des restes de feuilles d'or à la surface de quelques ivoires comme la *Vache léchant son veau* (AO11452) ou la *Naissance d'Horus* (AO 11465). Des résidus de bleu égyptien ont également été identifiés par spectrométrie Raman dans l'œil du sphinx (AO 11497) [5].



FIGURE 1 – *Naissance d'Horus* (n° labo AI_El_AT_Louv19, no inv. AO11465), plaquette en ivoire (dimensions environ 10 cm^2) du site d'Arslan Tash, Syrie, VIII^e siècle av. notre ère, conservée au musée du Louvre avec des traces de dorure. (M. Albéric, C2RMF/LAMS, Paris)

En collaboration avec Élisabeth Fontan (conservatrice au Département des Antiquités Orientales du musée du Louvre), une recherche plus poussée a été réalisée visant à confirmer et à révéler de manière plus systématique la présence d'anciennes polychromies et dorures à la surface des ivoires.

Ces premières analyses ont consisté en une étude systématique de seize pièces de la collection (cinq plaquettes ou fragments présentant la *Naissance d'Horus* (AO 11466/67/69/94/95), le *Cerf paissant* (AO 11458), la frise des *Papyri* (AO 11479), trois *Dames à la fenêtre* (AO 11462/63/64), une colonnette (AO 11484), quatre *Sphinx* ou fragments (AO 11486/96a/96b/97), la *Vache léchant son veau* (AO 11452) et la *Tête de lion* (AO 11490) en plus des analyses de quelques pièces comparables de la collection du Badisches Landesmuseum à Karlsruhe, en Allemagne [25]. Les analyses ont été effectuées par différentes techniques analytiques non-invasives complémentaires, notamment par l'émission de rayons X induite sous microfaisceau de protons (microPIXE) à l'Accélérateur Grand Louvre d'analyse élémentaire (AGLAE) ; par la spectroscopie Raman et la spectroscopie d'absorption visible (Vis) ; par la micro-diffraction de rayons X (DRX) ainsi que par la radiographie et la tomographie de rayons X. Ces méthodes analytiques permettent d'observer et d'analyser la composition chimique de la phase minérale de l'ivoire sans prélèvement. Les analyses microPIXE permettent notamment de déterminer les concentrations en éléments majeurs (calcium [Ca], phosphore [P]), mineurs (magnésium [Mg], aluminium [Al], silicium [Si]) et traces (fer [Fe], cuivre [Cu], plomb [Pb]) à la surface des objets et, ainsi, d'identifier d'éventuels restes de polychromie et de dorure. Ces analyses ont permis de caractériser la présence de feuille d'or, d'expliquer l'origine des taches pourpres ainsi que de révéler la présence d'un pigment rouge, l'hématite et d'un pigment bleu-vert, le bleu égyptien [5].

Afin de pouvoir révéler la répartition de l'ancienne polychromie et dorure à la surface des ivoires, six objets en ivoire du site d'Arslan Tash ont été étudiés par microPIXE en mode imagerie : la *Naissance d'Horus* (AO 11465), le *Genius* (AO 11484), le *Cerf paissant* (AO 11458), la *Vague* (AO 11493), la frise des *Papyri* (AO 11479) et la *Dame à la fenêtre* (AO11459).

Grâce à la méthode micro-PIXE en mode imagerie récemment installée à AGLAE, il est désormais possible d'obtenir des cartographies de la répartition élémentaire de la surface des objets [26]. Les cartographies chimiques qualitatives des éléments d'Al à Pb ont permis de révéler la présence et la répartition d'éléments traces à la surface des ivoires. Certains sont caractéristiques d'anciens pigments : le Cu, présent dans le bleu et le vert égyptien, le Fe pouvant correspondre aux pigments rouge et jaune ou aux traces de sédiments ainsi que le Pb, probablement originaire du blanc de plomb. Ces cartographies chimiques ont été confrontées aux images microscopiques de la surface présentant les décors et motifs des ivoires et ont permis de proposer des hypothèses quant à l'ancienne polychromie et dorure des ivoires. Ce nouveau dispositif d'imagerie chimique permet aussi un traitement de données semi-quantitatif. Ainsi, il a été possible de distinguer différentes teintes de bleu à partir des rapports Pb/Cu sur la frise des *Papyri* (AO 11479). Dans le cas des traces de fer, une corrélation de sa répartition avec la présence de polychromie est moins aisée car il peut aussi s'agir de traces de sédiments riches en Fe ou des restes de polychromie à base de Fe. La

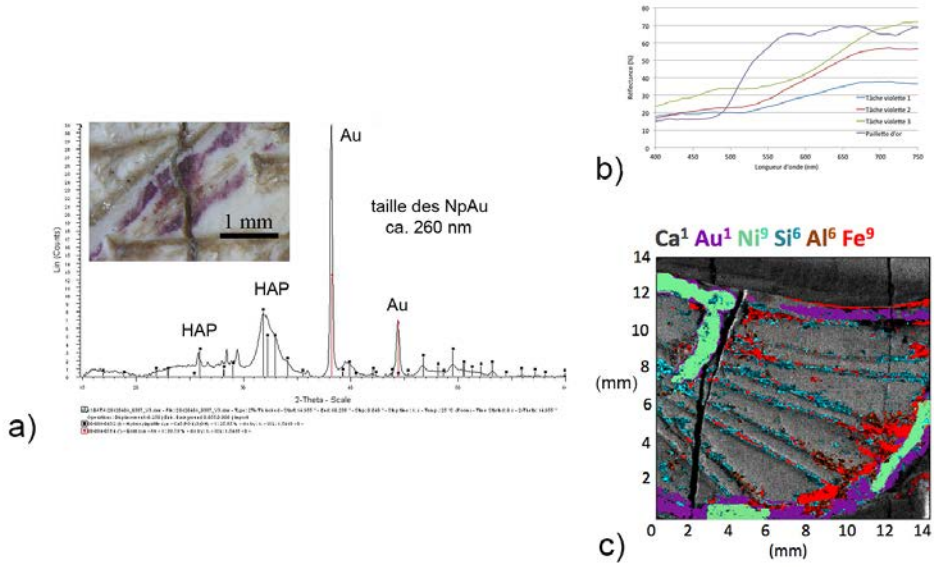


FIGURE 2 – (a) Micro-diffractogramme de rayons X sur l'aile en haut du personnage à gauche de la plaquette Naissance d'Horus, n° d'inv. AO11465 du musée du Louvre ; (b) spectre Vis enregistré sur des taches pourpre sur les objets d'Arslan Tash en ivoire indiquant la présence de NpAu ; (c) cartes élémentaires sur l'aile en bas du personnage à gauche de la plaquette Naissance d'Horus du musée du Louvre, n° d'inv. AO11465, déterminées par micro-PIXE en mode imagérie à AGLAE, C2RMF, Paris.

corrélation des répartitions élémentaires du Fe avec celles d'autres éléments comme le Al et le Si permet de conclure qu'il s'agit plutôt de restes de sédiments. Dans le cas où la répartition du Fe n'est pas corrélée à celles de ces éléments (Al, Si, Fe) il s'agirait plutôt de l'ancienne polychromie. La répartition de l'or (Au) a également été analysée et il a été montré que de nombreuses traces d'Au peuvent être mises en évidence à la surface des ivoires d'Arslan Tash [27].

Ces analyses non-invasives en mode imagerie appliquées ont permis d'établir des preuves de la présence de polychromie et de la dorure à la surface de ces ivoires. Des reconstitutions de l'état d'origine des ivoires d'Arslan Tash ont ainsi pu être proposées, ce qui change totalement la vision que nous en avions, ces pièces étant, même sans décor apparent, d'une beauté sans égale. Par ailleurs, l'étude de ces objets a aussi permis de montrer que les taches pourpres à la surface des objets (figure 2) contenaient de l'Au. Cet or a été identifié sous forme d'agrégats de NpAu par la microDRX et la spectroscopie Vis [5]. En effet, les NpAu ont un seuil d'absorption très caractéristique dans la région du visible autour de 520 nm qui peut être expliqué par l'effet Mie [28, 29], la position et la forme exacte de ce seuil dépendant de la taille et de la forme des NpAu. En complément la taille des NpAu a également été évaluée par la formule de Scherer (1918) à partir de la largeur à mi-hauteurs pics de diffraction de l'Au. Les tailles déterminées varient entre 50 et 260 nm selon les pièces analysées (*Cerf paissant* [AO 11458], *Dignitaire* [AO 11488] et *Naissance d'Horus* [AO 11465])

[30]. Sans intervention humaine, la formation de ces NpAu ne peut s'expliquer que par les interactions physico-chimiques entre l'ivoire et les feuilles d'or déposées à sa surface sous l'influence des conditions environnementales au cours du temps.

Les NpAu ainsi formées sur des temps longs pourraient ainsi servir de systèmes modèles pour former des NpAu sous conditions ambiantes de température et de pression, tout en simplifiant considérablement les processus de synthèse et de façon plus respectueuses de l'environnement.

3 Élucidation d'un mécanisme possible de formation des nanoparticules d'or sur les ivoires

3.1 Définition des nanoparticules et processus de formation

Les Np peuvent être définies comme des objets de dimensions nanométriques (typiquement inférieures à 100 nm environ). À ces échelles, les Np possèdent des propriétés physiques et chimiques remarquables au sens qu'elles diffèrent de celles d'objets macroscopiques de même structure et composition. Une caractéristique importante qui détermine ces propriétés est que le ratio entre le nombre d'atomes en surface sur celui des atomes occupant le reste du volume est élevé, conférant aux nanoparticules une forte réactivité de surface. Le deuxième critère déterminant pour l'utilisation des Np est leur nature chimique, i.e. structure et composition. Elles peuvent être constituées de différents matériaux dont les métaux et oxydes métalliques représentent une classe importante pour les applications actuelles. Les NpAu sont notamment très étudiées de nos jours. Celles-ci peuvent être formées à haute température (comprise entre 700 et 750 °C) [29] mais plusieurs études ont montré que les NpAu pouvaient aussi être synthétisées à température ambiante dans des contextes géochimiques impliquant un milieu réducteur, favorisant la dissolution et la précipitation de l'or, notamment par l'action de différentes plantes, algues et bactéries [31, 32].

Ainsi, il est possible que les NpAu puissent être formées dans des contextes archéologiques tels que ceux observés sur les ivoires du site d'Arslan Tash. Les facteurs impliqués dans les mécanismes physicochimiques responsables de la formation et du greffage des NpAu devraient donc être : l'ivoire (partie minérale et organique), la feuille d'or, la colle animale et les agents du milieu d'enfouissement. Le nombre important d'éléments entrant en jeu dans la formation et le greffage des NpAu à la surface de l'ivoire ainsi que leur évolution au cours du temps rend le système complexe. Par ailleurs, il est relativement bien établi, que le collagène peut fortement interagir avec les NpAu, mais qu'il se dégrade, se modifie ou peut même être détruit au cours du temps [33, 34].

3.2 Mécanisme possible de formation des nanoparticules d'or sur les ivoires d'Arslan Tash

Afin de proposer un premier scénario décrivant les processus chimiques de formation des NpAu sur l'ivoire archéologique, plusieurs approches complémentaires ont été croisées : une caractérisation physico-chimique (la moins invasive possible) effectuée directement sur les ivoires archéologiques et une approche de synthèse « *bottom-up* »

des NpAu sur l'ivoire moderne. Nous avons étudié l'interface entre l'ivoire et les NpAu à l'air ambiant pour mettre en évidence les paramètres qui permettent la formation et le greffage des NpAu sur différents supports (collagène [Col], hydroxyapatite carbonatée [carb-HAP], feuille d'or, colle animale) et de comprendre les mécanismes physicochimiques d'altération des feuilles d'or conduisant à la présence de NpAu.

Différentes questions sont à considérer lors de ces recherches : (1) quels sont les mécanismes physicochimiques d'altération des feuilles d'or ; et (2) quels sont les paramètres du système qui permettent la formation et le greffage des NpAu ?

À cet effet, deux protocoles de synthèse ont été mis en œuvre :

1. Une synthèse classique de NpAu à partir de sels d'Au ($HAuCl_4$) en milieu réducteur avec du tétrahydruroborate de sodium ($NaBH_4$) sous forme de solution colloïdale avec l'incorporation de fonctions chimiques polymériques -COOH du polyéthylène glycol (PEG) pour contrôler la taille et permettre un greffage spécifique à température ambiante et sous agitation (figure 3), suivie d'une analyse des mécanismes chimiques (figure 4) à l'aide d'une caractérisation chimique et physique par spectroscopie infrarouge (IR) et microscopie électronique à transmission (MET).
2. Une synthèse des NpAu en présence de collagène en solution ou de carb-HAP en poudre ou de fragments d'ivoire d'éléphant moderne (échantillons obtenus lors de saisies de douanes). Des premiers tests portant sur la synthèse classique des NpAu et le dépôt sur collagène, sur carb-HAP et sur un mélange de Col-carb-HAP se sont ainsi révélés particulièrement prometteurs.

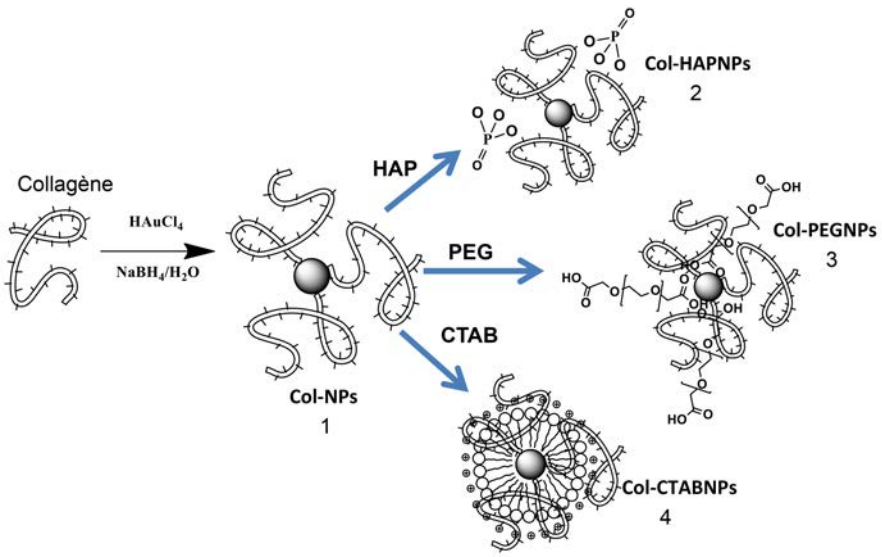


Figure 3 – Synthèse des NpAu en présence de Collagène (Col) (1) ; de Col et Hydroxyapatite (HAP) (2) ; de Col et Cetyl-tetra-ammonium-bromide (CTAB) et (3) de (Col) et Polyéthylène Glycol (PEG).

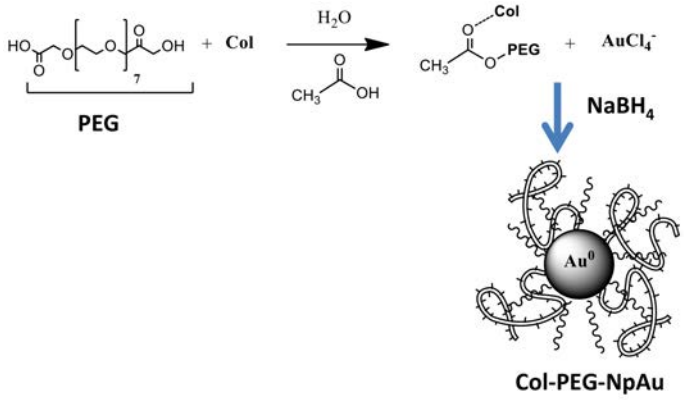


Figure 4 – Mécanisme de réaction des NpAu en présence des molécules polymériques Col-PEG.

D'après ces essais, il est possible de conclure que le processus de formation et la croissance des NpAu s'effectue en quatre étapes : (1) formation d'un complexe entre sel d'or $AuCl_4^-$ et des molécules polymériques (PEG, Col) par un processus d'assemblage et de charge ionique menant à la formation de micelles polymériques ; (2) réduction initiale des ions Au^{4+} en Au^{2+} due à la présence des ions carboxylates polymériques et de collagène à la surface des germes d'or ; (3) accélération de la réaction de réduction par la présence d'acide acétique et formation des complexes or-polymère ; (4) réduction complète des micelles d'Au^{2+} en Au^0 avec formation de NpAu. Les mécanismes de formation (structuration et auto-assemblage) et de greffage des NpAu ont été déterminés sur différents supports afin de préciser quels sont les paramètres chimiques et structuraux importants [6].

Comprendre les mécanismes de formation, de greffage dans des conditions environnementales et temporelles particulières des NpAu sur l'ivoire permet, ainsi, de promouvoir l'application des NpAu aux biomatériaux pour les applications décrites précédemment. L'aspect chimique relatif à l'utilisation d'autres surfactants et stabilisants dans le processus de formation des NpAu est particulièrement intéressant. La figure 5a représente la caractérisation par microscopie électronique à transmission (MET) des NpAu obtenues avec du Col (1), du Col-HAP (2), du Col-polymère (PEG) (3) et du Col et CTAB (4). Celle-ci confirme le changement dimensionnel et de forme lorsqu'il y a compétition chimique et stérique entre deux agents stabilisants différents (Col-Cetyl-tetra-ammonium-bromide (CTAB)). Les quatre types des NpAu hybrides ont montré une stabilité à long terme (24 mois) en solution aqueuse et à température ambiante confirmée par spectroscopie Vis (figure 5b). La caractérisation par spectroscopie IR (figure 5c) a permis de confirmer les bandes caractéristiques des NPAu-Col et d'autres composants permettant de mieux comprendre le mécanisme de formation chimique [6].

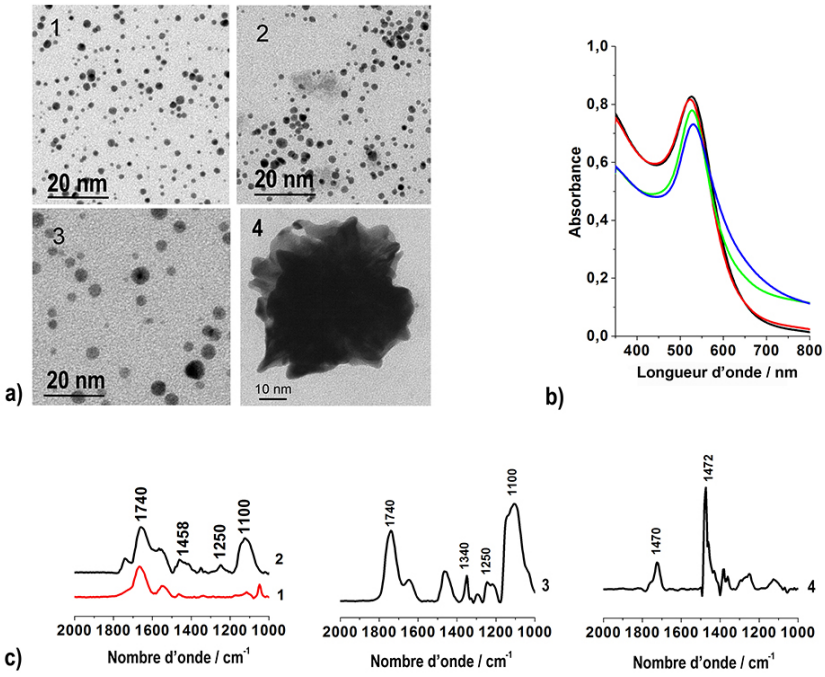


Figure 5 – (a) Micrographies électroniques (MET) : des Col-NpAu (1), des Col-HAP NpAu (2), Col-PEG-NpAu (3), Col-CTAB-NpAu (4) ; (b) caractérisation par spectroscopie Vis des quatre types des NpAu ; (c) caractérisation par spectroscopie IR (PM IRRAS) des quatre types des NpAu.

Grâce à ces recherches sur les mécanismes de formation des NpAu aux interfaces or-ivoire dans des systèmes modèles, il est possible de conclure quant aux spécificités des NpAu retrouvées sur les ivoires archéologiques du site d'Arslan Tash : le processus doit démarrer par une dissolution au moins partielle des feuilles d'or appliquées sur l'ivoire lors de la période d'enfouissement dans le sol. Les ions métalliques d'or présents en solution dans le sol forment des complexes chimiques avec le collagène issu soit de l'ivoire, soit de la colle utilisée pour fixer les feuilles d'or sur leur support. Par un agent réducteur également présent dans le sol, les ions sont réduits à l'état métallique et forment des Np hybrides avec le collagène qui joue un rôle stabilisateur. Ces Np hybrides peuvent s'interfacer avec la surface des ivoires ou sur la partie minérale, le carb-HAP. Le collagène peut ensuite se dégrader mais les NPAu peuvent être préservées sur la surface de l'ivoire minéral, essentiellement composé de carb-HAP ; les NpAu donnant lieu aux taches pourpres observées dont la couleur est déterminée par les dimensions des Np. La phase minérale de l'ivoire archéologique est préservée au cours de temps. Ainsi, il est possible que les NpAu puissent être formées naturellement sur les ivoires dans le sol en présence de collagène ([6] figure 6).

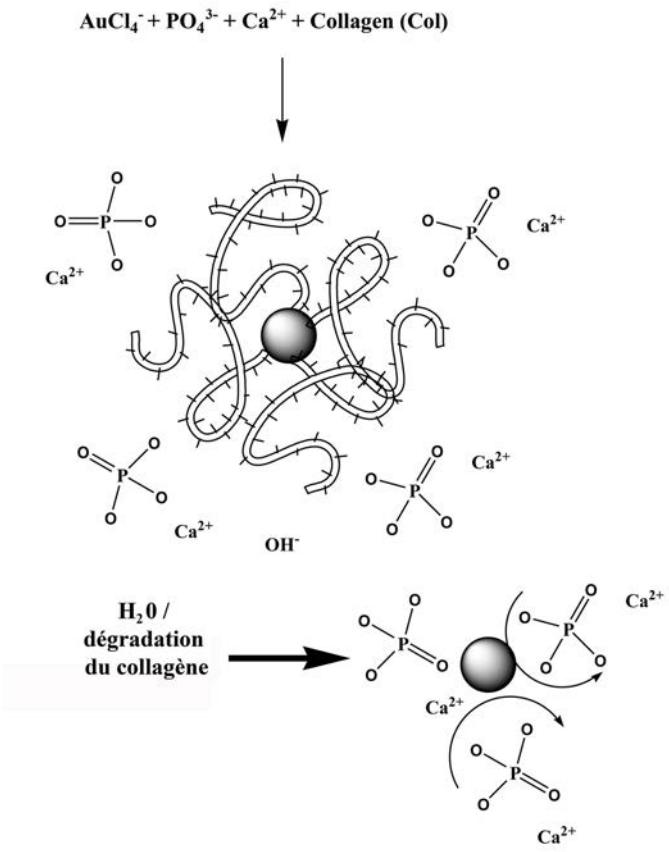


Figure 6 – Mécanisme de formation-dégradation des NpAu sur l'ivoire [6].

4 Les nouvelles approches de synthèse des nanoparticules hybrides multifonctionnelles pour les applications biomédicales

Les NpAu naturellement formées sur des objets d'ivoire archéologiques peuvent servir de modèle pour la synthèse chimique de NpAu stables à long terme. Nous pouvons bénéficier de biomatériaux naturellement modifiés, portant des Np et les utiliser comme un « laboratoire naturel » pour étudier leur durabilité au fil du temps afin d'élucider les mécanismes de prolifération des cellules osseuses aux interfaces biologiques [35, 36] (figure 7).

Les différents facteurs de vieillissement interagissent les uns avec les autres d'une manière très complexe. Cependant, en raison de leur caractère précieux, l'étude des objets en ivoire archéologiques doit être réalisée en utilisant des méthodes non-invasives. De même, l'évaluation de la durabilité des Np à l'interface du biomatériau et de la matrice, doit passer par l'utilisation de systèmes modèles. En dépit du fait qu'ils ne reflètent pas entièrement les conditions naturelles ou biologiques, ces derniers peuvent être étu-

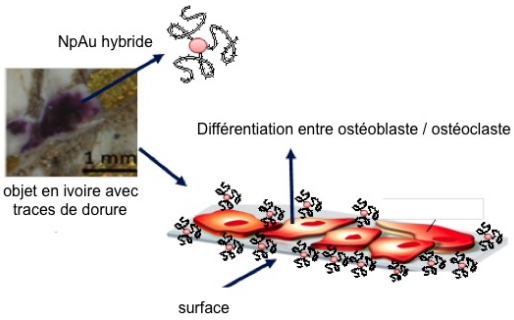


FIGURE 7 – Représentation schématique de la prolifération des ostéoblastes / ostéoclastes aux bio-interfaces en présence des NpAu hybrides.

diés en détail en utilisant une combinaison de différentes méthodes non-destructives et/ou destructrices. Ils peuvent également servir de support pour l'étude du vieillissement accéléré et différents processus peuvent être imités dans le laboratoire. Par conséquent, cette méthode représente une nouvelle approche originale véritablement interdisciplinaire où la conception et la stabilité archéo-bio-inspirés ainsi que des tests de compatibilité des NpAu hybrides fonctionnalisées sont effectués. Dans la figure 8 nous présentons une étude préliminaire de la prolifération cellulaire en présence de Col-NpAu et Col-HAP-NpAu biocompatibles réalisée en collaboration avec le Trinity College, Dublin (P^{r} A.-P. Mello ; PhD Dania Movia).

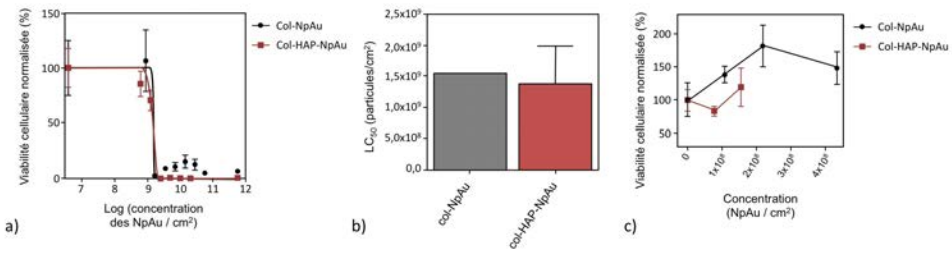


FIGURE 8 – Biocompatibilité et prolifération cellulaire en présence du Col-NpAu ou Col-HAP-NpAu. (a) Pourcentage (%) de cellules vivantes quantifiées par cytométrie en flux après exposition (MC3T3) cellules murines ostéoblastes à diverses concentrations de Col-NpAu ou Col-HAP-NpAu (allant de 0 à 8,7 × 108 particules / cm^2) pendant 24h. Les données sont rapportées en tant que valeur moyenne ± erreur type de la moyenne. Les courbes dose-réponses sont aptes à extrapoler la valeur de la concentration létale demi-maximale (LC50) du Col-NpAu et Col-HAP-NpAu. Valeurs (b) LC50 du Col-NpAu et Col-HAP-NpAu extrapolées à partir des courbes dose-réponse.Aucune différence significative dans la biocompatibilité de ces deux types de NpAu testées n'a pu être détectée. Les données sont déclarées comme valeur moyenne +/- un intervalle de confiance de 95 %. (C)% de cellules vivantes MC3T3 suivant 24h d'exposition à diverses concentrations de Col-NpAu ou Col-HAP-NpAu en dessous de leurs valeurs de la LC50. Les cellules vivantes ont été comptées par cytométrie en flux. Un nombre croissant de cellules vivantes, indiquant une prolifération cellulaire, a été détecté lorsque des cellules ont été exposées aux NpAu. Les données sont rapportées en tant que valeur moyenne ± erreur type de la moyenne.

Aucune différence significative dans la biocompatibilité de ces deux types de NpAu testées n'a pu être détectée. Les données sont déclarées comme valeur moyenne +/- un intervalle de confiance de 95 %. (C)% de cellules vivantes MC3T3 suivant 24h d'exposition à diverses concentrations de Col-NpAu ou Col-HAP-NpAu en dessous de leurs valeurs de la LC50. Les cellules vivantes ont été comptées par cytométrie en flux. Un nombre croissant de cellules vivantes, indiquant une prolifération cellulaire, a été détecté lorsque des cellules ont été exposées aux NpAu. Les données sont rapportées en tant que valeur moyenne ± erreur type de la moyenne.

Grâce à cette étude, il a été possible de démontrer que les Np hybrides à base de collagène (Col-Hyb –NPAu) ne sont pas toxiques pour les ostéoblastes, contrairement aux Np greffées par des tensioactifs classiques (CTAB, Citrate, TOAB, BDAC). Ainsi, ces nanomatériaux sont des candidats prometteurs pour une étude mécanistique et comparative évaluant le mécanisme de la formation osseuse sur des échafauds de bioingénierie (par exemple des échafauds d'HAP) décorés de Col-Hyb-NpAu de forme et de taille différentes. Au cours des dernières décennies, des études de remplacement d'os et de réparation ont mis l'accent sur les matériaux résistants mécaniquement, bio-inertes [37]. Aujourd'hui, la tendance a évolué vers des matériaux qui peuvent simuler le tissu vivant (biomimétique), aider dans le processus de guérison (bioactive) et être remplacés par de l'os naturel (biodégradable) sans induire d'effets toxiques (biocompatibles) [38]. Actuellement, les composés à base de phosphates de Ca, à savoir l'hydroxyapatite (HAP) et le phosphate β-tricalcique, sont les composés biomimétiques de synthèse le plus largement utilisés, car ils sont bioactives et de substituts osseux biodégradables en bioingénierie. À la lumière de ces facteurs, notre activité se concentre sur la compréhension des bio-interactions se produisant entre ostéoblastes / ostéoclastes humaines et les NP à base de Col-HAP, lorsque ceux-ci sont greffés de façon covalente sur un échafaudage pour la régénération osseuse [10] (figure 9).

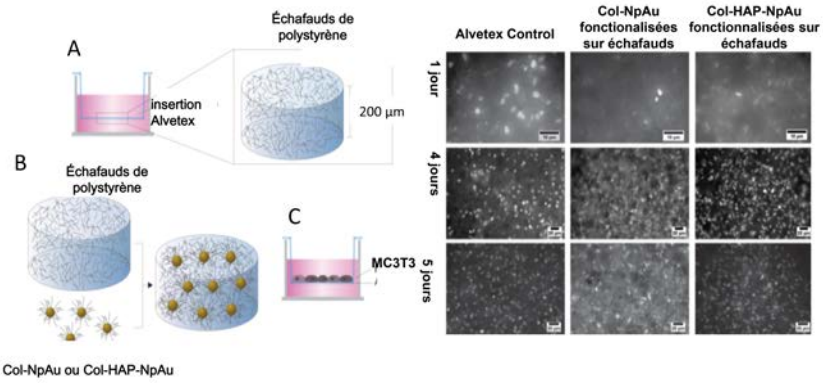


Figure 9 – Les résultats préliminaires sur la capacité des Col-NpAus et Col-HAP-NpAu pour induire la prolifération des cellules, une fois intégrées comme composants actifs d'échafauds de bioingénierie. (AB) Schéma de (a) les insertions Alvetex® (Reinnervate) utilisées comme échafauds pour la formation des cultures de cellules en 3D des cellules ostéoblastes MC3T3, et (b) les insertions Alvetex® fonctionnalisées avec des Col-NpAu ou Col-HAP-NpAu, (c) Le diagramme décrit la conception expérimentale *in vitro*, (d) micrographies montrant la prolifération cellulaire telle que reçue (non-fonctionnalisée), Col-NpAu fonctionnalisées et Col-HAP-NpAu fonctionnalisées insérées Alvetex®.

De manière intéressante, la prolifération cellulaire était évidente sur les Col-HAP-NpAu insérées fonctionnalisées, soutenant ainsi les études proposées ici.

5 Conclusions

Ces recherches illustrent comment l'étude des ivoires anciens et, plus généralement, d'os archéologiques peut inspirer et apporter des informations cruciales pour les recherches actuelles dans le domaine biomédical. Ces aspects innovants sont difficiles à trouver ailleurs. Étant donné la complexité de l'étude des matériaux du patrimoine culturel et des processus de vieillissement mis en jeux il est nécessaire de mettre au point des approches originales afin de remonter aux phénomènes responsables des modifications de la matière. Les matériaux du patrimoine comme les ivoires polychromes et dorés sont, en général, hétérogènes à plusieurs échelles, ce qui constitue, de fait, un réel défi analytique. Les recherches sur l'altération des objets du patrimoine à long terme peuvent permettre de développer des processus de synthèse dans des conditions physico-chimiques beaucoup plus respectueuses de l'environnement, en intégrant des informations obtenues sur un long terme qui ne peuvent pas être observés sur d'autres matériaux modernes, mêmes altérés dans des conditions proches des conditions naturelles. De l'étude des archéomatériaux complexes peut donc émerger des problématiques et des approches originales, comme l'archéo-mimétisme, pour des recherches actuelles, notamment dans le domaine des applications biomédicales.

Références

[1] A. Caubet, Gaborit-Chopin, « Ivoires. De l'Orient Ancien aux Temps modernes » dans Ivoires. De l'Orient Ancien aux Temps modernes, Editor edˆeds., éditions de la Réunion des musées nationaux, Paris. p. 191, 2004.

[2] R. White, « Ivory personal ornaments of Aurignacian Age : technological, social and symbolic perspectives » dans Travail et usages de l'ivoire au Paléolithique supérieur, Centre universario europeo p. 29-62, 1995.

[3] E. Jallot, « Nanoscale physico-chemical reactions at bioceramics-bone tissues interfaces » dans Handbook of Nanostructured Biomaterials and their Appplications in Nanobiotechnology, ed H.S. Nalwa, American Scientific Publishers. p. 495-509, 2005.

[4] E. Fontan, G. Affani, Ivoires d'Arslan Tash, Edition de la Réunion des musées nationaux, Paris à paraîtr.

[5] E. Fontan, I. Reiche, Les ivoires d'Arslan Tash (Syrie) d'après une étude de la collection du musée du Louvre : mise en œuvre du matériau, traces de dorure, état de conservation. ArchéoSciences. 35, 283-295, 2011.

[6] J. Spadavecchia, E. Apchain, M. Alberic, E. Fontan, I. Reiche, One Step Synthesis of Collagen Hybrid Gold Nanoparticles and formation on Egyptian-like Gold-plated Archaeological Ivory Angewandte Chemie International Edition. 53, 8363–8366, 2014.

[7] D.A. Giljohann, D.S. Seferos, W.L. Daniel, M.D. Massich, P.C. Patel, C.A. Mirkin, Gold nanoparticles for biology and medicine. Angewandte Chemie. 49, 19, 3280-94, 2010.

[8] H. Moustaoui, D. Movia, N. Dupont, N. Bouchemal, S. Casale, N. Djaker, P. Savarin, A. Prina-Mello, M. Lamy De La Chapelle, J. Spadavecchia, Tunable design of gold (III)-Doxorubicin complex – PEGylated nanocarrier. The golden doxorubicin for oncological applications. ACS Applied Materials and Interfaces. 8, 31, 19946–19957, 2016.

[9] J. Spadavecchia, D. Movia, C. Moore, C. Manus Maguire, H. Moustaoui, S. Casale, Y. Volkov, A. Prina-Mello, A Targeted polyethylene glycol gold nanoparticles for the treatment of pancreatic cancer : from synthesis to proof-of-concept in vitro studies. Journal of International Nanomedicine. 11, 791-822, 2016.

[10] A.M. Ferreira, P. Gentile, V. Chiono, G. Ciardelli, Collagen For Bone regeneration. Acta Biomaterialia. 8, 3191–3200, 2012.

[11] M.-H. Liu, C.-H. Chan, J.-H. Ling, C.R.C. Wang, Filling in dentinal tubules Nanotechnology. 18, 475104 7-13, 2007.

[12] E.O. Espinoza, M.-J. Mann, Guide d'identification de l'ivoire et de ses substituts. World Wildlife Fund and Conservation Foundation. 1991.

[13] V. Jantou-Morris, M.A. Horton, D.W. Mccomb, The nano-morphological relationships between apatite crystals and collagen fibrils in ivory dentine. Biomaterials. 31, 19, 5275-5286, 2010.

[14] M. Locke, Structure of Ivory. Journal of Morphology. 269, 423-450, 2008.

[15] X.W. Su, F.Z. Cui, Hierarchical structure of ivory : from nanometer to centimeter. Material Science and Engineering. C7, 19-29, 1999.

[16] M. Albéric, M.N. Dean, A. Gourrier, J.W.C. Dunlop, W. Wagermaier, A. Staude, P. Fratzl, I. Reiche, Relation between the macroscopic pattern of elephant ivory and its three-dimensional micro-tubular network. PloS One. sous presse.

[17] I. Reiche, K. Müller, A. Staude, J. Goebbels, H. Riesemeier, Synchrotron radiation and laboratory micro X-ray computed tomography – useful tools for the material's identification of prehistoric objects made of ivory, bone or antler. Journal of Analytical Atomic Spectroscopy. 26, 1802-1812, 2011.

[18] M. Albéric, A. Gourrier, K. Müller, I. Zizak, W. Wagermaier, P. Fratzl, I. Reiche, Early diagenesis of elephant tusks in marine environment. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology. 416, 120-132, 2014.

[19] C. Heckel, K. Müller, R. White, H. Floss, N.J. Conard, I. Reiche, Micro-PIXE/PIGE analysis of Palaeolithic mammoth ivory : Potential chemical markers of provenance and relative dating. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology. 416, 133-141, 2014.

[20] D. Large, K. Müller, I. Reiche, Approche analytique pour l'étude des ivoires archéologiques. Les défenses d'éléphant du site de Jinsha (1200-650 BC, Sichuan, Chine). ArchéoSciences. 35, 167-177, 2011.

[21] M. Lebon, K. Müller, J.-J. Bahain, F. Fröhlich, C. Falguères, L. Bertrand, C. Sandt, I. Reiche, Imaging fossil bone alterations at the microscale by SR-FTIR microspectroscopy. Journal of Analytical Atomic Spectroscopy. 26, 5, 922 - 929, 2011.

[22] M. Lebon, K. Müller, L. Bellot-Gurlet, C. Paris, I. Reiche, Application des micro-spectrométries Infrarouge et Raman à l'étude des processus diagénétiques altérant les ossements Paléolithiques. ArchéoSciences. 35, 179-190, 2011.

[23] I. Reiche, M. Lebon, C. Chadefaux, K. Müller, A.-S. Le Hô, M. Gensch, U. Schade, Microscale imaging of the preservation state of 5,000-year-old archaeological bones by synchrotron infrared microspectroscopy. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 397, 2491-2499, 2010.

[24] M. Albéric, I. Reiche, « Ivoire » dans Message d'os. Archéométrie du squelette animal et humain, eds M. Balasse, J.-P. Brughal, Y. Dauphin, E.-M. Geigl, C. Oberlin, I. Reiche, éditions des archives contemporaines Paris p. 53-68, 2015.

[25] I. Reiche, K. Muller, M. Alberic, O.U. Scharf, A. Wahning, A. Bjeoumikhov, M. Radtke, R. Simon, Discovering vanished paints and naturally formed gold nanoparticles on 2800 years old Phoenician ivories using SR-FF-microXRF with the Color X-ray Camera. Analytical Chemistry. 85, 12, 5857-5866, 2013.

[26] L. Pichon, B. Moignard, Q. Lemasson, C. Pacheco, W. P., Development of a multi-detector and a systematic imaging system on the AGLAE external beam. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B. 318, 27-31, 2014.

[27] M. Alberic, K. Muller, L. Pichon, Q. Lemasson, B. Moignard, C. Pacheco, E. Fontan, I. Reiche, Non-invasive quantitative micro-PIXE-RBS/EBS/EBS imaging reveals the lost polychromy and gilding of the Neo-Assyrian ivories from the Louvre collection. Talanta. 137, 100-8, 2015.

[28] H. Horvath, Gustav Mie and the scattering and absorption of light by particles : Historic developments and basics. Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. 110, 11, 787-799, 2009.

[29] J. Lafait, S. Berthier, C. Andraud, V. Reillon, J. Boulenguez, Physical colors in cultural heritage : Surface plasmons in glass. Comptes Rendus Physique. 10, 7, 649-659, 2009.

[30] M. Albéric, I. Reiche, Huit objets en ivoire d'éléphant, Département des Antiquités Orientales, musée du Louvre, N° inv. AO 11458, 11459, 11465, 11474, 11479, 11484, 11488, 11493, Centre de recherche et de restauration des musées de France,n° 24060, 2012.

[31] R.M. Hough, R.R.P. Noble, G.J. Hitchen, R. Hart, S.M. Reddy, M. Saunders, P. Clode, D. Vaughan, J. Lowe, D.J. Gray, R.R. Anand, C.R.M. Butt, M. Verrall, Naturally occurring gold nanoparticles and nanoplates. Geology. 36, 7, 571, 2008.

[32] N. Sharma, A.K. Pinnaka, M. Raje, A. Fnu, M.S. Bhattacharyya, A.R. Choudhury, Exploitation of marine bacteria for production of gold nanoparticles. Microbial Cell Factories. 11, 86 2012.

[33] M.J. Collins, C.M. Nielsen-Marsh, J. Hiller, C.I. Smith, J.P. Roberts, R.V. Prigodich, T.J. Wess, J. Csapo, A.R. Millard, G. Turner-Walker, The survival of organic matter in bone : a review. Archaeometry. 44, 3, 383-394, 2002.

[34] H.G.M. Edwards, R.H. Brody, N.F. Nick Hassan, D.W. Farwell, S. O'connor, Identification of archaeological ivories using FT-Raman spectroscopy. Analytica Chimica Acta. 559, 64-72, 2006.

[35] B.D. Boyan, T.W. Hummert, K. Kieswetter, D. Schraub, D. Dean, Z. Schwartz, Effect of titanium surface characteristics on chondrocytes and osteoblasts in vitro. Cells Mater. 5, 323-335, 1995.

[36] B.D. Boyan, S. Lossdörfer, L. Wang, G. Zhao, C.H. Lohmann, D.L. Cochran, Z. Schwartz, Osteoblaste generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough micrographies. European cells and Materials. 6 22-27, 2003.

[37] H. Kalyanaraman, G. Ramdani, J. Joshua, N. Schall, G.R. Boss, E. Cory, R.L. Sah, D.E. Casteel, R.B. Pilz, A Novel, direct No Donor Regulates Osteoclast functions and increases bone mass in ovariectomized mice. Journal of Bone and Mineral Research. 32, 1, 46–59, 2017.

[38] Li-Na Niu, S.E. Jee, Kai Jiao, L. Tonggu, M. Li, L. Wang, Y.-D. Yang, J.-H. Bian, L. Breschi, S.S. Jang, J.-H. Chen, D.H. Pashley, F.R. Tay, Collagen intrafibrillar mineralization as a result of the balance between osmotic equilibrium and electroneutrality. Nature Materials. doi :10.1038/nmat4789, 2016.